



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

**CONVERSÃO POR VIA BIOTECNOLÓGICA DE GLICERINA RESIDUAL EM  
BIOMASSA DE LEVEDURAS COMO FONTE DE PROTEÍNAS E LIPÍDIOS**

**FRANCISCO ROBERTO DA SILVA MACHADO JUNIOR**

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

**RIO GRANDE, RS  
2010**

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

**CONVERSÃO POR VIA BIOTECNOLÓGICA DE GLICERINA RESIDUAL EM  
BIOMASSA DE LEVEDURAS COMO FONTE DE PROTEÍNAS E LIPÍDIOS**

**Eng<sup>o</sup>. de Alimentos Francisco Roberto da Silva Machado Junior**

Dissertação apresentada para obtenção do  
título de Mestre em Engenharia e Ciência  
de Alimentos.

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

**RIO GRANDE, RS  
2010**

Dedico este trabalho aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela família que tenho e por sempre me proporcionar coisas boas ao longo de minha caminhada, entre elas a oportunidade de estudar.

Aos meus pais, Francisco (Bebeto) e Dilma, pelo exemplo de vida, amor, carinho, esforço e apoio incondicional para minha formação. Obrigado por acreditarem em mim.

Ao meu irmão Gabriel, exemplo de empenho, humildade e competência em tudo que faz.

A minha namorada, Francieli, pelo carinho, amor, compreensão e ajuda em todos os momentos.

Ao meu orientador, André, pela amizade e contribuição nesta etapa da minha formação.

À Elisane e Mariano, não só pela amizade, por si só muito importante, mas pela fundamental participação na realização deste trabalho.

Aos meus amigos Adriano, Belém, Cristiano, Dú, Felipe, Gustavo, Sabrine e Vilásia, pelas conversas, risadas e amizade verdadeira.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, pelos momentos de descontração e agradável companhia.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica, que de uma forma ou de outra contribuíram neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Ciência de Alimentos da FURG e a Prof<sup>a</sup>. Eliana Badiale Furlong, pelo auxílio na determinação do perfil de ácidos graxos.

Aos professores Cátia, Michele e Pinto por aceitarem participar da defesa desta dissertação, enriquecendo este trabalho.

Ao Prof. Jaime Amaya Farfan, do Laboratório de Fontes Protéicas da FEA/UNICAMP, pelo auxílio na determinação do perfil de aminoácidos.

A FURG pela oportunidade de desenvolvimento do trabalho.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste projeto.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1. OBJETIVOS.....	5
1.1.1. Objetivo Geral .....	5
1.1.2. Objetivos Específicos .....	5
<b>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
2.1. Biodiesel .....	7
2.1.1. Mercado do Biodiesel .....	8
2.2. Glicerina.....	9
2.2.1. Mercado Brasileiro de Glicerina.....	10
2.2.2. Perspectivas do Mercado da Glicerina .....	11
2.2.3. Glicerina como Substrato em Cultivos Microbianos.....	11
2.3. Micro-organismos como Fonte Protéica .....	12
2.4. Leveduras como Fonte de Proteínas.....	14
2.5. Micro-organismos como Fonte de Lipídios.....	18
2.6. Leveduras como Fonte de Lipídios.....	19
2.7. <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	20
2.8. Cultivo de <i>Yarrowia lipolytica</i> em Meios à Base de Glicerol.....	21
2.9. Utilização da Biomassa Protéica .....	22
2.10. Utilização de Biomassa Lipídica.....	24
2.11. Cultivos Microbianos .....	24
2.11.1. Generalidades.....	24
2.11.2. Condução de um cultivo microbiano.....	25
2.11.2.1. Cultivo descontínuo .....	25
2.11.2.2. Cultivo semicontínuo .....	26
2.11.2.3. Cultivo contínuo.....	26
2.11.3. Modos de cultivo .....	27
2.11.3.1. Cultivo em estado sólido.....	27
2.11.3.2. Cultivo submerso.....	27

2.12. Biorreatores .....	28
2.12.1. Generalidades.....	28
2.12.2. Classificação dos biorreatores.....	29
2.13. Sistemas de Agitação e Aeração .....	29
<b>CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO .....</b>	<b>31</b>
<b>INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE INÓCULO E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS A PARTIR DA GLICERINA RESIDUAL .....</b>	<b>32</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>33</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
2.1. Micro-organismo .....	35
2.2. Glicerina Residual.....	35
2.3. Preparo do Inóculo.....	35
2.4. Cultivos em Frascos Agitados.....	36
2.5. Métodos Analíticos.....	37
2.5.1. Concentração de biomassa.....	37
2.5.2. pH .....	37
2.6. Análise Estatística dos Resultados.....	37
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NO CULTIVO DE <i>Yarrowia lipolytica</i> NRRL YB-423 EM MEIO À BASE DE GLICERINA RESIDUAL E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA OBTIDA.....</b>	<b>44</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>44</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
2.1. Micro-organismo .....	46
2.2. Glicerina Residual.....	46
2.3. Preparo do Inóculo.....	47
2.4. Cultivos em Biorreator de Bancada.....	47
2.5. Métodos Analíticos.....	49
2.5.1. Concentração de biomassa.....	49
2.5.2. Caracterização físico-química .....	50
2.5.3. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na fase líquida ( $K_{La}$ ).....	51
2.6. Análise Estatística.....	52

<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	52
3.1. Ensaio Preliminares no Biorreator.....	52
3.2. Crescimento Celular.....	53
3.3. Caracterização Físico-Química da Biomassa.....	56
3.3.1. Determinação do perfil de ácidos graxos.....	58
3.3.2. Análise do perfil de aminoácidos.....	61
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63
<b>CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	69
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	70
<b>CAPÍTULO V – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	71
<b>5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	72
<b>CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	73
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	74
<b>APÊNDICE</b> .....	86
<b>ANEXO</b> .....	90

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III

#### DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

#### INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE INÓCULO E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS A PARTIR DA GLICERINA BRUTA

**Tabela 1:** Composições dos meios de propagação do inóculo. .... 36

**Tabela 2:** Biomassas máximas  $\pm$  desvio padrão e análise estatística dos dados. .... 39

#### INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NO CULTIVO DE *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 EM MEIO À BASE DE GLICERINA RESIDUAL E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA OBTIDA

**Tabela 1:** Planejamento experimental  $2^2$  em níveis codificados (valores reais). .... 48

**Tabela 2:** Concentrações de biomassa obtidas nos ensaios preliminares, com e sem controle de pH. .... 53

**Tabela 3:** Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  com valores codificados (reais) e respostas obtidas para o crescimento celular. .... 53

**Tabela 4:** Efeitos das variáveis estudadas sobre a biomassa máxima ( $\text{g.L}^{-1}$ ). .... 55

**Tabela 5:** Comparação entre cultivos de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 conduzidos em biorreator de bancada e em frascos agitados. .... 56

**Tabela 6:** Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  com valores codificados (reais) e respostas obtidas para a composição da biomassa (em base seca). .... 56

**Tabela 7:** Efeitos das variáveis estudadas sobre o conteúdo protéico (%). .... 57

**Tabela 8:** Efeitos das variáveis estudadas sobre o conteúdo lipídico (%). .... 57

**Tabela 9:** Perfil de ácidos graxos detectados (%) da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 cultivada em meio contendo glicerina residual como fonte de carbono. .... 59

**Tabela 10:** Aminoácidos não-essenciais presentes na biomassa de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 cultivada em meio à base de glicerina residual. .... 62

**Tabela 11:** Aminoácidos essenciais presentes na biomassa de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 cultivada em meio à base de glicerina residual e escore químico. .... 62

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

#### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Figura 1.** Molécula de glicerina..... 10

### CAPÍTULO III

#### DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

#### INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE INÓCULO E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS A PARTIR DA GLICERINA BRUTA

**Figura 1.** Cultivos de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 em frascos agitados. .... 37

**Figura 2.** Acompanhamento do crescimento celular da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 no meio A (a) e no meio B (b). .... 38

**Figura 3.** Acompanhamento do pH no meio A (a) e no meio B (b). .... 39

#### INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NO CULTIVO DE *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 EM MEIO À BASE DE GLICERINA RESIDUAL E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA OBTIDA

**Figura 1.** Microscopia da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423. .... 47

**Figura 2.** Biorreator Biostat B (B. Braun Biotech International, Alemanha) com capacidade de 5 L utilizado para o cultivo da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423. .... 48

#### APÊNDICE

**Figura 1.** Curva padrão de biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423. 87

**Figura 2.** Acompanhamento do crescimento celular nos ensaios do planejamento fatorial. .... 87

**Figura 3.** Acompanhamento do pH nos ensaios do planejamento fatorial. .... 88

**Figura 4.** Acompanhamento do oxigênio dissolvido nos ensaios do planejamento fatorial. .... 88

**Figura 5.** Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, cultivada em meio contendo glicerina residual. .... 90

#### ANEXO

**Figura 1.** Laudo analítico da glicerina residual ..... 91

## CONVERSÃO POR VIA BIOTECNOLÓGICA DE GLICERINA RESIDUAL EM BIOMASSA DE LEVEDURAS COMO FONTE DE PROTEÍNAS E LIPÍDIOS

### RESUMO

A crescente demanda de energia em tempos de diminuição no fornecimento de combustível fóssil tem atraído a atenção para a busca por fontes alternativas, que venham a substituir o uso do petróleo, do carvão e do gás natural. Neste contexto, o biodiesel produzido a partir de óleos vegetais aparece como uma alternativa para substituição ao óleo diesel. Esta possibilidade de utilização de combustíveis de origem agrícola vem apresentando um potencial promissor no mundo inteiro, sendo um mercado que cresce aceleradamente devido à sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, principalmente nos grandes centros urbanos, e também servindo como fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do petróleo. A produção de biodiesel a partir dos óleos vegetais fornece um sistema bifásico, sendo uma fase não polar de ésteres de ácidos graxos e outra mais densa constituída por glicerina e outros componentes residuais do processo. Considerando que na produção de biodiesel há geração de aproximadamente 10% de glicerina, com a mistura constituída de 5% de biodiesel ao diesel (B5) estimativas apontam, em 2013, uma geração de cerca de 150 mil toneladas por ano de glicerina. Uma vez que os mercados tradicionais de glicerina não conseguirão absorver esta oferta de produto neste cenário, este trabalho vem contribuir em inovações tecnológicas relacionadas ao aproveitamento da glicerina, mais especificamente na conversão por via biotecnológica da glicerina gerada na síntese de biodiesel em biomassa de interesse comercial, como fonte de nutrientes. Os efeitos da composição do meio de preparo de inóculo e da temperatura de incubação sobre o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB – 423, cultivada em meio à base de glicerina residual, foram estudados em incubadora rotatória, verificando-se que a temperatura de 25°C e utilizando um meio de inóculo com mesma composição do meio de produção foram mais adequados ao crescimento microbiano, atingindo uma concentração de biomassa de 17,7 g.L<sup>-1</sup>. Em biorreator de bancada, um planejamento fatorial para avaliar a aeração e agitação (2<sup>2</sup> ensaios mais 3 pontos centrais) foi realizado. Os ensaios indicaram agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm como a melhor condição de cultivo, atingindo 19,14 g.L<sup>-1</sup> de concentração de biomassa máxima média, conteúdo protéico médio de 13,55% e teor lipídico de 7,87%. Nestas condições, o cultivo em biorreator de bancada, em relação ao cultivo em frascos agitados, levou a incrementos significativos na biomassa máxima, velocidade específica máxima de crescimento celular e produtividade, respectivamente de 1,22, 1,53 e 2,36 vezes. Com base na determinação do perfil de ácidos graxos e aminoácidos, a biomassa mostrou-se fonte promissora de ácidos graxos essenciais, em particular o ácido linoléico (49,16%) e aminoácidos essenciais como isoleucina, valina, treonina e lisina, que apresentaram escores químicos superiores ao padrão FAO/WHO, respectivamente 1,42, 1,42, 1,30 e 1,17. Portanto a biomassa mostrou-se promissora para utilização como fonte de nutrientes, em particular para alimentação animal.

**Palavras-chave:** Biodiesel, Biomassa de leveduras, Glicerina, Perfil de ácidos graxos, Perfil de aminoácidos, *Yarrowia lipolytica*.

# BIOTECHNOLOGY CONVERSION OF RAW GLYCERIN IN YEAST BIOMASS AS A SOURCE OF PROTEINS AND LIPIDS

## ABSTRACT

The crescent demand of energy in times of decreasing in the supply of fossil fuel has been attracting the attention for the search for alternative sources, which will come to substitute the use of the petroleum, coal and natural gas. In this context, the vegetable oils appear as an alternative for substitution to the diesel oil. This possibility of using fuels from agricultural sources has shown a promising potential in the whole world, with a market that is growing rapidly because of its enormous contribution to the environment, with the qualitative and quantitative reduction of the levels of environmental pollution, mainly in the great urban centers, and also serving as strategic source of renewable energy in substitution to the diesel oil and others derived of the petroleum. The production of biodiesel from vegetable oils provides a biphasic system, being a non-polar phase of esters of fatty acids and other more dense consisting of glycerin and other waste components of the process. Considering that in the biodiesel production there is a generation of approximately 10% of glycerin, with the mixture consisting of 5% of biodiesel to diesel (B5) estimates indicate, in 2013, the generation of 150,000 tons per year. Since the traditional markets of glycerin can not absorb this additional supply of product on this scene, this work will contribute in technological innovations related to the use of glycerin, more specifically in the biotechnology conversion of glycerin generated in the synthesis of biodiesel in biomass of commercial interest, as source of nutrients. The effects of temperature and inoculum medium composition on the performance of yeast *Yarrowia lipolytica* NRRL YB – 423, growing on a glycerin-based medium, were studied in shaken flasks, verifying that the temperature of 25°C and the inoculum medium with the same composition of production medium were the most appropriate conditions for microorganism growth, reaching a biomass concentration of 17.7 g.L<sup>-1</sup>. In the bioreactor bench scale, a factorial design involving two variables (2<sup>2</sup> assays plus three central points) was performed, where the studied variables were agitation and aeration. The assays showed agitation of 200 rpm and aeration of 1 vvm as the best culture conditions, reaching a concentration of 19.14 g.L<sup>-1</sup> of biomass with protein content of 13.55% and lipid content of 7.88 %. In these conditions, the cultivation in the bioreactor, in relation to the shaken flasks cultivation, leded to significant increases in the maximum biomass concentration, maximum specific growth rate and productivity, respectively 1.22, 1.53 and 2.36 times. Based on the fatty acid and aminoacid profiles, the biomass showed to be a promising source of essential fatty acids, in particular linoleic acid (49.16%), and essential aminoacids such as isoleucine, valine, threonine and lysine, which presented chemical scores superior than FAO/WHO standard, respectively 1.42, 1.42, 1.30 and 1.17. Therefore biomass showed to be promise for use as a source of nutrients, particularly for animal feed.

**Keywords:** Biodiesel, Yeast biomass, Glycerin, Fatty acids profile, Amino acid profile, *Yarrowia lipolytica*.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda de energia, associada com a expectativa de diminuição das reservas de combustíveis fósseis, tem atraído a atenção para a busca por fontes alternativas, que venham a substituir o uso do petróleo, do carvão e do gás natural. Neste contexto, os óleos vegetais, na figura dos biocombustíveis, aparecem como uma alternativa para substituição ao óleo diesel, sendo o seu uso testado já em fins do século XIX (NASCIMENTO et al., 2001). Biocombustíveis podem ser definidos como os combustíveis produzidos a partir de biomassas agrícolas, portanto sendo renováveis. Além do que, por se tratarem de fontes alternativas de energia, ajudam a diminuir as emissões de gases de efeito estufa, conseqüentemente freando o ritmo das mudanças climáticas globais, que possuem grande impacto negativo sobre a biodiversidade (GAZZONI, 2010).

Dentre os biocombustíveis, o etanol e o biodiesel estão entre as mais promissoras fontes para substituição dos combustíveis de origem fóssil, tanto que para motores do tipo diesel tem sido mundialmente proposto o uso do biodiesel, constituído por uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, obtida a partir de matérias-primas ricas em ácidos graxos, caso dos óleos vegetais e das gorduras animais (SILVA et al., 2009). Esta possibilidade de utilização de combustíveis de origem agrícola vem apresentando um potencial promissor no mundo inteiro, sendo um mercado que cresce aceleradamente devido, em primeiro lugar, à sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, principalmente nos grandes centros urbanos, e em segundo lugar como fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do petróleo (ACCARINI, 2009).

Consagrado na utilização do etanol, em sua matriz energética de combustíveis, o Brasil, agora, tem a oportunidade de ser referência, também, na utilização do biodiesel para substituir o diesel. Existem diversas fontes potenciais de óleos no Brasil para a produção de biodiesel, como os óleos vegetais de soja, mamona, girassol, palma (dendê), a gordura animal e os óleos de peixes (RAMOS, 2003). O Rio Grande do Sul, por ser o terceiro maior produtor de soja no Brasil, provavelmente terá a maior parte de sua produção de biodiesel a partir da soja (PLÁ, 2002).

A produção de biodiesel por transesterificação dos óleos vegetais com álcoois fornece um sistema de duas fases, sendo uma fase não polar de ésteres de ácidos graxos e outra mais densa constituída por glicerina e outros componentes do processo (NOUREDDINI, 1997), que com a produção em larga escala do biodiesel pode se transformar num resíduo.

Considerando que na produção do biodiesel há geração de aproximadamente 10% de glicerina no processo, o acréscimo da disponibilidade de glicerina no mercado brasileiro oriunda das usinas de biodiesel foi da ordem de 100 mil toneladas em 2007, quase 10 vezes acima do que as indústrias químicas ofertam no país anualmente e que tem como destinos principais as indústrias de cosméticos, farmacêutica e de tintas e vernizes. Este acréscimo veio acompanhado de uma redução expressiva (cerca de 48%) das cotações da glicerina no país (BOUÇAS, 2010). Com a mistura constituída de 5% de biodiesel ao diesel (B5), estimativas apontam, em 2013, uma geração de cerca de 150 mil toneladas por ano (BORSCHIVER, 2006). Segundo AMARAL et al. (2009), a indústria do biodiesel converteu o glicerol em uma *commodity* de baixo valor, com crescimento mundial da oferta estimado em 10% para 2010, enquanto que nos seus usos tradicionais estima-se um acréscimo de 3,7%. Uma vez que os mercados tradicionais não conseguirão absorver esta oferta de produto, a busca de alternativas tecnológicas de aproveitamento da glicerina é necessária (BORSCHIVER, 2006).

Estudos recentes revelam ainda que as indústrias produtoras de biodiesel, principalmente os pequenos produtores, não sabem o que fazer com este subproduto, e algumas plantas já estão tendo que diminuir a sua produção por não ter um destino pré-estabelecido para este resíduo (SILVEIRA, 2008).

A conversão da glicerina por via biotecnológica em produtos de importância comercial constitui uma das mais promissoras alternativas para o seu aproveitamento (PAPANIKOLAOU et al., 2008). Uma possibilidade é o uso da glicerina para produção de biomassa de leveduras, que poderia ser aplicada como suplemento na alimentação animal ou humana, agregando valor ao subproduto, contribuindo desta forma para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva.

Nos cultivos microbianos, entretanto, apesar da utilização da glicerina residual (bruta) como fonte de carbono apresentar grande vantagem em relação à glicerina pura, principalmente em termos de custos, na literatura relativamente poucos estudos têm sido propostos usando-a como fonte de carbono na obtenção de bioprodutos. A glicerina residual resultante da síntese do biodiesel usualmente apresenta 55-90% de pureza. O restante consiste de triacilgliceróis não convertidos, metanol ou etanol não convertido, biodiesel, sabões e outros (AMARAL et al., 2009).

No processo de produção de biomassa microbiana, alguns dos aspectos importantes estão ligados à seleção do micro-organismo, o qual pode ser obtido por isolamento ou aquisição junto a Coleções de Cultura, aos substratos importantes do ponto de vista nutricional para o desenvolvimento desses micro-organismos e aos processos que serão utilizados na produção de biomassa (MORAES, 2002).

Outro aspecto que se faz importante é a utilização de linhagens que necessitem curtos tempos de cultivo, ou seja, tenham elevada velocidade específica de crescimento, não produzam pigmentos indesejáveis, tenham reduzida exigência de aeração e que sejam capazes de metabolizar substratos de baixo custo. No caso do uso da biomassa ou seus produtos metabólicos para fins de alimentação, é também importante adotar micro-organismos seguros, certificados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (CRUEGER e CRUEGER, 1993).

Com base no acima exposto, este trabalho vem contribuir em inovações tecnológicas relacionadas ao aproveitamento da glicerina residual gerada na produção do biodiesel.

## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. Objetivo Geral**

Converter por via biotecnológica a glicerina gerada na síntese de biodiesel em biomassa de leveduras para utilização como fonte de nutrientes (proteínas e lipídios).

### **1.1.2. Objetivos Específicos**

- Estudar o efeito da temperatura e do meio de preparo do inóculo sobre a levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB – 423 cultivada em frascos agitados, em meio à base de glicerina residual, em termos de crescimento celular;
- Verificar os efeitos da aeração e agitação em biorreator de bancada com respeito ao crescimento celular, conteúdo protéico e lipídico;
- Caracterizar a biomassa obtida, em termos de perfil de ácidos graxos e perfil de aminoácidos.

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biodiesel

No Brasil, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) define o biocombustível como sendo derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.

Ainda segundo a ANP, biodiesel é o nome de um combustível alternativo de queima limpa, produzido de recursos renováveis. O biodiesel não contém derivados de petróleo, mas pode ser adicionado a ele formando uma mistura, de modo que possa ser usado em um motor de ignição a compressão (diesel) sem necessidade de modificação. O biodiesel é simples de ser usado, biodegradável, não tóxico e essencialmente livre de compostos sulfurados e aromáticos.

Sua fabricação se dá através de um processo químico chamado transesterificação, onde a glicerina é separada da gordura ou do óleo vegetal. O processo gera dois produtos, ésteres (o nome químico do biodiesel) e glicerina (SHUCHRDT et al., 1998).

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

O biodiesel pode ser usado puro ou em mistura com o óleo diesel em qualquer proporção. Tem aplicação singular quando em mistura com o óleo diesel de baixo teor de enxofre, porque confere a este melhores características de lubricidade. É visto como uma alternativa excelente o uso dos ésteres em adição de 5 a 8% ao diesel de petróleo para reconstituir essa lubricidade (LUE et al., 2001).

Mundialmente passou-se a adotar uma nomenclatura bastante apropriada para identificar a concentração do biodiesel na mistura. É o biodiesel BXX, onde XX é a percentagem em volume do biodiesel à mistura. Por exemplo, o B2, B5, B20 e B100 são combustíveis com uma concentração de 2%, 5%, 20% e 100% de biodiesel, respectivamente. No mercado de combustíveis, a experiência de utilização do biodiesel tem se dado em quatro níveis de concentração: puro (B100); misturas (B20 – B30); aditivo (B5); e aditivo de lubricidade (B2) (RAMOS et al., 2000).

As misturas em proporções volumétricas entre 5% e 20% são as mais usuais, sendo que para a mistura B5 não é necessária nenhuma adaptação dos motores. O biodiesel é perfeitamente miscível e físico-quimicamente semelhante ao óleo diesel mineral, podendo ser usado em motores do ciclo diesel sem a necessidade de significantes ou onerosas adaptações (LUE et al., 2001).

No Brasil, o governo lançou em 06 de dezembro de 2004 o marco regulatório que estabeleceu as condições legais para a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira de combustíveis líquidos. A lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, estabelece como obrigatória a adição de um percentual mínimo (5%) de biodiesel ao óleo diesel comercializado junto ao consumidor a partir de 2013, em qualquer parte do território nacional. No entanto, esta mesma lei confere poderes ao Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) para reduzir os prazos de adição de percentual de biodiesel. Assim, de janeiro a junho de 2008 a porcentagem de adição de biodiesel ao óleo diesel passou a ser de 2%. Em julho do mesmo ano, o CNPE elevou para 3% a adição de biodiesel ao diesel mineral, com antecipação da mistura B5 para 2010 (NACHILUK e FREITAS, 2009).

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de biodiesel devido a dois fatores: o uso de álcool como combustível em carros tem longa tradição na cultura brasileira e as condições para cultivo de plantas oleaginosas são favoráveis em diversas áreas (SILVA et al., 2009). Por ser biodegradável, não-tóxico e praticamente livre de enxofre e aromáticos, é considerado um combustível ecológico. Como se trata de uma energia limpa, não poluente, o seu uso num motor diesel convencional resulta, quando comparado com a queima do diesel mineral, numa redução substancial de monóxido de carbono e de hidrocarbonetos não queimados (HAAS, 2001).

### **2.1.1. Mercado do Biodiesel**

As projeções mundiais previstas para 2020 pela *International Energy Agency – IEA* – assinalam crescente substituição das fontes de combustível de origem fóssil pelas fontes renováveis, dentre elas a cana-de-açúcar e o milho para a produção de etanol e os óleos vegetais de canola, de soja, de mamona, entre outros, para a produção de biodiesel (MENANI, 2007).

De acordo com o mesmo autor, os fatores ambientais e a elevação dos preços do petróleo favorecem a expansão do mercado de produtos combustíveis derivados da biomassa no mundo todo, predominando o etanol, para uso em automóveis, e biodiesel para caminhões, ônibus, tratores, transportes marítimos, aquaviários e em

motores estacionários para a produção de energia elétrica, nos quais o óleo diesel é o combustível mais utilizado.

Países que integram a União Europeia e os Estados Unidos já produzem e utilizam o biodiesel comercialmente. Outros países, tais como Argentina, Austrália, Canadá, Filipinas, Japão, Índia, Malásia e Taiwan, também apresentam significativos esforços para o desenvolvimento de suas indústrias, estimulando o uso e a produção do biodiesel, assim como no Brasil. A União Europeia e os Estados Unidos são detentores das maiores capacidades de produção no mundo. A União Europeia produz biodiesel em escala industrial desde 1992. Em 2006 contava com 120 plantas industriais com uma produção de 6.069 bilhões de toneladas métricas ou equivalente a 6.894 bilhões de m<sup>3</sup> (RAMOS, 2008).

Segundo o mesmo autor, essas plantas estão localizadas na Alemanha, na França, na Itália, na Áustria e na Suécia, sendo a Alemanha o país com maior concentração de usinas. Em 2006, a Alemanha foi responsável por 44% da produção de biodiesel da União Europeia, seguida da Itália com 14% e da França com 13%. A principal matéria-prima utilizada para o processamento de biodiesel europeu é a colza (canola), e em menores proporções os óleos de soja, de palma e de girassol. Outro importante produtor de biodiesel são os Estados Unidos da América, com 105 plantas industriais operando com produção de 864 milhões de galões, equivalente a cerca de 3.272,8 bilhões de m<sup>3</sup>. A produção de biodiesel nos Estados Unidos é realizada principalmente com o óleo de soja, e em menor proporção com óleos variados e reciclagem de óleos de fritura.

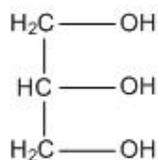
Ainda segundo a fonte, todos os países relacionados dispõem de programas que estimulam o uso e a produção do biodiesel. Os programas, em geral, tratam sobre medidas de apoio à implantação das indústrias, subsídios para os agricultores, isenção de impostos e percentuais escalonados para a mistura do biodiesel ao óleo diesel variando de 2% a 30%. Somente a Alemanha oferta o biodiesel B100, para o consumidor definir o seu uso puro ou na proporção que lhe convém, distribuído em pelo menos 10% dos 16.000 (2003) postos de abastecimento de combustível.

No Brasil, a produção de biodiesel foi de 1,16 milhão de m<sup>3</sup> e, com a antecipação pelo CNPE da adição de 5% de biodiesel ao óleo diesel, a partir de 2010, o consumo estimado de biodiesel passou a ser de 2,24 milhões m<sup>3</sup> ao ano (NACHILUK e FREITAS, 2009).

## **2.2. Glicerina**

Glicerina é um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico. O termo glicerina ou glicerol são usados alternadamente na literatura, mas seu nome oficial pela *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* é propano-1,2,3-triol (RAMOS, 2008).

Sua molécula pode ser representada por:



**Figura 1.** Molécula de glicerina (ABIQUIM, 2008).

A glicerina tem três grupos hidroxílicos hidrofílicos que são responsáveis por sua solubilidade em água. É higroscópica; seu ponto de fusão é 17,8°C; evapora com decomposição a 290°C; é miscível com água e etanol. Glicerina pode ser queimada, mas a não ser que seja queimada a altas temperaturas, libera vapores tóxicos de acroleína, que são formados principalmente entre 200 e 300°C (ABIQUIM, 2008).

Por ser não-tóxica, não-irritante, sem cheiro e sabor, a glicerina tem sido aplicada como emoliente e umectante em pastas de dente, cremes de pele, loções pós-barba, desodorantes, batons e maquiagens. A glicerina pode ser usada como umectante e para conservar bebidas e alimentos tais como refrigerantes, balas, bolos, pastas de queijo e carne, ração animal seca (SILVEIRA, 2008). Na indústria têxtil é utilizada para amaciar e flexibilizar as fibras, bem como na indústria de tintas é utilizada para a produção de resinas ou como reticulante (FAIRBANKS, 2009).

### **2.2.1. Mercado Brasileiro de Glicerina**

A glicerina é produzida por via química ou fermentativa. Tem uma centena de usos, principalmente na indústria química e de alimentos, e seus processos de produção são de baixa complexidade tecnológica (RAMOS, 2008).

De acordo com BOUÇAS (2010), o preço médio da glicerina, que em 2005 chegou a R\$ 3 o quilo, em 2007 ficou entre R\$ 1,60 e R\$ 1,70. Nas regiões onde usinas de biodiesel operam, o valor médio caiu para R\$ 0,60 a R\$ 0,70 o quilo. Em 2007, de acordo com levantamento da Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUIM), a capacidade de produção das indústrias químicas era de 35,8 mil toneladas ao ano, mas a produção situava-se em torno de 12,9 mil, para um consumo

anual de 13,5 mil toneladas. Desse volume, 48,9% eram destinados à produção de cosméticos. Outros 14,5% eram utilizados pela indústria farmacêutica, 11,9% pelo setor de tintas e vernizes e o restante para outros segmentos.

### **2.2.2. Perspectivas do Mercado da Glicerina**

O acréscimo da disponibilidade de glicerina no mercado brasileiro, oriunda das usinas de biodiesel, foi da ordem de 100 mil toneladas em 2007, quase 10 vezes acima do que as indústrias químicas ofertam no país anualmente, e que tem como destinos principais a indústria de cosméticos, farmacêutica e de tintas e vernizes. Este acréscimo veio acompanhado de uma redução expressiva (cerca de 48%) das cotações da glicerina no país (BOUÇAS, 2010). Com a mistura constituída de 5% de biodiesel ao diesel (B5), estimativas apontam, em 2013, uma geração de cerca de 150 mil toneladas por ano (BORSCHIVER, 2006). Segundo AMARAL et al. (2009) a indústria do biodiesel converteu o glicerol em uma *commodity* de baixo valor, com crescimento mundial da oferta estimado em 10% para 2010, enquanto que nos seus usos tradicionais estima-se um acréscimo de 3,7%.

Os excedentes mundiais de glicerina derivada do biodiesel de (cerca de 0,8 a 1,0 milhão de toneladas ao ano) poderão levar a grandes reduções no preço, eliminando parte da produção de glicerina de outras fontes. Com as reduções substanciais de preço, a glicerina deverá também entrar no mercado de outros polióis, em particular o sorbitol. No entanto, buscam-se novas aplicações de grandes volumes para glicerina no mundo, e isto provavelmente se dará nos intermediários para plásticos, como o 1,3 propanediol, na indústria de cosméticos e alimentos, contudo não são soluções de curto prazo (PAPANIKOLAOU et al., 2007).

### **2.2.3. Glicerina como Substrato em Cultivos Microbianos**

A glicerina é o principal subproduto obtido durante a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais (SOLOMON et al., 1995, citados por SILVA et al., 2009). Ela encontra-se abundante na natureza, presente em componentes estruturais de alguns lipídios. Vários micro-organismos podem utilizar naturalmente este subproduto como única fonte de carbono, e em função disto, têm atraído a atenção para o uso potencial na bioconversão de glicerina, produzida a partir do biodiesel, em processos nos quais pode ser utilizada como substituto aos tradicionais carboidratos, como glicose, sacarose e amido, em vários cultivos microbianos (SILVA et al., 2009). No entanto, apesar da utilização de glicerina residual como fonte de carbono em meios de

cultivo apresentar grande vantagem em relação à glicerina pura, principalmente em termos de custos, na literatura relativamente poucos estudos têm sido mencionados quando se trata de usá-la como fonte de carbono.

É significativo salientar que a glicerina é assimilada por algumas leveduras, como as do gênero *Candida* e *Saccharomyces* e pela bactéria *Clostridium pasteurianum* (ARRUDA et al., 2006). De acordo com BABEL et al. (1982), cinquenta cepas de leveduras dos gêneros *Candida*, *Lodderomyces*, *Endomycopsis*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* e *Torulopsis* foram investigadas com respeito à sua capacidade de crescer em metanol, glicerol e glicose como únicas fontes de carbono e energia.

A glicerina tem sido utilizada como substrato alternativo por vários micro-organismos para produção de metabólitos de interesse comercial, tais como 1,3 propanediol por *Clostridium butyricum* (PAPANIKOLAOU et al., 2008), e proteínas intracelulares e extracelulares por *Pichia pastoris* (GHOSALKAR et al., 2008). Os micro-organismos *Yarrowia lipolytica* (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002; PAPANIKOLAOU et al., 2008) e *Mortierella isabellina* (PAPANIKOLAOU et al., 2008) são citados como produtores de lipídios a partir de glicerol. Também ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, têm sido produzidos por linhagens microbianas usando glicerol como substrato (IMANDI et al., 2007; LEVINSON et al., 2007).

De acordo com BORZANI (2007), estudos sobre a utilização do glicerol como matéria prima de processos biotecnológicos têm mostrado que micro-organismos dos gêneros *Candida*, *Rhizobium*, *Trichoderma*, *Hanseniospora*, *Kloeckera*, *Rhodotorula* e *Klebsiella* podem utilizar glicerina como fonte de carbono visando à produção de ácidos orgânicos, antibióticos, aminoácidos, alcoóis, frutose e polissacarídeos extracelulares.

### **2.3. Micro-organismos como Fonte Protéica**

As constantes elevações que sofrem os preços de grãos de cereais e suplementos protéicos vegetais, utilizados na alimentação de animais, têm despertado um grande interesse pelo aproveitamento de alimentos conhecidos como não convencionais. Dentre os produtos que podem substituir os suplementos protéicos convencionais na alimentação animal destacam-se os micro-organismos (algas, bactérias, leveduras e fungos), considerados fonte de proteína unicelular (ROEPCKE, 2007).

De acordo com COZZOLINO (1982), os fatores preponderantes para o crescente interesse na utilização destes micro-organismos como fonte não

convencional de proteína estão baseados na particularidade de possuírem elevada velocidade de crescimento, de utilizar os mais diferentes tipos de substrato, podendo ser controlados em laboratório, tornando-se, desta forma, independentes de fatores ambientais ou climáticos, além de possuírem um alto teor de proteínas e vitaminas.

Esta situação tem criado a necessidade de incrementos na formulação de fontes de proteína alternativas e inovadoras (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000). Entre elas, as que se referem ao desenvolvimento de micro-organismos como fontes potenciais de proteína estão em evidência. Neste sentido, microalgas, bactérias, leveduras e fungos têm sido estudados por apresentarem vantagens como:

- Os micro-organismos têm um tempo de geração curto, o que propicia um rápido aumento de massa celular. As algas e os fungos dobram sua população em períodos que vão de 2 a 6 e 4 a 12 h, respectivamente, enquanto as bactérias e as leveduras, sob condições ideais de desenvolvimento, realizam esse aumento populacional em 1/2 a 2 e de 1 a 3 h, respectivamente;

- O conteúdo em proteína dos micro-organismos é geralmente mais elevado do que o da maioria das outras fontes de proteína;

- A produção de micro-organismos como fonte de proteína pode ser obtida de uma grande gama de substratos, até mesmo resíduos industriais, o que torna viável sua produção em diferentes regiões;

- A produção de proteína microbiana pode ser executada em ambientes com condições controladas, independente de condições climáticas, exigindo pequena disponibilidade de água e de espaço (LIMA e SATO, 2001).

De acordo com os autores, os micro-organismos foram introduzidos na alimentação humana há milênios, desde quando começaram a surgir os primeiros processamentos de bebidas alcoólicas, queijos e panificação. Entretanto, a utilização de micro-organismos tem por meta principal suprir a carência de proteínas, embora em alguns casos os lipídios e as vitaminas sejam complementos valiosos do valor nutritivo.

Dentre os micro-organismos utilizados na alimentação, tanto animal quanto humana, destacam-se alguns gêneros e espécies de bactérias, algas, leveduras e fungos, pois eles têm a capacidade de poder substituir os suplementos protéicos convencionais usados na alimentação por apresentarem elevado teor protéico, alta velocidade de crescimento e possibilidade de cultivo em diversos tipos de substratos (COZZOLINO, 1982).

Através da utilização de material orgânico com pouco conteúdo protéico, os micro-organismos têm a habilidade de poder transformá-lo em alimento com elevado teor de proteínas, e isto tem sido explorado pela indústria. Tal condição foi utilizada na

Alemanha durante a Primeira Guerra Mundial, quando o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* foi explorado para consumo humano, e hoje, o uso de substratos de baixo custo e resíduos de produtos industriais para cultivo de micro-organismos parece ser uma tendência geral nos estudos aplicados (GREWAL et al., 1990; OSHO, 1995; citados por HAIDER et al., 2005).

Deste modo, pode-se dizer que proteínas de organismos unicelulares são proteínas extraídas de cultivos microbianos, podendo utilizar como substratos resíduos agrícolas e industriais disponíveis, onde a produção de biomassa microbiana é realizada por processo submerso ou em estado sólido. As biomassas microbianas, em geral, são particularmente ricas em vitaminas do complexo B e em proteínas contendo aminoácidos essenciais, de modo que constituem uma potencial fonte de enriquecimento e fortificação de dietas deficientes (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

Aproximadamente um quinto do nitrogênio contido na biomassa de leveduras é caracterizado como não protéico. A expressão conteúdo protéico inclui todos os compostos nitrogenados e é determinado geralmente pela multiplicação do índice de nitrogênio por 6,25 (MACRAE et al., 1942).

#### **2.4. Leveduras como Fonte de Proteínas**

A segurança do uso de produtos de origem microbiana para alimentação animal e humana depende da seleção dos micro-organismos, do substrato, do processo, e das características do micro-organismo. Os pré-requisitos para a aprovação de proteínas com fins alimentares podem ser classificados conforme a sua finalidade. Se a proteína for utilizada na alimentação animal, deve-se comprovar a segurança da espécie utilizada, dos substratos, dos produtos e o valor nutricional adequado. Para o consumo humano, é preciso observar todos os pontos acima especificados, além da ausência de mutagenicidade, teratogenicidade, alergenicidade, características organolépticas ou funcionais e aceitabilidade cultural (ROEPCKE, 2007).

Segundo BORZANI et al. (1975), as leveduras qualificadas como alimento humano devem ter certas características de sabor, aroma, cor, pureza microbiana, composição química, conteúdo vitamínico e atender às especificações das seguintes entidades oficiais: *IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)*, *FDA (Food and Drug Administration)* e *APA (American Psychotherapy Association)*.

Com a denominação de levedura alimentar, um considerável volume de leveduras, propagadas em diferentes substratos, é comercializado como fonte de proteínas e de vitaminas do complexo B, para suplementação de alimentos humanos

ou rações (BORZANI et al., 1975). Do ponto de vista tecnológico, as leveduras possuem vantagens em relação a outros micro-organismos, principalmente em razão da sua capacidade de assimilar grande variedade de substratos, de sua alta velocidade de crescimento e da facilidade de separação de sua biomassa. Esta situação, associada ao aumento da população mundial e por consequência da demanda por produção de alimentos, tem criado uma necessidade de desenvolvimento na formulação de fontes alternativas e inovadoras de alimentos protéicos (ICIDCA, 1999, citado por ROEPCKE, 2007).

Neste sentido, as leveduras foram os primeiros micro-organismos utilizados na produção de proteínas e são os que receberam maior atenção de estudos. Também são aqueles com maior aceitação pelos consumidores, devido principalmente ao fato de que raramente são tóxicas ou patogênicas. Elas são constituídas de proteínas, carboidratos, matéria graxa, sais minerais e contêm vitaminas, cujas proporções variam com a cepa e com o meio ambiente. A variação das condições de nutrição, da natureza do substrato, da reação do meio, ocorrência de aeração, lavagens e outros fatores, influenciam a composição do micro-organismo (LIMA e SATO, 2001).

Alguns gêneros como *Candida* e *Saccharomyces spp.* têm sido empregadas desde a Primeira Guerra Mundial como produtores de proteína microbiana, convertendo resíduos agroindustriais, efluentes de indústria de azeite de oliva e de papel, em suplemento protéico de alto valor para alimentação animal (ZHENG et al., 2005).

Entretanto, a produção de biomassa protéica ainda não obteve o aguardado sucesso devido a razões econômicas, políticas e psicológicas, mas espera-se que a produção de biomassa como fonte de proteínas seja capaz de diminuir a demanda mundial de proteína, ajudando a resolver o problema da fome no futuro (MORAES, 2002).

Apesar de seu teor de proteínas não exceder 60%, sua concentração de aminoácidos essenciais, como lisina, triptofano e treonina, é satisfatória. Além disso, possuem pequenas quantidades de aminoácidos sulfurados, como a metionina e a cisteína. Outra vantagem das leveduras deve-se ao fato de elas serem maiores que as bactérias, facilitando sua separação, e de poderem ser utilizadas em seu estado natural. Leveduras certificadas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) podem ser usadas na alimentação humana e animal, sob diversas formas e para diversas finalidades. As leveduras são reconhecidas mundialmente como excelentes fontes de proteínas, vitaminas do complexo B, minerais essenciais e fibra dietética. A levedura inativada, pela ação do calor, é usada como fonte de nutrientes em alimentação

animal e humana, tanto na forma de levedura íntegra ou de derivados de levedura (DZIEZAK, 1987, citado por VILELA et al., 2000).

Segundo BELLUCO (2008), a composição da levedura varia em função de fatores como o substrato em que é cultivada, a espécie de levedura, o método de cultivo, o modo e as condições de secagem e a idade das células.

O fator nutricional mais atrativo das leveduras é o conteúdo protéico. A proteína bruta é constituída principalmente de aminoácidos. Estes representam perto de 80% da composição, os ácidos nucléicos em torno de 12% e a amônia cerca de 8%. Aminoácidos livres e outros compostos, como enzimas, coenzimas, glutátion, lecitina e ácido adenílico, correspondem a uma fração de 7% do nitrogênio total (AQUARONE et al., 2001).

A membrana celular de leveduras é formada por três camadas: uma intermediária constituída por lipídios e fosfolipídios, e outras duas formadas por proteínas. Estas duas últimas intervêm na entrada e saída de solutos e nas reações enzimáticas. Somente a água difunde-se passivamente, para os outros solutos ocorre uma difusão facilitada ou um transporte ativo (BOURGEOIS e LARPENT, 1995, citados por ROEPCKE, 2007).

Ainda segundo o autor, a parede celular é formada por uma camada externa principalmente de manoproteínas, por uma camada intermediária de glucana, podendo esta ser subdividida em uma subcamada de  $\beta$ -glucana solúvel em álcali e outra subcamada de  $\beta$ -glucana insolúvel em álcali, e por uma camada interna, que é composta por manoproteína e outros tipos de proteína, incluindo enzimas como a invertase, fosfatase ácida,  $\beta$ -glicosidase e protease.

Segundo FURUYA et al. (2000), ainda que os níveis das vitaminas A e C sejam reduzidos, as leveduras são ricas em vitaminas do complexo B, destacando-se os níveis de tiamina, riboflavina, niacina e ácido pantotênico. Portanto, esse alimento constitui-se em importante ingrediente como suplemento vitamínico, sendo que estudos têm demonstrado que as vitaminas das leveduras, em quantidade equivalente, possuem efeitos superiores aos obtidos com as vitaminas sintéticas.

Alguns fatores ambientais influenciam na produção de proteínas, tais como o pH, transferência de oxigênio e temperatura. O uso conveniente da biomassa protéica em alimentos a partir de qualquer fonte está baseado na sua composição. Os nutrientes, vitaminas, nitrogênio, carboidratos, óleos, componentes da parede celular, ácidos nucléicos, concentração de proteínas e perfil de aminoácidos são analisados para que o produto possa ser utilizado como alimento ou como suplemento alimentício (ANUPAMA e RAVINDRA, 2000).

A vantagem do uso de leveduras sobre os bolores está na capacidade destas em suportar grandes concentrações de substrato, taxa de conversão mais rápida (produtividade mais elevada devido ao término do cultivo se dar em metade do tempo de cultivo de bolores) (MATTEY, 1992, citado por ARMILIATO, 2004).

A seleção de um micro-organismo apropriado para um produto específico é assunto de considerável importância. As características de um micro-organismo escolhido refletem, até certo ponto, os parâmetros de processo de manufatura (BORZANI et al., 1975). No processo de produção de biomassa microbiana, os aspectos que devem ser observados dizem respeito à seleção do micro-organismo, o qual pode ser obtido por isolamento ou aquisição junto a Coleções de Cultura, aos substratos nutricionalmente importantes para o desenvolvimento desses micro-organismos e aos processos que serão utilizados na produção e recuperação de biomassa (MORAES, 2002).

Segundo CRUEGER e CRUEGER (1993), é desejável a utilização de linhagens que demandem curtos tempos de cultivo, ou seja, tenham elevada velocidade específica de crescimento, não produzam pigmentos indesejáveis, tenham exigência de aeração reduzida, formação de espuma decrescente durante o processo e que sejam capazes de metabolizar substratos de baixo custo. No caso do uso da biomassa ou seus produtos metabólicos para fins de alimentação, é também importante adotar micro-organismos seguros, certificados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*).

O micro-organismo ideal para a produção de proteína de organismos unicelulares deve possuir uma série de características tecnológicas, entre elas: alta taxa de crescimento específico e rendimento de biomassa; alta afinidade pelo substrato; poucas necessidades nutricionais; habilidade em desenvolver alta densidade celular; uma composição balanceada de proteínas e lipídios e baixo teor de ácidos nucléicos; boa digestibilidade e atoxicidade (ROEPCKE, 2007).

O valor comercial de proteínas de organismos unicelulares está diretamente relacionado ao conteúdo protéico. Com isso, *Saccharomyces cerevisiae* e algumas poucas leveduras como *Candida utilis* são classificadas entre os micro-organismos mais interessantes quanto ao seu conteúdo protéico, o qual apresenta acima de 50% de massa seca (LEE e KIM, 2001).

A produção de biomassa de leveduras como fonte de proteínas tem grande potencial econômico, principalmente considerando-se que pode substituir as tradicionais fontes de proteína utilizadas em rações animais, que apresentam um custo mais elevado. Tal biomassa caracteriza-se por poder apresentar elevado teor protéico, sendo mencionado, por exemplo, para *Candida utilis*, até 59,8% de proteína em

relação ao peso seco utilizando-se glicose como fonte de carbono, além de conter aminoácidos essenciais e vitaminas (GÉLINAS e BARRETTE, 2007).

Quanto à utilização de glicerina como fonte de carbono na produção de biomassa, TRÍBOLI et al. (1994), utilizando meio de cultivo sintético contendo glicerol p.a como principal fonte de carbono, durante o cultivo de *Candida utilis*, obtiveram uma produção de 480 g de levedura seca por kg de glicerol consumido.

Segundo BORZANI (2007), uma produção de 100 mil toneladas por ano de biodiesel poderia conduzir à produção de algo em torno de 7 toneladas de proteína por dia, considerando o rendimento em biomassa de *Candida utilis* obtido por TRÍBOLI et al., (1994). Além disso, a biomassa de leveduras contém lipídios, vitaminas, minerais e outros componentes que também são importantes na formulação de rações (LEE e KIM, 2001).

DALMAU et al. (2000) verificaram que uma linhagem de *Candida rugosa* foi capaz de se desenvolver em meio contendo glicerol como fonte de carbono, de modo que para a concentração de glicerol de 2 g.L<sup>-1</sup> foram produzidas 1,25 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, sendo que com glicose como fonte de carbono foi obtido 0,97 g.L<sup>-1</sup> de biomassa.

## 2.5. Micro-organismos como Fonte de Lipídios

A capacidade dos micro-organismos de sintetizarem lipídios é conhecida desde o primeiro quarto do século XIX. As primeiras tentativas de utilização industrial desse potencial datam da Primeira Guerra Mundial, na Alemanha, e foram repetidas durante o segundo conflito mundial do século XX, terminado em 1945. Após a guerra, a produção de matéria graxa por via microbiana continuou a merecer a atenção dos pesquisadores (LIMA e SATO, 2001).

Pesquisadores têm estudado a síntese de gorduras por via microbiana, com grande parte deles voltados para a possibilidade de obter alternativas para a carência de alimentos e para produção de energia. Além dessas perspectivas, a biotecnologia de lipídios acena com outros usos industriais como obtenção de biossurfactantes e modificações dos óleos comestíveis por lipases microbianas (PAPANIKOLAOU et al., 2008).

Como produtores de lipídios, os micro-organismos oferecem algumas vantagens potenciais em relação aos animais e vegetais, tais como:

- Grande rapidez de geração;
- Menor área de produção;
- Melhor controle da produção e do produto.

De acordo com LIMA e SATO (2001), não são todos os micro-organismos que acumulam lipídios de forma substancial. Poucas bactérias oferecem possibilidades de produção econômica. Os organismos mais promissores são as leveduras e os bolores. Também as algas, primeiramente cultivadas em locais de condições climáticas adequadas, mas que podem ser produzidas, sob condições controladas, em qualquer região independente de suas condições climáticas, são consideradas boa fonte de lipídios.

## **2.6. Leveduras como Fonte de Lipídios**

Os micro-organismos oleaginosos apresentam um grande potencial industrial devido à sua capacidade em estocar lipídios com propriedades e composição muitas vezes similares a produtos de origem animal e vegetal, bem como permitindo a valorização de co-produtos agroindustriais (PAPANIKOLAOU et al., 2008). São consideradas leveduras oleaginosas aquelas que contem ao menos 20% de seu peso seco de lipídios (RATLEDGE, 2004), acumulando-os não somente como constituintes da membrana, mas também na forma de triacilgliceróis. As mais conhecidas espécies de leveduras oleaginosas incluem *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Yarrowia* (BEOPOULOS et al., 2009).

O conteúdo em lipídios e o perfil de ácidos graxos variam de acordo com a espécie (BEOPOULOS et al., 2009) e de acordo com a fonte de carbono (EASTERLING et al., 2009). PAPANIKOLAOU et al. (2001) produziram biomassa de *Yarrowia lipolytica* com lipídios de composição similar à manteiga de cacau utilizando como substrato gorduras industriais. Utilizando glicerol como fonte de carbono, PAPANIKOLAOU e AGGELIS (2002) produziram biomassa com 43% de lipídios (base seca), contendo 47% de ácido oléico e 21% de ácido linoléico.

O acúmulo de lipídios é favorecido em condições de limitação de nitrogênio (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002). MEESTERS et al. (1996) comentam que as leveduras oleaginosas têm a habilidade de crescer e acumular lipídios tendo glicerol como fonte de carbono, com mínimos requerimentos nutricionais. Por outro lado, a composição do meio influi na composição dos ácidos graxos (ATHENSTAEDT et al., 2006). As fontes de carbono, nitrogênio, íons metálicos, temperatura e pH são fatores que podem afetar a sua composição. Isto implica que a composição dos lipídios pode ser manipulada, resultando em elevadas porcentagens dos ácidos graxos de interesse (DYAL e NARINE, 2005).

## 2.7. *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* é um fungo hemiascomiceto, pertencente à família *Dipodascaceae*. É uma espécie das chamadas leveduras não-convencionais, cuja pesquisa científica e tecnológica está em plena ascensão. Consiste em um interessante objeto de estudo para a pesquisa básica devido às várias lacunas existentes no conhecimento de seu metabolismo, diferentemente do que ocorre com as leveduras convencionais *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Paralelamente, seu estudo também tem atraído grande interesse na área biotecnológica por possuir a capacidade de excretar diversos metabólitos em grande quantidade, como ácidos orgânicos e proteínas extracelulares, sendo muito usada para superexpressão e secreção de proteínas específicas (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

DUJON et al. (2004) realizaram a comparação e o seqüenciamento completo de quatro hemiascomicetos: *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica*. Eles foram selecionados com base em suas posições filogenéticas, ou como leveduras de importância industrial ou ambiental. Foi visto que *Yarrowia lipolytica* difere das leveduras convencionais, como *S. cerevisiae* e *Sch. pombe*, no que diz respeito à sua evolução genética e sua fisiologia.

*Yarrowia lipolytica* tem como nicho substratos ricos em lipídios e proteínas, mas a grande maioria das cepas foi isolada do solo, de rede de tratamento de esgoto e de ambientes contaminados com óleos. Apresenta vigoroso crescimento em diferentes valores de pH e apesar de ter crescimento ótimo a 30°C, também é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura entre 5 e 32°C (BARTH e GAILLARDIN, 1997). Produz lipase, enzima que apresenta grande interesse para o uso em indústria de couro ou de queijos (German Patent DD-272867). É uma levedura capaz de produzir e excretar no meio uma ampla variedade de ácidos orgânicos incluindo o citrato (FINOGENOVA et al., 2002).

*Yarrowia lipolytica* é um fungo dimórfico, originalmente classificado como *Candida lipolytica*. Pode ser encontrada na natureza sob três diferentes morfologias: levedura, pseudo-hifa (cadeia de células alongadas com constrições visíveis posicionando o septo) e hifa (filamentos lineares sem constrições visíveis). Seu micélio é formado por uma hifa de 3 a 5 µm de largura e alguns µm de comprimento. Células apicais podem exceder 100 µm de comprimento enquanto os segmentos podem ser de 50 a 70 µm. Os septos mostram um poro central incomum para outras leveduras, com o retículo endoplasmático estendendo-se de um segmento ao seguinte (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

A proporção de morfologias encontrada na cultura depende da cepa utilizada. Certas condições são conhecidas por causar uma formação preferencial de células, ou induzir o desenvolvimento de micélios. PEREZ-CAMPO e DOMÍNGUEZ (2001) observaram que a transição levedura-hifa em meio líquido foi obtida utilizando 1% de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) ou 4% de Albumina de Soro Bovino (SAB) como fonte de carbono. Além disso, a SAB também foi capaz de induzir um crescimento invasivo em meio sólido. SZABO e ŠTOFANÍKOVÁ (2002), utilizando 0,05% de amônio e 5% de peptona como fontes de nitrogênio no meio de cultivo, demonstraram que estes são fortes indutores de hifa, tanto em meio líquido quanto sólido. RUIZ-HERRERA e SENTANDREU (2002) observaram que o estresse anaeróbico também é capaz de induzir a formação de hifa, assim como fontes de carbono (1% de glicerol) e nitrogênio (0,5% de amônio e glutamina). KAWASSE et al. (2003) observaram aumento significativo tanto na formação de hifas como no comprimento destas em *Yarrowia lipolytica* submetidas a estresse térmico e oxidativo.

## **2.8. Cultivo de *Yarrowia lipolytica* em Meios à Base de Glicerol**

A maioria dos trabalhos de pesquisa trata da valorização do glicerol por meios biotecnológicos referentes à sua biotransformação em 1,3-propanediol por muitas cepas de bactérias, geralmente dos gêneros *Clostridium*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. Ao contrário, o número de pesquisas tratando da utilização de glicerol como fonte de carbono por várias leveduras ou fungos é restrito (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002).

*Yarrowia lipolytica*, bem como o fungo *Aspergillus niger*, são considerados potenciais produtores de ácido cítrico (ROUKAS et al., 1997). Segundo ROEHR et al. (1996), enquanto *Aspergillus niger* é o principal organismo usado para a produção de ácido cítrico, muitas leveduras, inclusive a *Yarrowia lipolytica*, são conhecidas por produzirem altos rendimentos de ácido cítrico.

A produção de ácido cítrico utilizando glicerina como fonte de carbono tem sido objeto de recentes estudos, em que leveduras do gênero *Yarrowia* aparecem como potenciais produtores (IMANDI et al., 2007; LEVINSON et al., 2007; PAPANIKOLAOU et al., 2008).

FINOGENOVA et al. (2005) apontam que conversões de glicerol para produtos com valor agregado são sem dúvida de grande interesse, devido à obtenção de glicerol como um subproduto gerado na produção de biodiesel, e que embora a produção de ácido cítrico a partir do glicerol por meio de leveduras seja conhecida há

muitos anos, poucos estudos estão sendo desenvolvidos atualmente de acordo com a literatura revisada.

De acordo com ROEHR et al. (1996) e KAMZOLOVA et al. (2003) a *Yarrowia lipolytica*, quando desenvolvida sob limitadas condições de nutrientes, pode produzir ácido cítrico de uma variedade de fontes de carbono, inclusive açúcares, alcanos, óleos de planta, amido hidrolisado, etanol e glicerol.

Nesta mesma linha, LEE et al. (2007) apontam que glicerol e glicose foram utilizados eficazmente como as mais eficientes fontes de carbono, juntamente com uma combinação de extrato de levedura e peptona como uma boa fonte de nitrogênio, para a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, indicando que o micro-organismo apresenta um bom potencial industrial como um novo produtor de lipase alcalina.

Entretanto, apenas algumas espécies de *Yarrowia lipolytica* têm sido relatadas por acumular quantidades significantes de lipídios, quando submetidas a crescimento em meio com condições nitrogênio limitantes (PAPANIKOLAOU et al., 2002 (a)).

Por sua vez, KIM et al. (2000) indicam que uma alta concentração de glicerol é o primeiro requisito para se obter uma elevada concentração celular de *Yarrowia lipolytica* em um cultivo microbiano satisfatório.

## **2.9. Utilização da Biomassa Protéica**

No Brasil, cerca de 50% do mercado das leveduras é destinado principalmente para alimentação de aves, seguido pelos suínos com 25%, ruminantes e outros com 15%. Já no exterior, o grande mercado das leveduras é o sudeste asiático, destacando-se principalmente Japão, em seguida Austrália e Nova Zelândia, seguidos pela Europa, Estados Unidos e América Latina, sendo o mercado de suínos, aqüicultura e animais domésticos os que apresentam uma maior demanda (GHIRALDINI e ROSSEL, 1997, citados por BELLUCO, 2008).

Do ponto de vista biológico, alguns experimentos foram realizados com animais e humanos, avaliando-se nutricionalmente a proteína da biomassa. Os animais utilizados foram aves domésticas, ratos, cachorros, porcos, coelhos, vacas, macacos e peixes de lagos, de modo que se pôde concluir, através dos resultados obtidos, que esta fonte alimentar produzia bons efeitos, quando utilizada em substituição a parte da proteína da ração (COZZOLINO, 1982).

Desta forma se torna interessante a utilização de levedura como um suplemento nutricional para animais e humanos, principalmente com acréscimo de micronutrientes em sua composição. A utilização deste suplemento nutricional pode ser realizada de diversas formas, como mistura de rações para animais e também,

através de *pellets*, comprimidos, e até entrar na composição de pratos cozidos ou salpicados em iguarias na forma de pó. Também poderia ser adicionado em produtos alimentares como sopas desidratadas, pães, patês, biscoitos, chocolates, massas alimentares, no estado sólido ou pastoso (BELLUCO, 2008).

Na literatura, tanto nacional como internacional, estudos têm sido conduzidos a fim de viabilizar a utilização de subprodutos agroindustriais na alimentação animal. O aumento na busca por alimentos não convencionais tem se dado devido, principalmente, às frequentes altas nos preços dos grãos de cereais e fontes protéicas vegetais. Dentro deste contexto, a proteína de origem microbiana mostra-se como uma alternativa viável à substituição dos componentes básicos que compõem as rações (MAIA et al., 2001).

Além das leveduras, microalgas e bactérias são fontes potenciais não convencionais na alimentação de peixes, não somente devido ao valor nutricional de seus compostos, mas também por possuir pigmentos e carboidratos complexos, como as glucanas. Acredita-se também que leveduras como *Candida* sp. e *Saccharomyces cerevisiae* possuam propriedades estimulantes (estimulam o sistema imunológico, regulam a concentração de glicose no sangue, entre outros benefícios) em virtude de seus carboidratos complexos e ácidos nucleicos (GAIOTTO, 2005).

Com o aumento do custo das rações para peixes e a instabilidade na suplementação em longo prazo, a busca por fontes alternativas de proteínas assume um papel importante para o futuro da indústria da aquicultura, uma vez que mostra a necessidade de desenvolvimento de gêneros alimentícios com proteínas de baixo custo e elevada qualidade. Desta maneira, o uso da biomassa protéica de origem microbiana pode ser considerado uma solução promissora e inovadora para substituir parte de proteína requerida na alimentação de peixes e assim solucionar este problema (LEE e KIM, 2001).

Na aquicultura os gastos com alimentação correspondem à maior parcela dos custos totais de produção nas criações semi-intensivas em função das rações para peixes possuírem elevado teor de proteína, em comparação às rações para outros animais cultivados. Tentando contornar esta situação, FURUYA et al. (2000) verificaram que é possível a utilização de 14% de levedura desidratada em rações no cultivo de alevinos de tilápia-do-nilo.

Estudos realizados com a levedura *Candida utilis*, como fonte de proteína na dieta da tilápia, indicaram que a substituição da proteína animal por uma mistura de compostos de origem vegetal, acarreta em um melhor desempenho de crescimento nos peixes que foram alimentados com 30% de levedura na dieta (OLVERA-NOVOA et al., 2002, citados por GAIOTTO, 2005).

Ainda segundo o mesmo autor, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser utilizada na alimentação de pintados, em níveis de até 5% como nutrientes, promovendo melhor desenvolvimento e sobrevivência.

De acordo com MOREIRA et al. (2002), na suinocultura, os gastos com alimentação representam aproximadamente 75% dos custos totais da criação, sendo as rações basicamente constituídas por milho e farelo de soja, sendo que fontes alternativas, como biomassa de leveduras, podem substituir do ponto de vista nutricional e econômico estes compostos. De acordo com o estudo, a levedura *Saccharomyces* sp. pode ser utilizada em rações de suínos nas fases de crescimento e pré-abate em níveis de até 21%.

## **2.10. Utilização de Biomassa Lipídica**

GUTIERREZ e SILVA (1993) comentam que há necessidade de suplementação de ácidos graxos essenciais, como o ácido linoléico, em alimentação animal. A utilização de ácido linoléico conjugado em dietas de tilápia-do-nilo promoveu melhora no ganho de peso, aumento no consumo de ração e melhora na conversão alimentar, afetando a proporção de ácidos graxos nos filés e fígado, e aumentando o conteúdo protéico dos filés (SANTOS et al., 2007). Além disso, os lipídios são fundamentais para o desenvolvimento de larvas de peixes como o jundiá (ULIANA et al., 2001). BARRETO et al. (2006), comentam ainda que a composição dos ácidos graxos de ovos pode ser alterada com a manipulação da dieta das aves. RIBEIRO et al. (2007) avaliaram o efeito dos níveis do ácido linoléico presente na dieta de matrizes, verificando que o peso dos ovos e o percentual de ácido linoléico nas gemas aumentaram com a inclusão de 1,93% deste ácido graxo.

Esta suplementação, em geral, se dá por óleos de origem vegetal, como os óleos de soja, linhaça, canola, arroz, milho e girassol, mas há um crescente interesse por novas fontes de ácidos graxos essenciais e muita atenção tem sido voltada para os micro-organismos denominados oleaginosos (CAZETTA e CELLIGOI, 2005). GUTIERREZ e SILVA (1993) comentam que leveduras podem constituir uma fonte importante de suplementação destes nutrientes em formulações de rações.

## **2.11. Cultivos Microbianos**

### **2.11.1. Generalidades**

A partir da década de 1950, o estudo das fermentações sofreu um grande incremento devido ao avanço no desenvolvimento da área de reatores, tornando este progresso, deste então, responsável pelo sucesso no crescimento na área dos cultivos microbianos (BORZANI et al., 2001).

Segundo REGULY (2000) e BORZANI et al. (2001), comumente a classificação dos cultivos microbianos está associada à condução do processo, quanto ao modo de cultivo, podendo ser em estado sólido ou em submerso, e quanto ao fornecimento de oxigênio ao processo, podendo ser aerados ou não. Segundo este último autor, de uma forma geral, um reator biológico pode ser conduzido de maneira descontínua, semicontínua e contínua.

Ao se executar um cultivo microbiano, normalmente se imagina preparar um meio de cultura que seja adequado à nutrição e ao desenvolvimento do micro-organismo em estudo, bem como ao acúmulo do produto desejado. Já no biorreator (fermentador) este meio é inoculado com o micro-organismo responsável pelo processo biológico, sendo o cultivo controlado por alguns parâmetros como temperatura, agitação, aeração, nutrientes, etc, de forma que o micro-organismo tenha sempre à sua disposição as melhores condições possíveis e necessárias ao seu desenvolvimento, até que o processo ocorra (BORZANI et al., 2001).

## **2.11.2. Condução de um cultivo microbiano**

### **2.11.2.1. Cultivo descontínuo**

No cultivo descontínuo, cada vez uma quantidade fixa pré-acertada de meio é colocada no biorreator, onde recebe o inóculo, sendo o produto formado separado, recuperado do meio, após um tempo de permanência ditado pela cinética do processo (REGULY, 2000).

Os cultivos descontínuos ou por bateladas vêm sendo utilizados pelo homem desde a antiguidade e, ainda hoje, são os mais empregados para a obtenção de vários produtos fermentados (AQUARONE et al., 2001).

Este tipo de cultivo pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades, pois quando o substrato é adicionado de uma só vez no início do cultivo exerce efeitos de inibição, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam. Além disso, apresenta tempos mortos, ou seja, tempos em que o biorreator não está sendo usado para o processo de cultivo propriamente dito, tais como tempo de carga, descarga de dorna e período correspondente à lavagem e esterilização do biorreator (BORZANI et al., 2001).

Por outro lado, apresenta menores riscos de contaminação (comparado com processo contínuo), grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os biorreatores para a fabricação de diferentes produtos, a possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, condição de controle mais estrito de estabilidade genética do micro-organismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto, o que é vital para a indústria farmacêutica (REGULY, 2000).

#### **2.11.2.2. Cultivo semicontínuo**

O cultivo microbiano recebe a denominação de semicontínuo quando, uma vez colocados no reator o meio de cultivo e o inóculo, as operações que se seguem obedecerem à seguinte ordem:

- Operação 1 – Aguarda-se o término do cultivo;
- Operação 2 – Retira-se parte do meio fermentado, mantendo-se, no reator, o restante de mosto fermentado;
- Operação 3 – Adiciona-se ao reator um volume de meio igual ao volume de meio que foi retirado na operação 2.

O meio de cultivo adicionado na operação 3 encontra, no reator, as células microbianas existentes no meio fermentado que nele foi mantido. Ou seja, o meio fermentado não retirado do biorreator na operação 2 serve como inóculo ao meio de cultivo adicionado na operação 3. Estas operações intermitentes, tanto no fluxo de entrada do meio quanto na saída de material fermentado, são repetidas enquanto não houver queda na produtividade do processo (BORZANI et al., 2001).

#### **2.11.2.3. Cultivo contínuo**

O processo de cultivo contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado (BORZANI et al., 2001).

No cultivo contínuo o mosto contendo os nutrientes é colocado no biorreator e inoculado. Quando determinado parâmetro cinético é atingido, a alimentação do mosto passa a ser contínua, havendo concomitante e contínua retirada de mosto fermentado, igualando vazão e alimentação. Se houver alimentação contínua ao cultivo, a uma

velocidade calculada, irá se chegar a um estado de equilíbrio celular com o meio, o regime estacionário, no qual a formação de biomassa nova compensa a perda de células por morte, no biorreator. Este estado estacionário é alcançado, quando não há alteração no conteúdo do biorreator: a massa celular, as concentrações do substrato e a do produto permanecem constantes, bem como o estado metabólico do agente (REGULY, 2000).

### **2.11.3. Modos de cultivo**

#### **2.11.3.1. Cultivo em estado sólido**

Os cultivos em estado sólido, ou em superfície, são aqueles em que tanto o crescimento do micro-organismo como a formação do produto se verificam em meio sólido, a partir de sua superfície. O meio neste caso é matéria orgânica, com umidade ajustada à atividade de água do micro-organismo. Quando o cultivo em superfície é desenvolvido sobre farelos ou outros substratos sólidos, mas umedecidos, também recebe o nome de cultivo semi-sólido ou em estado sólido (REGULY, 2000).

Segundo BORZANI et al. (2001), este cultivo apresenta como vantagens:

- Aceleração na taxa de reação devido ao contato direto entre o substrato e o micro-organismo;
- Os biorreatores podem ser pequenos em relação ao rendimento do produto;
- Não há necessidade de propagadores do inóculo, o qual é preparado à parte, em cultivo semi-sólido igual ao meio de produção;
- A umidade baixa do meio ou substrato reduz contaminações;
- Os rendimentos em produto podem ser bem mais altos do que em cultivo submerso;
- Os produtos sólidos produzidos podem ser extraídos imediatamente, por adição direta de solventes.

#### **2.11.3.2. Cultivo submerso**

Nos cultivos em submerso, ou em profundidade, o crescimento do micro-organismo e a formação do produto se desenvolvem no seio do meio nutritivo líquido, o mosto. Se este está em contato com o ar ou for aerado, o micro-organismo necessariamente é aeróbio (REGULY, 2000).

Segundo o mesmo autor, quando comparado com o método de cultivo em estado sólido, apresenta as seguintes vantagens:

- É de mais fácil controle;
- O meio de cultivo pode ser variado mais facilmente;
- A superfície celular do agente fica inteiramente exposta ao meio, facilitando as trocas (absorção e excreção);
  - A esterilização de um meio líquido é mais fácil do que a de um meio semi-sólido;
  - A aeração estéril de meio líquido em biorreator é menos dispendiosa e problemática do que a condução de muito maior volume de ar, também estéril, que seria necessário para aerar eficientemente um cultivo semi-sólido em bandejas;
  - O cultivo submerso pode ser transformado em cultivo contínuo, quando a sua cinética o permite.

## **2.12. Biorreatores**

### **2.12.1. Generalidades**

De acordo com SCHMIDELL et al. (2001), denominam-se biorreatores, reatores bioquímicos ou reatores biológicos, os reatores químicos nos quais ocorrem uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores. Esses biocatalisadores podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais). Assim, pode-se classificar os biorreatores em dois grandes grupos:

- Grupo 1: Biorreatores nos quais as reações ocorrem na ausência de células vivas, ou seja, são os reatores enzimáticos;
- Grupo 2: Biorreatores nos quais as reações se processam na presença de células vivas.

Com relação aos reatores com células vivas, pode-se afirmar que os mais amplamente conhecidos e com uso bastante difundido, são os reatores com microorganismos, os quais vêm sendo empregados desde a década de 1940 para a produção industrial de uma grande diversidade de produtos tais como enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos, solventes, ou ainda no tratamento de resíduos orgânicos industriais ou domésticos (BORZANI et al., 2001).

Outro campo de desenvolvimento é o cultivo de células animais e vegetais, tendo alcançado rápido progresso na última década, constituindo-se hoje num dos grandes temas da Biotecnologia Moderna. Assim, pode-se citar o emprego de biorreatores com células animais para a produção de uma série de produtos ligados à saúde humana e animal, tais como vacinas virais, anticorpos, hormônios e fatores de

crescimento. Os reatores que empregam células animais e vegetais em geral possuem várias particularidades, tendo em vista as diferentes características apresentadas por este tipo de células em relação às células microbianas, destacando-se entre elas a elevada sensibilidade ao cisalhamento, característica que, em casos extremos, leva à necessidade da utilização de biorreatores não convencionais, como reatores *air lift*, ou ainda reatores com membranas, nos quais não se tem agitação mecânica e, conseqüentemente, as tensões de cisalhamento são menores (SCHMIDELL et al., 2001).

### **2.12.2. Classificação dos biorreatores**

De acordo com SCHMIDELL et al. (2001), uma das formas possíveis e mais encontradas na literatura de classificar os biorreatores é:

- Quanto ao tipo de biocatalisador (células ou enzimas);
- Quanto à configuração do biocatalisador (célula/enzimas livres ou imobilizadas);
- Quanto à forma de se agitar o líquido no reator.

Ainda segundo o autor, dentre as várias classificações encontradas que abordam o tema biorreatores, uma das mais abrangentes é a de Kleinstreuer (1987), que apresenta uma classificação mista, com base no tipo de biocatalisador empregado (enzima, micro-organismo aeróbio ou anaeróbio) e na configuração deste (livre, imobilizado ou confinado entre membranas).

### **2.13. Sistemas de Agitação e Aeração**

A agitação dos mostos em cultivos submersos é essencial para a obtenção de uma boa mistura dos componentes do mosto com as células, possibilitando boa transferência de calor e de massa entre o micro-organismo e o meio em que está imerso. Além disso, quando o micro-organismo é aeróbio e é cultivado em meio viscoso, polimérico, a agitação mecânica se torna necessária para distribuir o ar que a ele deve ser suprido. Em meios de viscosidade baixa, a agitação mecânica pode ser muitas vezes substituída por um sistema adequado de introdução de ar, o que pode atender tanto à aeração quanto à agitação, com vantagem em relação ao agitador mecânico (REGULY, 2000).

Entre os processos biotecnológicos de interesse industrial, envolvendo o cultivo de células microbianas, sem dúvida os processos conduzidos em aerobiose encontram situação de destaque. A produção de antibióticos, enzimas, vitaminas,

fermentos e inoculantes, proteínas recombinantes (hormônios de crescimento, insulina, etc), constituem em sua grande maioria processos aeróbios. Igualmente, o cultivo de células animais, visando à produção de produtos ou a posterior infecção por vírus para a obtenção de vacinas, são processos aeróbios. O objetivo central de um sistema de agitação e aeração é o fornecimento de oxigênio para a manutenção de uma dada atividade respiratória de um certo conjunto de células. Assim, o que se visa é transferir o oxigênio da fase gasosa para o líquido, fazer com que este oxigênio dissolvido chegue às células suspensas, penetre nestas células e, finalmente, seja consumido na reação (SCHMIDELL et al., 2001).

Assim, segundo o autor, os processos envolvendo o cultivo de células aeróbias ou aeróbias facultativas, visando à produção de produtos ou ainda para a realização do tratamento biológico de águas residuárias, têm todos os aspectos comuns de exigirem um adequado dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio, ou seja, da operação de dissolução do oxigênio contido na fase gasosa (normalmente o ar, ou ar enriquecido com oxigênio) para a fase líquida, de onde o micro-organismo irá consumir este oxigênio para a respiração.

**CAPÍTULO III**  
**DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE INÓCULO E DA  
TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS A  
PARTIR DA GLICERINA RESIDUAL**

# INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE INÓCULO E DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURAS A PARTIR DA GLICERINA RESIDUAL

## RESUMO

O uso de glicerina residual como substrato para produção de biomassa como fonte de nutrientes constitui-se em uma alternativa viável, uma vez que valoriza este co-produto e diminui o custo de produção de biomassa como fonte de nutrientes. Os efeitos da composição do meio de preparo de inóculo e da temperatura de incubação sobre o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 foram avaliados neste trabalho. Para a obtenção dos inóculos, a levedura foi cultivada em meios à base de glicerina pura, em incubadora rotatória com 180 rpm de agitação a 30°C. Estes foram inoculados para o meio de produção contendo glicerina residual, incubando-se em diferentes temperaturas (25, 30 e 35°C). Amostras foram retiradas a cada 8 h, sendo estas centrifugadas a 7530xg por 15 min para as determinações analíticas no sobrenadante (pH) e sedimento (concentração de biomassa). Os ensaios foram realizados em triplicata e avaliados por análise de variância e teste de Tukey. Em todos os ensaios foi observada forte redução do pH, provavelmente associada à produção de ácidos orgânicos. Não foram observadas diferenças significativas entre os meios de inóculo testados para uma mesma temperatura. A levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 apresentou melhor desempenho a 25°C utilizando meio de inóculo com igual composição do meio de produção, atingindo uma concentração de biomassa de 17,7 g.L<sup>-1</sup>.

Palavras-chave: Biodiesel, Biomassa, Crescimento celular, Glicerina residual, *Yarrowia lipolytica*.

## 1. INTRODUÇÃO

O petróleo é a principal fonte de energia no mundo, mas por se tratar de um combustível de origem fóssil, e com expectativa de diminuição das suas reservas no futuro próximo, pesquisas com o objetivo de desenvolver fontes de energia renováveis são de grande interesse (SILVA et al., 2009).

Neste contexto, os óleos vegetais aparecem como uma alternativa para substituição ao diesel de petróleo, sendo o seu uso testado já em fins do século XIX, produzindo resultados satisfatórios no próprio motor a diesel (NASCIMENTO et al., 2001). Esta possibilidade de utilização de combustíveis de origem agrícola vem apresentando um potencial promissor no mundo inteiro, sendo um mercado que cresce aceleradamente devido à sua contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, principalmente nos grandes centros urbanos, e como fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do petróleo (ACCARINI, 2009).

O biodiesel pode substituir o diesel de petróleo, sendo produzido a partir de óleos vegetais, gerando aproximadamente 10% de glicerina, como principal subproduto. O excesso de glicerina gerada pode representar um problema ambiental, já que não pode ser descartada no ambiente e atualmente o mercado não absorve a totalidade da produção. Estudos recentes revelam que as indústrias produtoras de biodiesel, principalmente os pequenos produtores, não sabem o que fazer com este subproduto, e algumas plantas já estão tendo que diminuir a sua produção por não ter um destino pré-estabelecido para este subproduto (SILVEIRA, 2008).

Com isto, uma das possíveis aplicações é o uso como fonte de carbono e energia para crescimento microbiano em microbiologia industrial (SILVA et al., 2009). Quando se trata da utilização de glicerina residual (bruta) em meios de cultivo, sem uma prévia purificação, são observadas vantagens em relação ao tradicional uso de glicerina pura como substrato, principalmente em virtude do menor custo. Mas relativamente poucos estudos relatam o uso deste substrato como única fonte de carbono (PAPANIKOLAOU et al., 2008). Por outro lado, os altos custos das fontes protéicas e lipídicas têm exigido reavaliações nos níveis utilizados destes nutrientes, como por exemplo, em rações animais, assim como a busca por fontes alternativas (GAIOTTO, 2005).

Desta forma, a agregação de valor com o aproveitamento dos co-produtos gerados na produção de biodiesel, como produção de biomassa de leveduras por bioconversão da glicerina residual, a ser usada em ração animal, constitui importante contribuição para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do biodiesel.

O presente trabalho teve como objetivo converter por via biotecnológica a glicerina gerada na síntese de biodiesel em biomassa de leveduras. Para isso, foi estudada a influência da composição do meio de preparo do inóculo e da temperatura de incubação, sobre o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 cultivada em frascos agitados, em termos de concentração de biomassa.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo**

No estudo foi utilizada a levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, cedida pelo *Northern Regional Research Laboratory* (Peoria, USA) e certificada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Esta linhagem foi previamente selecionada por SANTOS (2009) como promissora para a conversão de glicerina residual em biomassa.

As culturas liofilizadas foram reativadas em ágar *YM* (*Yeast Malt Agar*), incubadas em estufa bacteriológica (Quimis Q-316 M2, Brasil) a 25°C por 48 h, sendo posteriormente transferidas novamente para ágar *YM* e incubadas nas mesmas condições para manutenção das culturas. Os micro-organismos foram mantidos em tubos contendo ágar *YM* sob refrigeração (4°C).

### **2.2. Glicerina Residual**

Como principal fonte de carbono foi utilizada glicerina residual proveniente da síntese de biodiesel a partir de óleo de soja por via metanólica, gentilmente cedida por BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S.A. (Passo Fundo-RS). A glicerina residual continha 83,08% (m/m) de pureza, de acordo com laudo fornecido pela própria empresa.

### **2.3. Preparo do Inóculo**

Para a obtenção do inóculo foram utilizados dois tubos de cultura microbiana, sendo a superfície do ágar de cada tubo raspada com alça de platina e com 10 mL de água peptonada 0,1%, transferindo para Erlenmeyer de 500 mL contendo o meio em estudo (Tabela 1), totalizando um volume de 200 mL (180 mL de meio; 20 mL da suspensão de células). Os frascos foram mantidos em incubadora rotatória (Tecnal

TE-420, Brasil) a 30°C e 180 rpm, acompanhando-se o cultivo por contagem em câmara de Neubauer (ZHANG et al., 2005).

Foram testadas duas formulações distintas para avaliar o efeito da composição do meio de propagação do inóculo sobre a concentração de biomassa, conforme Tabela 1.

**Tabela 1:** Composições dos meios de propagação do inóculo.

Meio	Composição (g.L <sup>-1</sup> )
A	30 glicerina p.a; 7 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,5 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,15 CaCl <sub>2</sub> ; 0,15 FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O; 0,02 ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,06 MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O; 0,5 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0,5 extrato de levedura e pH inicial ajustado em 6,0. PAPANIKOLAOU e AGGELIS (2002)
B	33,9 glicerina p.a; 0,6 extrato de levedura; 5,5 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 peptona; 5,5 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1,0 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0,25 MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,021 CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O e pH inicial ajustado em 4,8. SANTOS (2009)

#### 2.4. Cultivos em Frascos Agitados

O meio de produção utilizado foi previamente otimizado por SANTOS (2009) para *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423. A concentração de glicerina residual utilizada considerou sua pureza, adicionando-se uma quantidade de forma a atingir a concentração de glicerina proposta por SANTOS (2009).

Desta forma, utilizou-se um meio de cultivo a fim de resultar na seguinte composição (g.L<sup>-1</sup>): 40,8 glicerina residual; 0,6 extrato de levedura; 5,5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 peptona; 5,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,25 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,021 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e pH inicial ajustado em 4,8 (HCl 1N).

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL com volume final de 200 mL, resultante da adição do meio de cultivo, suspensão de leveduras e água destilada estéril. Nos cultivos, o volume de suspensão de leveduras inoculado foi calculado de forma a atingir concentração inicial de 1x10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>.

Os frascos foram mantidos em incubadora rotatória (Tecnal TE-420, Brasil) a 180 rpm de agitação nas temperaturas estudadas (25, 30 e 35°C). A Figura 1 ilustra os cultivos em frascos agitados.

Em todos os experimentos, alíquotas de 5 mL foram retiradas assepticamente a cada 8 h, sendo estas centrifugadas a 7530xg por 15 min sob refrigeração em

centrífuga refrigerada (Cientec CT 5000 R, Brasil), para as determinações analíticas no sobrenadante (pH) e sedimento (concentração de biomassa).



**Figura 1.** Cultivos de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 em frascos agitados.

## **2.5. Métodos Analíticos**

### **2.5.1. Concentração de biomassa**

A medida da concentração celular foi acompanhada por leitura de absorvância a 600 nm em espectrofotômetro visível (Biospectro SP-22, China), conforme descrito por RECH (1998), convertendo-se em  $\text{g.L}^{-1}$  a partir de uma curva padrão de biomassa para o micro-organismo, baseado no método descrito por CHOI e PARK (2003). A curva padrão encontra-se em apêndice.

### **2.5.2. pH**

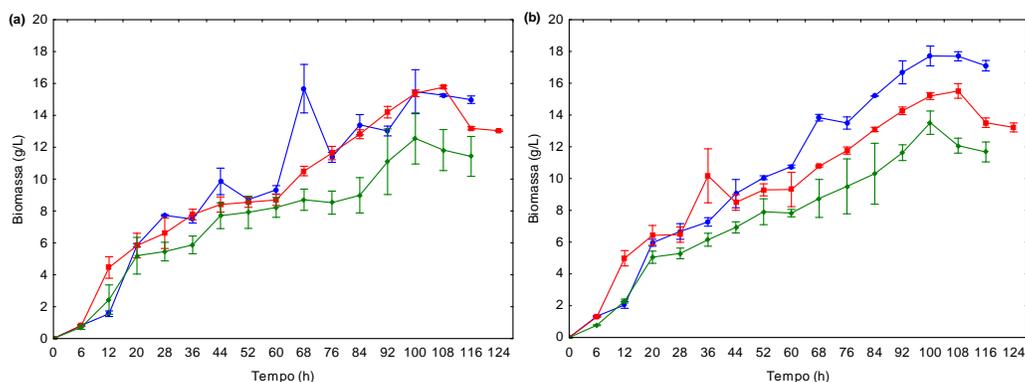
O pH do sobrenadante foi medido usando medidor de pH (Marte MB-10, Brasil), de acordo com AOAC (2000).

## **2.6. Análise Estatística dos Resultados**

Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo os dados tratados por análise de variância e teste de Tukey (MONTGOMERY, 2004), a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as condições estudadas, a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ). O tratamento estatístico dos dados foi feito com o *software* Statistica 6.0 (Stat Soft Inc.,EUA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 2a e 2b apresentam o acompanhamento do crescimento celular da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 utilizando diferentes composições de meio para obtenção do inóculo e em diferentes temperaturas de incubação.



**Figura 2.** Acompanhamento do crescimento celular da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 no meio A (a) e no meio B (b). (●) 25°C; (■) 30°C; (◆) 35°C.

Através das Figuras 2a e 2b, verificou-se que o crescimento, em meio contendo glicerina residual como fonte de carbono, atingiu a fase estacionária a partir de 100 h de cultivo, sendo obtidos os valores máximos de biomassa neste período, para as temperaturas de 25 e 35°C em ambas as composições de meios de cultivos propostos. Já na temperatura de 30°C, a fase estacionária é atingida em 108 h de cultivo para ambos os meios estudados.

A Tabela 2 apresenta os resultados relativos à produção de biomassa máxima ao utilizar diferentes meios de cultivo para obtenção do inóculo e diferentes temperaturas de crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423.

De acordo com a Tabela 2, observou-se que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os meios de cultivo propostos para a obtenção do inóculo, nas diferentes temperaturas testadas. Entretanto, verificou-se que o cultivo a 25°C utilizando o meio B para obtenção do inóculo, apresentou concentração celular de  $17,7 \pm 0,6 \text{ g.L}^{-1}$  em 100 h de cultivo, sendo significativamente maior, a 95% de confiança, em relação aos cultivos a 30 e 35°C, que apresentaram concentrações celulares de  $15,7 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$  e  $13,5 \pm 0,7 \text{ g.L}^{-1}$  em 108 e 100 h de cultivo, respectivamente.

Os resultados de biomassa máxima encontrados neste trabalho apresentaram-se superiores aos relatados em outros estudos. PAPANIKOLAOU e AGGELIS (2002) conseguiram produzir  $8,1 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1, durante 160 h de cultivo utilizando glicerina bruta proveniente da produção do

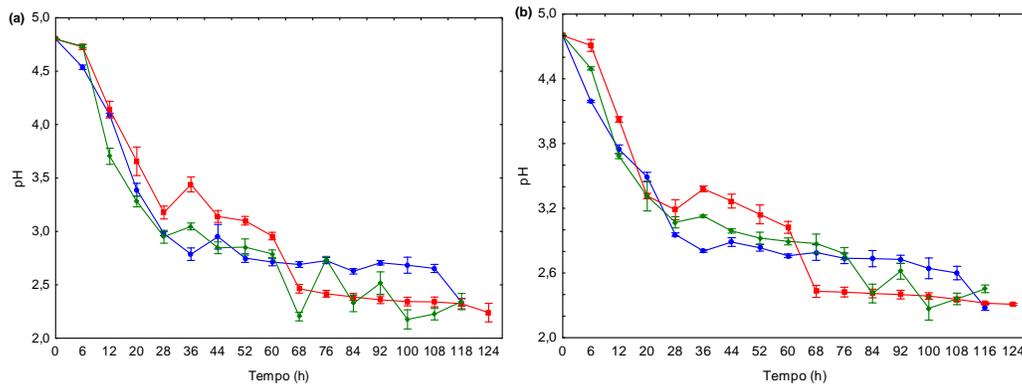
biodiesel. Já DALMAU et al. (2000) verificaram que uma linhagem de *Candida rugosa* foi capaz de crescer em glicerol como fonte de carbono, produzindo cerca de  $1,25 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa.

**Tabela 2:** Biomassas máximas  $\pm$  desvio padrão e análise estatística dos dados\*.

Temperatura (°C)	Meio de cultivo para inóculo	
	A	B
25	$15,5 \pm 1,4^{aA}$	$17,7 \pm 0,6^{aA}$
30	$15,7 \pm 0,1^{bA}$	$15,7 \pm 0,3^{bB}$
35	$12,6 \pm 1,6^{cB}$	$13,5 \pm 0,7^{cC}$

\*Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas entre colunas a 95% de confiança. Letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas entre linhas a 95% de confiança.

As Figuras 3a e 3b apresentam o decréscimo do pH observado ao longo dos cultivos de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 utilizando diferentes composições de meio para obtenção do inóculo e em diferentes temperaturas de incubação.



**Figura 3.** Acompanhamento do pH no meio A (a) e no meio B (b). (●) 25°C; (■) 30°C; (◆) 35°C.

A diminuição do pH coincide com o aumento de biomassa ao longo do cultivo, sendo que este comportamento pode estar associado à produção de ácidos orgânicos como ácido cítrico e isocítrico,  $\alpha$ -cetoglutárico, acético e pirúvico como subprodutos (LEVINSON et al., 2007; PAPANIKOLAOU et al., 2008; PAPANIKOLAOU et al., 2002; MORGUNOV et al., 2004).

Portanto, os resultados obtidos nesse estudo são bastante promissores, quando comparados à literatura, podendo ser atrativa a obtenção de biomassa da levedura como fonte de nutrientes a partir da glicerina residual, bem como a capacidade de excretar compostos como ácidos orgânicos e enzimas, que também

pode ser explorada. Devido a isto, este trabalho traz uma contribuição importante, pois são relativamente escassos os estudos com a levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 em meio tendo glicerina residual como principal fonte de carbono.

#### 4. CONCLUSÃO

A levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 foi capaz de utilizar glicerina residual proveniente da síntese do biodiesel, como fonte de carbono, para a produção de biomassa. Apesar de não haver diferenças significativas entre os meios testados, o meio de cultivo B foi selecionado para a obtenção do inóculo já que sua composição é a mesma do meio de cultivo para produção de biomassa, favorecendo a adaptação do microrganismo. Quanto à temperatura, o melhor crescimento foi observado a 25°C, resultando em uma concentração de biomassa máxima de 17,7 g.L<sup>-1</sup>.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCARINI, J. H. Competitivo e sustentável. **Revista BiodieselBr**, v. 12, set/out 2009.
- AOAC, **Official Methods of Analysis** (17<sup>th</sup> edn). Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.
- CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass & Bioenergy**, v. 25, p. 221-226, 2003.
- DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657-663, 2000.
- GAIOTTO, J. R. Utilização de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus subprodutos na alimentação de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil, 89 p. 2005.
- LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; KUO, T. MIN. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 292-295, 2007.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao Controle Estatístico de Qualidade**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004.

MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V.; PEREVOZNIKOVA, O. A.; SHISHKANOVA, N. V.; FINOGENOVA, T. V. Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1469-1474, 2004.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M. Biotransformação de óleos e gorduras. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 19, p. 28-31, 2001.

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

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, p. 60-71, 2008.

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

RECH, R. Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus*. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Engenharia Química, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 75 p. 1998.

SANTOS, E. O. Aproveitamento do glicerol gerado na síntese de biodiesel para produção de biomassa de leveduras. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 80 p. 2009.

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

SILVEIRA, L. Glicerina gerada na produção do biodiesel terá novos usos. Biodieselbr online. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>. Acesso em 05 de junho de 2008.

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

**INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NO CULTIVO DE *Yarrowia*  
*lipolytica* NRRL YB-423 EM MEIO À BASE DE GLICERINA RESIDUAL E  
CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA OBTIDA**

**INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NO CULTIVO DE *Yarrowia lipolytica*  
NRRL YB-423 EM MEIO À BASE DE GLICERINA RESIDUAL E CARACTERIZAÇÃO  
DA BIOMASSA OBTIDA**

**RESUMO**

A conversão por via biotecnológica da glicerina residual gerada na síntese de biodiesel em biomassa de leveduras constitui uma alternativa para seu aproveitamento, uma vez que o seu uso na alimentação humana e animal é interessante, pois apresenta boa produtividade, presença de nutrientes como proteínas, lipídios e vitaminas, e natureza atóxica. Este trabalho teve por objetivo estudar a influência da agitação e aeração na produção de biomassa de leveduras, utilizando glicerina residual proveniente da síntese do biodiesel como fonte de carbono. Foi utilizada a cepa de levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, certificada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Um planejamento fatorial ( $2^2$  ensaios mais 3 pontos centrais) foi realizado para estudo dos efeitos das variáveis agitação e aeração, avaliando-se parâmetros do crescimento celular, os teores de proteínas e lipídios. Os cultivos foram conduzidos em biorreator Biostat B, com capacidade de 5 L, sendo o meio de cultivo inoculado com suspensão de levedura obtida em incubadora rotatória a 30°C e 180 rpm, de forma a atingir  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>. Com agitação de 200 rpm e aeração de 1 vvm foi atingindo 19,14 g.L<sup>-1</sup> de biomassa com conteúdo protéico de 13,55% e teor lipídico de 7,87%. A determinação do perfil de ácidos graxos apontou que os ácidos graxos poli-insaturados foram os produzidos em maior quantidade (62,55%), sendo o ácido linoléico (C18:2) o de maior predominância, com 49,16%. Na fração protéica, os aminoácidos essenciais isoleucina, valina, treonina e lisina apresentaram escores químicos superiores ao padrão FAO/WHO, respectivamente 1,42, 1,42, 1,30 e 1,17. Desta forma, a biomassa produzida tem potencial para utilização em ração animal como fonte de nutrientes.

Palavras-chave: Aeração, Agitação, Biodiesel, Biomassa, Glicerina, Perfil de ácidos graxos, Perfil de aminoácidos.

## 1. INTRODUÇÃO

As fontes de energia não renováveis são aquelas que se encontram na natureza em quantidades limitadas e se extinguem com a sua utilização. Uma vez esgotadas, as reservas não podem ser regeneradas. Consideram-se fontes de energia não renováveis os combustíveis fósseis (carvão, petróleo bruto e gás natural). Todas estas fontes de energia têm reservas finitas, ao contrário das fontes de energia renováveis, originadas graças ao fluxo contínuo de energia proveniente da natureza (FERRARI et al., 2005).

Em função disto, e também pelo fato de que a maior parte da energia consumida no mundo provém do petróleo, carvão e gás natural, é que tem ocorrido um crescente interesse em fontes alternativas de energia (SCHUCHARDT et al., 1998; ENCINAR et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2001).

Historicamente, materiais agrícolas e seus derivados têm sido sugeridos como fontes de energia alternativa, juntamente com o uso de biodiesel como combustível (AL-WIDYAN e AL-SHYOUKH, 2002; MUSHRUSH et al., 2001), sendo um mercado que apresenta um potencial promissor (HARTEN, 2003).

Com essa intenção, foi desenvolvida a tecnologia de biocombustíveis, derivados geralmente de biomassas agrícolas, portanto sendo renováveis, não-tóxicos e biodegradáveis (GERPEN et al., 2010) e, por substituir os combustíveis fósseis, reduzem a emissão de gases de efeito estufa.

Os processos atuais de produção de biodiesel estão concentrados na reação de transesterificação de óleos vegetais, que utilizam etanol ou metanol como reagente e hidróxidos de metais alcalinos como catalisadores. Tal reação gera ésteres etílicos ou metílicos – o biodiesel – e como subproduto a glicerina, que poderia ser uma segunda fonte de recursos, mas atualmente na maior parte das fábricas é tratada muito mais como um problema do que como um co-produto, por não haver um mercado que a absorva (ARANDA, 2009).

Estudos estão sendo desenvolvidos com a intenção de proporcionar um melhor destino à glicerina, que pode ser empregada como substrato em processos biotecnológicos, juntamente com micro-organismos capazes de utilizá-la como fonte de carbono (SILVA et al., 2009). Neste sentido, e tendo em mente que na produção de biodiesel a partir de qualquer triacilglicerol há geração de aproximadamente 10% de glicerina, a conversão da glicerina por via biotecnológica em produtos de importância comercial constitui uma das mais promissoras alternativas para seu aproveitamento (PAPANIKOLAOU et al., 2008).

O desenvolvimento de processos biotecnológicos baseados na reprodução controlada de micro-organismos iniciou-se com as leveduras, por estas apresentarem elevada taxa de crescimento. As leveduras são importantes como matérias-primas para as indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, sendo excelente fonte de nutrientes, principalmente proteínas, lipídios, vitaminas e minerais essenciais (CABALLERO-CÓRDOBA e SGARBIERI, 2000).

*Yarrowia lipolytica*, um fungo dimórfico, tem atraído grande interesse na área biotecnológica pela capacidade de excretar diversos metabólitos em grande quantidade – ácidos orgânicos e proteínas extracelulares – sendo muito usada para superexpressão e secreção de proteínas específicas (BARTH e GAILLARDIN, 1997). Seu potencial tem sido explorado no aproveitamento da glicerina para produção de lipídios (PAPANIKOLAOU et al., 2008), ácido cítrico (PAPANIKOLAOU et al., 2002) e enzimas (GEON-HO et al., 2007).

Neste trabalho, foram estudados os efeitos da aeração e agitação sobre o desempenho da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, cultivada em biorreator de bancada, avaliando-se parâmetros relativos ao crescimento celular e à composição da biomassa obtida.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo**

No estudo foi utilizada a levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, cedida pelo *Northern Regional Research Laboratory* (Peoria, USA), certificada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) e previamente selecionada entre diversas cepas (SANTOS, 2009) para cultivo em meio à base de glicerina como fonte de carbono. A cepa foi mantida em ágar YM (*Yeast Malt Agar*) sob refrigeração (4°C).

A reativação da cepa foi realizada através de transferência para ágar YM (*Yeast Malt Agar*) e incubação em estufa bacteriológica (Quimis Q-316 M2, Brasil) a 25°C por 48 h.

### **2.2. Glicerina Residual**

A glicerina residual foi gentilmente cedida por BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S.A. (Passo Fundo-RS), resultante da produção de biodiesel a

partir de óleo de soja por via metanólica. A glicerina residual continha 83,08% (m/m) de pureza, de acordo com laudo fornecido pela própria empresa.

### 2.3. Preparo do Inóculo

Foram utilizados dois tubos de cultura microbiana reativada, sendo a superfície do ágar de cada tubo raspada com alça de platina e 10 mL de água peptonada 0,1%, transferindo para Erlenmeyer de 500 mL totalizando um volume de 200 mL (180 mL de meio; 20 mL de suspensão de células), com a seguinte composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ) previamente estabelecida (MACHADO JR. et al., 2009): 33,9 glicerina p.a; 0,6 extrato de levedura; 5,5  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 peptona; 5,5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,0  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,25  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,021  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e pH inicial ajustado em 4,8.

Os frascos foram mantidos em incubadora rotatória (Tecnal TE-420, Brasil) a  $30^\circ\text{C}$  e 180 rpm, acompanhando-se o cultivo por contagem em câmara de Neubauer (ZHANG et al., 2005). A Figura 1 mostra a observação microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423.



**Figura 1.** Microscopia da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423.

### 2.4. Cultivos em Biorreator de Bancada

Foi utilizado um biorreator Biostat B (B. Braun Biotech International, Alemanha) com capacidade de 5 L, equipado com sensores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e com dispositivos de controle de temperatura, pH, aeração e agitação, conforme mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Biorreator Biostat B (B. Braun Biotech International, Alemanha) com capacidade de 5 L utilizado para o cultivo da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423.

Primeiramente foram realizados ensaios preliminares com e sem controle de pH, em condições de agitação (200 rpm) e aeração (1 vvm) correspondentes ao ponto central do planejamento experimental proposto, estabelecendo-se de que forma os cultivos seriam conduzidos posteriormente quanto ao controle de pH.

A seguir, para avaliar os efeitos das variáveis em estudo no biorreator (aeração e agitação) sobre o desempenho da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  com três repetições no ponto central (Tabela 1), avaliando-se o crescimento celular e à composição da biomassa.

**Tabela 1:** Planejamento experimental  $2^2$  em níveis codificados (valores reais).

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)
1	-1 (100)	-1 (0,5)
2	+1 (300)	-1 (0,5)
3	-1 (100)	+1 (1,5)
4	+1 (300)	+1 (1,5)
5	0 (200)	0 (1)
6	0 (200)	0 (1)
7	0 (200)	0 (1)

Em todos os experimentos no biorreator, o volume de suspensão de leveduras inoculado foi calculado de forma a atingir uma concentração de  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> no meio de cultivo, para volume final de 4 L, e a temperatura foi mantida em 30°C.

Para os cultivos foi utilizado o meio proposto por SANTOS (2009), ajustando-se a concentração de glicerina residual adicionada de acordo com a sua composição, resultando na seguinte composição (g.L<sup>-1</sup>): 40,8 glicerina residual; 0,6 extrato de levedura; 5,5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 peptona; 5,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,25 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,021 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e pH inicial ajustado em 4,8 antes da esterilização.

Alíquotas de 30 mL foram retiradas do biorreator a cada 6 h, sendo estas centrifugadas a 7530xg por 15 min sob refrigeração, para determinação da concentração de biomassa (massa seca), conforme descrito no item 2.5.1.

A partir das curvas de crescimento celular foram obtidos os seguintes parâmetros:

- X<sub>máx</sub> (g.L<sup>-1</sup>), correspondente à biomassa máxima atingida;
- Produtividade (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), calculada conforme Equação 1;

$$Prod = \frac{X_{máx}}{t} \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo, X<sub>máx</sub> a biomassa máxima, em g.L<sup>-1</sup>, e t o respectivo tempo, em h;

- Velocidade específica máxima de crescimento celular (μ<sub>máx</sub>), definida pela Equação 2 e calculada através do *software* Microcal Origin 5.0.

$$\mu_{máx} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 2})$$

O pH e o oxigênio dissolvido foram medidos diretamente no biorreator. O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K<sub>L</sub>a) foi determinado para todas as condições experimentais (item 2.5.3).

Ao término dos cultivos o volume restante do biorreator foi centrifugado (Sigma 6-15, Alemanha) nas mesmas condições para recuperação da biomassa, a fim de caracterizá-la (item 2.5.2).

## 2.5. Métodos Analíticos

### 2.5.1. Concentração de biomassa

O pellet foi lavado com água destilada e seco a 105°C até peso constante, para o cálculo da concentração celular (g.L<sup>-1</sup>).

## 2.5.2. Caracterização físico-química

O teor de cinzas foi determinado pelo método de calcinação em mufla a 560°C por 3 h (AOAC, 2000).

O nitrogênio total foi determinado pelo método micro-Kjeldahl, no término de cultivo. O fator de conversão para proteína foi de 6,25 (AOAC, 2000).

A determinação de fibras foi realizada utilizando-se método químico, determinando o resíduo orgânico insolúvel da amostra, após digestão ácida e alcalina (BRASIL, 1991).

Para a quantificação de lipídios totais foi utilizada a metodologia proposta por BLIGH e DYER (1959) adaptada por MANIRAKIZA et al. (2001), através da extração dos lipídios polares e não polares da biomassa utilizando uma mistura de metanol e clorofórmio.

Para determinação de ácidos graxos, a fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil-ésteres dos ácidos graxos, segundo metodologia proposta por METCALFE et al. (1966).

A determinação do perfil de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás modelo Varian – 3400CX equipado com detector de ionização de chama e coluna ZB-Vax com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro. O gás de arraste foi nitrogênio a 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 300°C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 100°C seguida de um aumento de 6 °C.min<sup>-1</sup>, permanecendo 1 min na respectiva temperatura, até atingir 160°C, onde permaneceu por 5 min. A partir daí ocorreu novamente um aumento de 6 °C.min<sup>-1</sup> e até atingir a temperatura de 230°C, permanecendo por 10 min, totalizando 41 min. A quantidade de amostra injetada foi de 1 µL. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões Sigma Aldrich e quantificados por normalização de áreas, por meio do *software* Varian Star 4.51.

Os padrões de ácidos graxos utilizados (Sigma-Aldrich, Supelco; Bellefonte, EUA) foram ácido butírico (C4:0); ácido capróico (C6:0); ácido caprílico (C8:0); ácido cáprico (C10:0); ácido undecanóico (C11:0); ácido láurico (C12:0) ácido tridecanóico (C13:0); ácido mirístico (C14:0); ácido miristoléico (C14:1); ácido pentadecanóico (C15:0); ácido cis-10-pentadecanóico (C15:1); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoléico (C16:1); ácido heptadecanóico (C17:0); ácido cis-10-heptadecanóico (C17:1); ácido esteárico (C18:0); ácido oléico (C18:1 cis); ácido elaídico (C18:1 trans); ácido linoléico (C18:2 cis); ácido linolelaídico (C18:2 trans); ácido γ - linolênico (C18:3 n-6); ácido α - linolênico (C18:3 n-3); ácido araquídico (C20:0); ácido cis-11-eicosenóico (C20:1 n-9); ácido cis-11,14-eicosadienóico (C20:2); ácido cis-8,11,14-

eicosatrienóico (C20:3 n-6); ácido cis-11,14,17-eicosatrienóico (C20:3 n-3); ácido araquidônico (C20:4 n-6); ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (C20:5 n-3); ácido heneicosanóico (C21:0); ácido beênico (C22:0); ácido erúico (C22:1 n-9); ácido cis-13,16-docosadienóico (C22:2); ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenóico (C22:6 n-3); ácido tricosanóico (C23:0); ácido lignocérico (C24:0); ácido nervônico (C24:1 n-9).

Para a análise do perfil dos aminoácidos utilizou-se um cromatógrafo líquido (Thermo-Separations Products, EUA) com detector UV e coluna Luna (Phenomenex). As amostras foram preparadas de acordo com o método proposto por WHITE et al. (1986). Os aminoácidos liberados durante a hidrólise ácida (HCl 6 N por 24 h) foram reagidos com fenilisotilcianato (PITC), separados por HPLC em fase reversa e quantificados pela absorvidade UV em 254 nm. A quantificação foi feita por calibração interna multinível, com auxílio do ácido alfa-aminobutírico (AAAB) como padrão interno.

O triptofano foi quantificado com base em mistura padrão de aminoácidos (Pronase, 40°C, 24 h) pela reação com 4-dimetilaminobenzaldeído (DAB), de acordo com o método de SPIES (1967).

Tanto a determinação da composição de ácidos graxos, quanto a análise do perfil de aminoácidos, foram realizadas apenas para o ensaio que produziu a maior concentração de biomassa.

### **2.5.3. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na fase líquida ( $K_La$ )**

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na fase líquida ( $K_La$ ) foi determinado pelo método do borbulhamento de nitrogênio no meio de cultivo sem o micro-organismo, a 30°C, para as diferentes combinações de aeração e agitação estabelecidas pelo planejamento experimental, conforme proposto por BURKERT (2003). Consistiu em diminuir a concentração de oxigênio no meio, substituindo o oxigênio pelo nitrogênio através de borbulhamento. Em seguida foi promovida novamente a aeração onde o aumento do oxigênio dissolvido foi monitorado ao longo do tempo no próprio equipamento.

Supondo transferência de massa em duas fases, a seguinte equação foi utilizada para o cálculo do  $K_La$ :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_La(C^* - C_L) \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde  $C_L$  é concentração de oxigênio no meio e  $C^*$  é concentração de saturação de oxigênio do meio em equilíbrio com o ar.

Integrando a Equação 3:

$$\int_0^C \frac{dC_L}{(C^* - C_L)} = \int_0^t K_L a^* t \quad (\text{Eq. 4})$$

Tem-se:

$$-\ln\left(\frac{C^* - C}{C^*}\right) = K_L a^* t \quad (\text{Eq. 5})$$

Se  $OD = \frac{C^* 100}{C^*}$ , temos:

$$-K_L a^* t = \ln\left(\frac{100 - OD}{100}\right) \quad (\text{Eq. 6})$$

Desta forma, plotando-se  $\ln\left(\frac{100 - OD}{100}\right)$  versus tempo, a inclinação da reta resultante corresponde a  $-K_L a$ .

## 2.6. Análise Estatística

O tratamento estatístico dos dados foi feito com o *software* Statistica 6.0 (Stat Soft Inc., EUA).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Ensaio Preliminares no Biorreator

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos nos testes preliminares que definiram de que forma os cultivos foram conduzidos quanto ao controle de pH, baseando-se na concentração de biomassa máxima obtida ( $X_{máx}$ ).

**Tabela 2:** Concentrações de biomassa obtidas nos ensaios preliminares, com e sem controle de pH.

Condição de controle de pH	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> )
Com controle	19,15
Sem controle	9,30

Através da Tabela 2, verifica-se que a maior concentração de biomassa obtida nos testes preliminares foi atingida no ensaio com controle de pH. Desta forma, ficou definido que os cultivos do planejamento fatorial seriam conduzidos com controle de pH, mantendo-se seu valor em torno de 4.8, pois de acordo com SANTOS (2009) é o valor mais adequado para o desenvolvimento da levedura *Yarrowia lipolytica* visando produção de biomassa.

### 3.2. Crescimento Celular

Os acompanhamentos dos sete ensaios realizados em biorreator de bancada, nas condições propostas pelo planejamento fatorial (Tabela 3), em termos de concentração de biomassa, pH e oxigênio dissolvido ao longo do tempo, são apresentados no Apêndice.

Os resultados obtidos no planejamento fatorial em termos de parâmetros do crescimento microbiano estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com valores codificados (reais) e respostas obtidas para o crescimento celular.

Ensaio	$X_1$ (rpm)	$X_2$ (vvm)	$X_{m\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	Prod (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$K_L a$ (h <sup>-1</sup> )
1	-1 (100)	-1 (0,5)	14,49	0,25	0,27	2,25
2	+1 (300)	-1 (0,5)	13,03	0,05	0,31	13,71
3	-1 (100)	+1 (1,5)	13,26	0,16	0,37	9,01
4	+1 (300)	+1 (1,5)	15,80	0,18	0,33	16,83
5	0 (200)	0 (1)	19,20	0,72	0,40	8,34
6	0 (200)	0 (1)	19,15	0,75	0,32	8,25
7	0 (200)	0 (1)	19,07	0,70	0,40	8,29

$X_1$  – Agitação;  $X_2$  – Aeração;  $X_{m\acute{a}x}$  – Concentração de biomassa máxima;  $\mu_{m\acute{a}x}$  – Velocidade específica máxima; Prod – Produtividade;  $K_L a$  – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

De acordo com a Tabela 3, os experimentos 5, 6 e 7 (200 rpm de agitação; 1,0 vvm de aeração), correspondentes aos pontos centrais do planejamento fatorial, apresentaram a máxima concentração celular, produzindo em média 19,14 g.L<sup>-1</sup> de biomassa. Os valores de produtividade e velocidades específicas máximas variaram de 0,27 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (ensaio 1) a 0,40 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (ensaios 5 e 6) e de 0,05 h<sup>-1</sup> (ensaio 2) a 0,75 h<sup>-1</sup> (ensaio 6), respectivamente, sendo que os maiores valores também foram observados nas condições do ponto central.

Quanto à biomassa máxima, os resultados obtidos neste trabalho foram superiores aos mencionados na literatura, que relatam a produção de 7,1 g.L<sup>-1</sup> de biomassa em 92 h de cultivo utilizando a cepa de *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109, em meio contendo glicerina residual proveniente da síntese de biodiesel (PAPANIKOLAOU et al., 2008). MUSIAL et al. (2004) otimizaram a produção de biomassa de *Yarrowia lipolytica* A-101, estudando a composição do meio de cultivo, atingindo a concentração de biomassa de 19 g.L<sup>-1</sup>, resultado este semelhante ao aqui encontrado, no entanto utilizando óleo de canola como principal fonte de carbono.

Quanto à velocidade específica máxima de crescimento celular, PAPANIKOLAOU et al. (2008) observaram valores na faixa de 0,16 a 0,21 h<sup>-1</sup> para *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109 cultivada em meio à base de glicerina residual visando produzir ácido cítrico. Já AMARAL (2007), cultivando *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio contendo glicose e azeite de oliva como indutor da produção de lipase, reportam valores de 0,30 e 0,31 h<sup>-1</sup> variando a agitação de 550 a 650 rpm (com 1 vvm de aeração). Valores superiores, de 0,76 e 1,02 h<sup>-1</sup>, foram alcançados nas mesmas condições com a adição de 20% de perfluorodecalina (PFC), um carreador de oxigênio.

O K<sub>L</sub>a está relacionado com a agitação, aeração, tipo de agitador, viscosidade do meio de cultivo e geometria do biorreator. No presente trabalho, o valor de K<sub>L</sub>a variou de 2,25 h<sup>-1</sup> (ensaio 1) a 16,83 h<sup>-1</sup> (ensaio 4), correspondendo às condições mais brandas (100 rpm e 0,5 vvm) e mais severas (300 rpm e 1,5 vvm) de aeração e agitação, respectivamente. Procurando correlacionar com os demais parâmetros do crescimento celular, valores intermediários de K<sub>L</sub>a, correspondentes aos ensaios do ponto central, favoreceram o desempenho da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, o que pode indicar que, apesar das condições mais eficientes observadas no ensaio 4 quanto à transferência de oxigênio (maior K<sub>L</sub>a), a maior agitação e aeração podem representar um maior efeito de cisalhamento nas células, com impacto negativo sobre os parâmetros do crescimento celular.

A análise estatística para os efeitos da aeração e agitação sobre a biomassa máxima de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 é apresentada na Tabela 4. Pode-se

observar, a 95% de confiança ( $p < 0,05$ ), que todas as variáveis apresentaram efeito significativo sobre a concentração de biomassa máxima ( $R^2 = 0,9998$ ). Verificou-se também que no aumento de 100 rpm (nível -1) para 300 rpm (nível +1) de agitação, do nível -1 (0,5 vvm) para o nível +1 (1,5 vvm) de aeração e na interação entre as variáveis estudadas, ocorreu um incremento na concentração de biomassa em 0,54 g.L<sup>-1</sup>, 0,77 g.L<sup>-1</sup> e 2,00 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabela 4:** Efeitos das variáveis estudadas sobre a biomassa máxima (g.L<sup>-1</sup>).

Fator	Efeito	EP	t(2)	p
Média	14,14	0,03	431,41	<0,001
Curv.	9,99	0,10	99,73	<0,001
X <sub>1</sub>	0,54	0,06	8,23	0,014
X <sub>2</sub>	0,77	0,06	11,74	0,007
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	2,00	0,06	30,49	0,001

X<sub>1</sub> – Agitação; X<sub>2</sub> – Aeração; EP – Erro Padrão; Curv. – Curvatura.

Pode-se observar também que a curvatura exerceu um efeito significativo sobre a produção de biomassa máxima, provavelmente isso indica que um modelo de segunda ordem ajustaria bem os dados do processo, porém, seria necessária a realização de experimentos nas condições axiais do planejamento fatorial. Como a máxima concentração de biomassa esperada pelo modelo de segunda ordem provavelmente já seria a obtida na condição do ponto central, e o objetivo principal deste trabalho foi a obtenção de máxima produção em biomassa, não seria justificável a realização dos experimentos adicionais, além do que os maiores valores atingidos para velocidade específica (0,75 h<sup>-1</sup>) e produtividade (0,40 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) também foram obtidos nas condições do ponto central.

De acordo com a Tabela 5, que mostra uma comparação entre o cultivo microbiano conduzido no biorreator, correspondente à condição do ponto central (200 rpm, 1 vvm), e o cultivo em frascos agitados conforme MACHADO JR. et al. (2009), utilizando meio de cultivo de mesma composição e mesma temperatura de incubação (30°C), observou-se que houve diferença significativa entre os cultivos microbianos em frascos agitados e em biorreator, com respeito aos parâmetros do crescimento celular avaliados ( $X_{máx}$ ,  $\mu_{máx}$  e produtividade), demonstrando que as condições de aeração e agitação estabelecidas e o controle de pH tiveram impacto positivo sobre o crescimento celular.

**Tabela 5:** Comparação\* entre cultivos de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 conduzidos em biorreator de bancada e em frascos agitados.

Parâmetro	Método de Cultivo**	
	Biorreator de Bancada	Frascos Agitados
$X_{m\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> )	19,14 ± 0,06 <sup>a</sup>	15,74 ± 0,29 <sup>b</sup>
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	0,72 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,07 <sup>b</sup>
Prod (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0,37 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>

$X_{m\acute{a}x}$  - Concentração de biomassa máxima;  $\mu_{m\acute{a}x}$  - Velocidade específica máxima de crescimento; Prod.- Produtividade.

\* Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas entre colunas a 95% de confiança.

\*\* Experimentos em triplicata

### 3.3. Caracterização Físico-Química da Biomassa

A Tabela 6 apresenta os resultados da caracterização físico-química realizada nas biomassas da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 obtidas no término dos cultivos.

**Tabela 6:** Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com valores codificados (reais) e respostas obtidas para a composição da biomassa (em base seca).

Exp.	$X_1$ (rpm)	$X_2$ (vvm)	Proteína (%) *	Lipídios (%) *	Fibras (%) *	Cinzas (%) *
1	-1 (100)	-1 (0,5)	12,13	5,48	0,30	21,38
2	+1 (300)	-1 (0,5)	12,07	5,68	0,55	17,73
3	-1 (100)	+1 (1,5)	12,21	5,96	0,29	23,21
4	+1 (300)	+1 (1,5)	13,17	5,28	0,14	18,12
5	0 (200)	0 (1)	13,55	7,88	0,63	23,06
6	0 (200)	0 (1)	13,40	7,86	0,49	22,97
7	0 (200)	0 (1)	13,70	7,87	0,78	22,73

\* Valores médios das análises realizadas em triplicata.

Pode-se observar que a biomassa de levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 apresentou teores bastante elevados de lipídios e cinzas, em comparação, por exemplo, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (0,5% e 4,6%, respectivamente, de acordo com YAMADA e SGARBIERI, 2005). Desta forma, pode constituir fonte

importante de lipídios e minerais em formulações animais, comparado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada.

PAPANIKOLAOU et al. (2008) conseguiram 6-14% de lipídios durante a fase estacionária do cultivo de *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109 em meio contendo glicerina residual (45,9 g.L<sup>-1</sup>). Já PAPANIKOLAOU et al. (2002), produziram biomassa na concentração de 6-7,5 g.L<sup>-1</sup> contendo 5-10% de lipídios no cultivo em frascos agitados com *Yarrowia lipolytica* LGAM SC711. Ao cultivar o mesmo micro-organismo em modo contínuo, a proporção de lipídios subiu para 43%.

Quanto à proteína, ZHENG et al. (2005) atingiram conteúdo protéico de 26% para a levedura *Candida utilis* OZ993 em meio contendo resíduo da produção de salada. CHOI e PARK (2003) verificaram maior conteúdo protéico (36,5%) utilizando a levedura *Pichia stipitis* CBS 5776 em meio contendo resíduo da produção de chucrute como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

As Tabelas 7 e 8 apresentam a análise de efeitos das variáveis sobre o conteúdo protéico e lipídico, respectivamente.

Pela análise da Tabela 7, a 95% de confiança (p<0,05), observou-se que o incremento de nenhuma variável apresentou efeito significativo sobre o conteúdo protéico.

**Tabela 7:** Efeitos das variáveis estudadas sobre o conteúdo protéico (%).

Fator	Efeito	EP	t(3)	p
Média	12,89	0,33	38,57	<0,001
X <sub>1</sub>	0,45	0,88	0,50	0,64
X <sub>2</sub>	0,59	0,88	0,66	0,55
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	0,51	0,88	0,57	0,60

X<sub>1</sub> – Agitação; X<sub>2</sub> – Aeração; EP – Erro Padrão.

**Tabela 8:** Efeitos das variáveis estudadas sobre o conteúdo lipídico (%).

Fator	Efeito	EP	t(2)	p
Média	5,60	0,005	1120,00	<0,001
Curv.	4,54	0,015	297,21	<0,001
X <sub>1</sub>	-0,24	0,010	-24,00	0,002
X <sub>2</sub>	0,04	0,010	4,00	0,057
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	-0,44	0,010	-44,00	<0,001

X<sub>1</sub> – Agitação; X<sub>2</sub> – Aeração; EP – Erro Padrão; Curv. – Curvatura.

Com relação ao teor de lipídios, pela análise da Tabela 8, observou-se que o incremento da agitação de 100 rpm (nível -1) para 300 rpm (nível +1) bem como a interação entre agitação e aeração resultaram em decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de lipídios de 0,24% e 0,44%, respectivamente.

Pode-se observar também que a análise realizada para a significância estatística da curvatura exerceu um efeito significativo sobre o conteúdo de lipídios da mesma forma que na produção de biomassa máxima, provavelmente indicando que um modelo de segunda ordem ajustaria bem os dados do processo ( $R^2 = 0,9999$ ), com maior conteúdo de lipídios nas condições do ponto central, conforme observado experimentalmente neste trabalho.

Portanto, a melhor condição para obtenção de biomassa como fonte de proteínas e lipídios é a condição do ponto central, 1,0 vvm de aeração e 200 rpm de agitação.

### **3.3.1. Determinação do perfil de ácidos graxos**

A Tabela 9 apresenta a composição de ácidos graxos da fração de lipídios obtidos da biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, cultivada em meio contendo glicerina residual como fonte de carbono, na condição do ponto central do planejamento experimental proposto (200 rpm de agitação; 1 vvm de aeração).

**Tabela 9:** Perfil de ácidos graxos detectados (%) da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 cultivada em meio contendo glicerina residual como fonte de carbono.

<i>Yarrowia lipolytica</i> NRRL YB-423	
Ácidos graxos saturados	
C15:0	0,38
C16:0	0,41
C17:0	12,19
C18:0	0,12
C20:0	0,18
C23:0	0,23
C24:0	1,90
Ácidos graxos monoinsaturados	
C17:1	9,31
C18:1 cis	1,78
C18:1 trans	6,36
C20:1 n-9	1,03
C22:1 n-9	0,44
C24:1 n-9	0,46
Ácidos graxos poli-insaturados	
C18:2 cis	49,16
γ C18:3 n-6	12,75
α C18:3 n-3	0,14
C20:2	0,39
C22:2	0,11
Não-identificados	2,66

Através da Tabela 9, pode-se observar que a proporção de ácidos graxos saturados (AGS) obtida para a *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 foi de apenas 15,41%, destacando-se o ácido heptadecanóico (C17:0), e o conteúdo em ácidos graxos monoinsaturados (AGM) foi de 19,39%, com destaque para o ácido cis-10-heptadecanóico (C17:1). Já os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) foram os produzidos em maior quantidade, 62,55%, sendo que 49,16% correspondeu ao ácido linoléico (C18:2 cis), mas com quantidade apreciável de ácido γ - linolênico (C18:3 n-6), cerca de 12,75%.

Esta composição difere muito da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pois esta apresenta grande percentual de ácidos graxos saturados (42,71%), com destaque para o ácido palmítico (24,60%), e menor proporção de poli-insaturados (28,9% de ácido linoléico) (YAMADA e SGARBIERI, 2005).

Comparando com dados disponíveis para *Yarrowia lipolytica*, pode ser citado o trabalho de PAPANIKOLAOU et al. (2008) que, utilizando glicerina residual (45,9 g.L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono, conseguiram biomassa de *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109, contendo 6-14% de lipídios com 20,2% de ácido linoléico e 44,9% de ácido oléico. PAPANIKOLAOU et al. (2002), com a levedura *Yarrowia lipolytica* LGAM SC711 cultivada em frascos agitados, atingiu resultados similares quanto à composição de ácidos graxos (21±3 % e 47±4 % para ácido linoléico e oléico, respectivamente), a partir de um meio contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerina e relação molar C/N de 100.

No entanto, BEAPOULOS et al. (2009) comentam que *Yarrowia lipolytica* acumula lipídios em menor proporção em relação a outros gêneros, mas é a única capaz de acumular alta proporção de ácido linoléico (acima de 50%), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. Além disso, é importante frisar que a composição do meio influi na composição dos ácidos graxos (ATHENSTAEDT et al., 2006). As fontes de carbono, nitrogênio, íons metálicos, temperatura e pH são fatores que podem afetar a sua composição. Isto implica que a composição dos lipídios pode ser manipulada, resultando em elevadas porcentagens dos ácidos graxos de interesse (DYAL e NARINE, 2005).

Os ácidos graxos poli-insaturados podem atuar na prevenção e tratamento de muitas doenças cardiovasculares, redução da pressão arterial, redução dos níveis de colesterol e triacilglicerídios no plasma, câncer, e, além disso, são considerados essenciais tanto para nutrição infantil quanto para o desenvolvimento cerebral (TAKAHASHI, 2005).

O ácido linoléico (C18:2) é essencial para um crescimento e desenvolvimento saudável do organismo, desempenhando também um papel importante na redução de risco de doenças cardiovasculares e do colesterol, função vascular e sistema imunológico. Os ácidos graxos poli-insaturados, como o linoléico e seus derivados, que formam a família dos ácidos graxos ω6 e principalmente o ácido graxo linolênico (C18:3) e seus derivados que formam a família dos ácidos graxos ω3, são considerados essenciais, porque os mamíferos não podem sintetizá-los, necessitando obtê-los via dieta. O ácido linoléico (C18:2) é essencial para o crescimento e reprodução e o linolênico (C18:3), essencial para as funções cerebrais e da retina (GEAY et al., 2001).

GUTIERREZ e SILVA (1993) comentam que há necessidade de suplementação de ácidos graxos essenciais, como o ácido linoléico, em alimentação animal. A utilização de ácido linoléico conjugado em dietas de tilápia-do-nilo promoveu melhora no ganho de peso, aumento no consumo de ração e melhora na conversão alimentar, afetando a proporção de ácidos graxos nos filés e fígado, e aumentando o

conteúdo protéico dos filés (SANTOS et al., 2007). Além disso, os lipídios são fundamentais para o desenvolvimento de larvas de peixes como o jundiá (ULIANA et al., 2001). BARRETO et al. (2006) comentam ainda que a composição dos ácidos graxos de ovos pode ser alterada com a manipulação da dieta das aves. RIBEIRO et al. (2007) avaliaram o efeito dos níveis do ácido linoléico presente na dieta de matrizes, verificando que o peso dos ovos e o percentual de ácido linoléico nas gemas aumentaram com a inclusão de 1,93% deste ácido graxo.

Esta suplementação, em geral, se dá por óleos de origem vegetal, como os óleos de soja, linhaça, canola, arroz, milho e girassol, mas há um crescente interesse por novas fontes de ácidos graxos essenciais e muita atenção tem sido voltada para os micro-organismos denominados oleaginosos (CAZETTA e CELLIGOI, 2005). GUTIERREZ e SILVA (1993) comentam que leveduras podem constituir uma fonte importante de suplementação destes nutrientes em formulações de rações.

Desta forma, com base no acima exposto, a levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 mostra-se promissora como fonte de ácidos graxos poli-insaturados considerados essenciais, em particular o ácido linoléico, podendo constituir uma fonte alternativa deste ácido graxo em formulações de alimentos e rações.

### **3.3.2. Análise do perfil de aminoácidos**

As Tabelas 10 e 11 apresentam os resultados da análise do perfil de aminoácidos realizada na biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 obtida em cultivo em que a fonte de carbono foi a glicerina residual.

Dentre os aminoácidos não-essenciais, os mais abundantes na proteína de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 foram o ácido glutâmico, a prolina e o ácido aspártico, que apresentaram os teores de  $8,94 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ,  $8,58 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  e  $7,74 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 10:** Aminoácidos não-essenciais presentes na biomassa de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 cultivada em meio à base de glicerina residual.

Aminoácido	Teor (g.100g <sup>-1</sup> de proteína)
Ácido aspártico	7,74
Ácido glutâmico	8,94
Serina	4,45
Glicina	5,15
Arginina	4,64
Alanina	3,14
Prolina	8,58

**Tabela 11:** Aminoácidos essenciais presentes na biomassa de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 cultivada em meio à base de glicerina residual e escore químico.

Aminoácido	Teor (g.100g <sup>-1</sup> de proteína)	Escore Químico	FAO/WHO*
Histidina	1,75	0,92	1,9
Treonina	4,42	1,30	3,4
Tirosina + fenilalanina	6,64	1,05	6,3
Valina	4,96	1,42	3,5
Metionina +Cistina	1,42	0,57	2,5
Isoleucina	3,98	1,42	2,8
Leucina	5,80	0,88	6,6
Triptofano	0,80	0,73	1,1
Lisina	6,79	1,17	5,8

\* Referência FAO/WHO para crianças de 2 a 5 anos de idade.

De acordo com a Tabela 11, os aminoácidos sulfurados (metionina + cistina) são os mais limitantes, apresentando um escore químico de 0,57, em comparação com o padrão da FAO/WHO (1989) para o estágio de vida de 2 a 5 anos de idade. CHAUD (2004) relata a limitação de aminoácidos sulfurados em proteína de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, mesmo as derivadas de cervejaria.

Dentre os aminoácidos essenciais, a proteína da biomassa de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 é particularmente rica em isoleucina, valina, treonina e lisina. Por este motivo, pode complementar muito bem o perfil de aminoácidos dos cereais. De acordo com PIRES et al. (2006), trigo e milho apresentam a lisina como

aminoácido mais limitante (escore químico de 0,45), bem como isoleucina, metionina+cisteína, treonina e valina.

#### 4. CONCLUSÃO

A levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 apresentou potencial para assimilação, como fonte de carbono, da glicerina residual gerada na síntese de biodiesel para a produção de biomassa como fonte de nutrientes. Verificou-se que as variáveis estudadas, agitação e aeração, apresentaram efeitos significativos sobre a produção de biomassa máxima e teor de lipídios e não apresentaram efeitos significativos sobre o conteúdo protéico, sendo que os melhores resultados foram obtidos com 200 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração, atingindo-se 19,14 g.L<sup>-1</sup> de concentração de biomassa máxima média, conteúdo protéico e de lipídios de 13,55% e de 7,87%, respectivamente.

Com base em parâmetros do crescimento celular, o cultivo em biorreator de bancada implicou em melhoria do desempenho da levedura quando comparado ao cultivo em frascos agitados, resultando em um incremento na concentração de biomassa máxima de 15,7 para 19,1 g.L<sup>-1</sup>, na velocidade específica máxima de 0,47 para 0,72 h<sup>-1</sup>, e na produtividade de 0,11 para 0,37 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Com base na determinação do perfil de ácidos graxos e aminoácidos, a biomassa mostrou-se fonte promissora de ácidos graxos essenciais, em particular o ácido linoléico (49,16%), e aminoácidos essenciais como isoleucina, valina, treonina e lisina, que apresentaram escores químicos superiores ao padrão FAO/WHO, respectivamente 1,42, 1,42, 1,30 e 1,17.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-WIDYAN, M. I.; AL-SHYOUKH, A. O. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 85, p. 253-256, 2002.

AMARAL, P. F. F. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 220 p. 2007.

AOAC, **Official Methods of Analysis** (17<sup>th</sup> edn). Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.

ARANDA, D. Do biodiesel à biorrefinaria. **Revista BiodieselBr**, v. 12, set/out 2009.

ATHENSTAEDT, K.; JOLIVET, P.; BOULARD, C.; ZIVY, M.; NEGRONI, L.; NICAUD, J. M.; CHARDOT, T. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. **Proteomics**, v. 6, p. 1450-1459, 2006.

BARRETO, S. C. S.; ZAPATA, J. F. F.; FREITAS, E. R.; FUENTES, M. F. F.; NASCIMENTO, R. F.; ARAÚJO, R. S. R. M.; AMORIM, A. G. N. Ácidos graxos da gema e composição do ovo de poedeiras alimentadas com rações com farelo de coco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1767-1773, 2006.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Review**, v. 19, p. 219–237, 1997.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; JOUVE, C. M.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 48, p. 375-387, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC. Métodos analíticos para controle de alimentos para uso animal. INTERLAB VI. Portaria 108, de 4 de setembro de 1991. **Diário Oficial da União**, seção I, p. 1981317 de setembro de 1991.

BURKERT, J. F. M. Otimização das condições de produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL – Y552. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 172 p. 2003.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 341-351, 2000.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por

leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, p. 105-112, 2005.

CHAUD, S. G. Fracionamento e caracterização química da parede celular de levedura – propriedades funcionais e fisiológicas das frações. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 224 p. 2004.

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

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

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; SABIO, E.; RAMIRO, M. J.; Preparation and properties of biodiesel from *Cynara cardunculus* L. Oil. **Industrial e Engineering Chemistry Research**, v. 38, p. 2927-2931, 1999.

FAO/WHO. Protein quality evaluation. Report of the joint FAO/WHO expert consultation, food and nutrition paper 51. **Food and Agriculture Organization and World Health Organization**. Rome, Italy, 1989.

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**, v. 28, p. 19-23, 2005.

GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J. F.; CULIOLI J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, p. 1–26, 2001.

GEON-HO,L.; BAE, J.H.; SUH, M.J.; KIM, I.H.; HOU, C.T.; KIM, H.R. New finding and optimal production of a novel extracellular alkaline lipase from *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 1054-1057, 2007.

GERPEN, J. V.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. Biodiesel Production Technology. National Renewable Energy Laboratory.

Disponível em: < <http://www.nrel.gov>>. Acesso em 28 de junho de 2010.

GUTIERREZ, L. E.; SILVA, R. C. M. Fatty acid composition of cane molasses and yeasts. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 473-477, 1993.

HARTEN, B. Uso de centrífugas para los procesos de biodiesel. **Aceites & Grasas**, v.13, p. 98-105, 2003.

MACHADO JR, F. R. S.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Influência da composição do meio de inóculo e da temperatura na produção de biomassa de leveduras a partir da glicerina bruta. In: **Anais do I Seminário sobre Biodiesel e Co-produtos**, p. 72-77, ITAL, Campinas, 2009.

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

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

MUSHRUSH, G.; BEAL, E. J.; SPENCER, G.; WYNNE, J. H.; LLOYD, C. L.; HUGHES, J. M.; WALL, C. L.; HARDY, D. R. An environmentally benign soybean derived fuel as a blending stock or replacement for home heating oil. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 36, p. 613-622, 2001.

MUSIAL, I.; RYMOWICZ, W.; CIBIS, E. Optimization of single-cell-biomass production by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology and pulse method. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 7, 2004.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M.; Biotransformação de Óleos e Gorduras. **Biociência**, v. 19, p. 28-31, 2001.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil.

**Biomass & Bioenergy**, v. 32, p. 60-71, 2008.

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

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 179-187, 2006.

RIBEIRO, B. R. C.; LARA, L. J. C.; BAIÃO, N. C.; LOPEZ, C. A. A.; FIUZA, M. A.; CANÇADO, S. V.; SILVA, G. M. M. Efeito do nível de ácido linoléico na ração de matrizes pesadas sobre o peso, composição e eclosão dos ovos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 789-796, 2007.

SANTOS, E. O. Aproveitamento do glicerol gerado na síntese de biodiesel para produção de biomassa de leveduras. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 80 p. 2009.

SANTOS, L. D.; FURUYA, W. M.; MATSUSHITA, M.; SILVA, L. C. R.; SILVA, T. S. C.; BOTARO, D. Ácido linoléico conjugado (CLA) em dietas para tilápia-do-nilo: desempenho produtivo, composição química e perfil de ácidos graxos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1481-1488, 2007.

SHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, M.; Transesterification of Vegetable Oils: a Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p.199-210, 1998.

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

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 1412-1415, 1967.

TAKAHASHI, N. S. Importância dos ácidos graxos essenciais (2005). Instituto de Pesca de São Paulo.

Disponível em: < <http://www.pesca.sp.gov.br>>. Acesso em 29 de junho de 2010.

ULIANA, O.; SILVA, J. H. S. S.; RADÜNZ NETO, J. Substituição parcial ou total de óleo de canola por lecitina de soja em rações para larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*), *pisces, pimelodidae*. **Ciência Rural**, v. 31, p. 677-681, 2001.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag System for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, p. 170-177, 1986.

YAMADA, E. A.; SGARBIERI, V. C. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein concentrate: Preparation, chemical composition, and nutritional and functional properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3931-3936, 2005.

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

ZHENG, S.; YANG, M.; YANG, Z. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1183-1187, 2005.

**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSÕES GERAIS**

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

A levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 foi capaz de utilizar glicerina residual proveniente da síntese do biodiesel, como fonte de carbono, para a produção de biomassa como fonte de nutrientes.

No cultivo em frascos agitados, apesar de não haver diferenças significativas entre os meios testados para o preparo do inóculo, foi selecionado para a obtenção do inóculo o meio com mesma composição para produção de biomassa, contendo (g.L<sup>-1</sup>): 33,9 glicerina p.a; 0,6 extrato de levedura; 5,5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 peptona; 5,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,25 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,021 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e pH inicial ajustado em 4,8. Quanto à temperatura, o melhor crescimento foi observado a 25°C, resultando em uma concentração de biomassa máxima de 17,7 g.L<sup>-1</sup>.

No biorreator de bancada, verificou-se que as variáveis estudadas, agitação e aeração, apresentaram efeitos significativos sobre a produção de biomassa máxima e teor de lipídios e não apresentaram efeitos significativos sobre o conteúdo protéico, sendo que os melhores resultados foram obtidos com 200 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração, atingindo-se 19,14 g.L<sup>-1</sup> de concentração de biomassa máxima média, conteúdo protéico e de lipídios de 13,55% e de 7,87%, respectivamente.

Com base em parâmetros do crescimento celular, o cultivo em biorreator de bancada implicou em melhoria do desempenho da levedura quando comparado ao cultivo em frascos agitados, resultando em um incremento na concentração de biomassa máxima de 15,74 para 19,14 g.L<sup>-1</sup>, na velocidade específica máxima de 0,47 para 0,72 h<sup>-1</sup>, e na produtividade de 0,11 para 0,37 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Com base na determinação do perfil de ácidos graxos e aminoácidos, a biomassa mostrou-se fonte promissora de ácidos graxos essenciais, em particular o ácido linoléico (49,16%) e aminoácidos essenciais como isoleucina, valina, treonina e lisina, que apresentaram escores químicos superiores ao padrão FAO/WHO, respectivamente 1,42, 1,42, 1,30 e 1,17.

**CAPÍTULO V**  
**SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

## 5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar o processo, em termos de composição do meio de produção, aeração e agitação, a fim de maximizar o conteúdo de lipídios;
- Verificar o impacto das variáveis do processo sobre o perfil de ácidos graxos;
- Caracterizar a biomassa em termos de conteúdo vitamínico e minerais presentes;
- Verificar a digestibilidade da biomassa produzida;
- Explorar o cultivo de *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 visando a produção de ácidos orgânicos e enzimas tendo glicerina residual como fonte de carbono.

**CAPÍTULO VI**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIQUIM – **Associação Brasileira da Indústria Química**. São Paulo – SP, Brasil.  
Disponível em: < <http://www.abiquim.org.br> >. Acesso em 14 de novembro de 2008.
- ACCARINI, J. H. Competitivo e sustentável. **Revista BiodieselBr**, v. 12, set/out 2009.
- AL-WIDYAN, M.I.; AL-SHYOUKH, A.O. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 85, p. 253-256, 2002.
- AMARAL, P. F. F. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 220 p. 2007.
- AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.
- ANP - **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Brasília – DF, Brasil.  
Disponível em: <[www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br)>. Acesso em 15 de outubro de 2008.
- ANUPAMA, P.; RAVINDRA. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459-479, 2000.
- AOAC, **Official Methods of Analysis** (17<sup>th</sup> edn). Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.;LIMA, U.A. *Biotecnologia Industrial*. V. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.
- ARANDA, D. Do biodiesel à biorrefinaria. **Revista BiodieselBr**, v. 12, set/out 2009.
- ARMILIATO, L. Produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* NRRL 1095. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 88 p. 2004.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, São Paulo, nº 26, p. 56-62, 2006.

ATHENSTAEDT, K.; JOLIVET, P.; BOULARD, C.; ZIVY, M.; NEGRONI, L.; NICAUD, J. M.; CHARDOT, T. Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. **Proteomics**, v. 6, p. 1450-1459, 2006.

BABEL, W.; HOFMANN, K. H. The Relation Between the Assimilation of Methanol and Glycerol in Yeasts. **Archives of Microbiology**, v. 132, p. 179-184, 1982.

BARRETO, S. C. S.; ZAPATA, J. F. F.; FREITAS, E. R.; FUENTES, M. F. F.; NASCIMENTO, R. F.; ARAÚJO, R. S. R. M.; AMORIM, A. G. N. Ácidos graxos da gema e composição do ovo de poedeiras alimentadas com rações com farelo de coco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1767-1773, 2006.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Review**, v. 19, p. 219–237, 1997.

BELLUCO, A. E. S. Obtenção de leveduras vivas enriquecidas para suplementação nutricional e probiótico **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, 96 p. 2008.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; JOUVE, C. M.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 48, p. 375-387, 2009.

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

BORZANI, W. Biodiesel e glicerina. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, p. 22-23, 2007.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. **Tecnologia das Fermentações**. Volume 1, São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1975.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial – Fundamentos**. v.1. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.

BOUÇAS, C. **Glicerina de biodiesel inunda mercado no país e derruba preços.** Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>.> Acesso em 04 de julho de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Fundação de Ciência e Tecnologia – CIENTEC. Métodos analíticos para controle de alimentos para uso animal. INTERLAB VI. Portaria 108, de 4 de setembro de 1991. **Diário Oficial da União**, seção I, p. 1981317 de setembro de 1991.

BURKERT, J. F. M. Otimização das condições de produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL – Y552. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 172 p. 2003.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 341-351, 2000.

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

CHAUD, S. G. Fracionamento e caracterização química da parede celular de levedura – propriedades funcionais e fisiológicas das frações. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 224 p. 2004.

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

COZZOLINO, S. M. F. Valor nutricional da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudo em gerações sucessivas de ratos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 154 p. 1982.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnologia: manual de microbiologia industrial**. Zaragoza: Editorial Acribia, 413 p.1993.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657-663, 2000.

DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G.; DURRENS, P.; CASAREGOLA, S.; LAFONTAINE, I.; DE MONTIGNY, J.; MARCK, C.; NEUVÉGLISE, C.; TALLA, E. et al. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, p. 25-26, 2004.

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

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

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; SABIO, E.; RAMIRO, M. J.; Preparation and properties of biodiesel from *Cynara cardunculus* L. Oil. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 38, p. 2927-2931, 1999.

FAIRBANKS, M. Glicerina. **Revista Química e Derivados**, Edição nº 487, 12 p. 2009.

FAO/WHO. Protein quality evaluation. Report of the joint FAO/WHO expert consultation, food and nutrition paper 51. **Food and Agriculture Organization and World Health Organization**. Rome, Italy, 1989.

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**, v. 28, p. 19-23, 2005.

FINOGENOVA T. V.; MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V.; CHERNYAVSKAYA, O. G. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a review of prospects. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, p. 418–25, 2005.

FINOGENOVA, T. V.; KAMZOLOVA, S. V.; DEDYUKHINA, E. G.; SHISHKANOVA, N. V.; ILCHENKO, A. P.; MORGUNOV, I. G.; CHERNYAVSKAYA, O. G.; SOKOLOV, A. P. Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N1 under continuous cultivation, **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 493-500, 2002.

FURUYA, W. M.; SERON, S.; VARGAS, L.; HAYASHI, C.; FURUYA, V. R. B.; SOARES, C. M. Níveis de levedura desidratada “spray-dried” na dieta de alevinos

revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Ciência Rural*, v. 30, p. 699-704, 2000.

GAIOTTO, J. R. Utilização de levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus subprodutos na alimentação de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil, 89 p. 2005.

GAZZONI, D. L. Biodiesel no Brasil. Biodieselbr online.

Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>. Acesso em 18 de junho de 2010.

GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J. F.; CULIOLI, J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 1–26, 2001.

GERPEN, J. V.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. Biodiesel Production Technology. National Renewable Energy Laboratory.

Disponível em: <<http://www.nrel.gov>>. Acesso em 28 de junho de 2010.

GÉLINAS, P.; BARRETTE, J. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 98, 1138-1143, 2007.

GEON-HO, L.; BAE, J.H.; SUH, M.J.; KIM, I.H.; HOU, C.T.; KIM, H.R. New finding and optimal production of a novel extracellular alkaline lipase from *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 1054-1057, 2007.

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

GUTIERREZ, L. E.; SILVA, R. C. M. Fatty acid composition of cane molasses and yeasts. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 473-477, 1993.

GONZÁLEZ, J. F.; ENCINAR, J. M.; RODRÍGUEZ, J. J.; TEJEDOR, A. Biodiesel fuels from vegetable oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. oils with Ethanol. **Energy & Fuels**, v. 16, p. 443-450, 2002.

HAAS, M. J.; SCOTT, K. M.; ALLEMAN, T. L.; MCCORMICK, R. L. Engine performance of biodiesel fuel prepared from soybean soapstock: A high quality renewable fuel produced from a waste feedstock. **Energy & Fuels**, v. 15, p. 1207-1212, 2001.

HAIDER, M. M.; EL-TAJORI, N. N.; BAIU, S. H. Single cell protein production from carob pod extract by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **2 GSF Symposium of Science Faculty**, Garyounis University, Libia, 2005.

HARTEN, B. Uso de centrifugas para los procesos de biodiesel. **Aceites & Grasas**, v. 13, p. 98-105, 2003.

IMANDI, S. B.; BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; GARAPATI, H. R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1367-1372, 2007.

KAMZOLOVA, S. V.; SHISHKANOVA, N. V.; MORGUNOV, I. G.; FINOGENOVA, T. V. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Reserch**, v. 3, p. 217–222, 2003.

KAWASSE, F. M.; AMARAL, P. F.; ROCHA-LEÃO, M. H.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C.; COELHO, M. A. Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, p. 371-375, 2003.

LEE, B.; KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p. 111-124, 2001.

LEE, G.; BAE, J.; SUH, M.; KIM, HAK.; HOU, C.; KIM, I. New finding and optimal production of a novel extracellular alkaline lipase from *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 1054-1057, 2007.

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

LIMA, U. A.; SATO, S. **Proteínas de origem microbiana**. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. *Biotechnology Industrial*. v. 4. São Paulo:

Editora Edgard Blücher Ltda., p. 421-446, 2001.

LIMA, U. A.; SATO, S. **Produção de lipídios por micro-organismos**. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. *Biotechnologia Industrial*. v. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., p. 447-463, 2001.

LUE, Y. F.; YEH, Y. Y.; WU, C. H. The emission characteristics of a small d.i. diesel engine using biodiesel blended fuels. **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/ Hazardous Substances and Environmental Engineering**. v. 36, p. 845. 2001.

MACHADO JR, F. R. S.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Influência da composição do meio de inóculo e da temperatura na produção de biomassa de leveduras a partir da glicerina bruta. In: **Anais do I Seminário sobre Biodiesel e Co-produtos**, p. 72-77, ITAL, Campinas, 2009.

MACRAE, T. F.; EL-SADR, M. M.; SELLERS, K. C. The nutritive value of yeast protein: comparison of the supplementary values of yeast protein and casein for maize protein in the nutrition of the pig. **Biochemical Journal**, v. 36, p. 460-477, 1942.

MAIA, G. A. R.; FONSECA, J. B.; SOARES, R. T. R. N.; SILVA, M. A.; SOUZA, C. L. M. Desempenho de poedeiras comerciais alimentadas com levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, p.163-171, 2001.

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

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 carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 575-579, 1996.

MENANI, R. **Revista Biodiesel**, v. 19, set 2007.

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

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao Controle Estatístico de Qualidade**. 4<sup>o</sup> Edição. Editora LTC. Rio de Janeiro. 2004.

MORAES, I. O. **Produção de micro-organismos**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e enzimáticos*. v. 3. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., p. 199-217, 2002.

MOREIRA, I.; MARCOS, M. J.; FURLAN, A. C.; PATRICIO, V. M. I.; OLIVEIRA, G. C. Uso de levedura seca por “spray-dryer” como fonte de proteína para suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 962-969, 2002.

MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V.; PEREVOZNIKOVA, O. A.; SHISHKANOVA, N. V.; FINOGENOVA, T. V. Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1469-1474, 2004.

MUSHRUSH, G.; BEAL, E. J.; SPENCER, G.; WYNNE, J. H.; LLOYD, C. L.; HUGHES, J. M.; WALL, C. L.; HARDY, D. R. An environmentally benign soybean derived fuel as a blending stock or replacement for home heating oil. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 36, p. 613-622, 2001.

MUSIAL, I.; RYMOWICZ, W.; CIBIS, E. Optimization of single-cell-biomass production by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology and pulse method. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 7, 2004.

NACHILUK, K.; FREITAS, S. M. Evolução da capacidade instalada para produção de biodiesel no Brasil e auto-abastecimento regional. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 4, p. 1-5, 2009.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M. Biotransformação de óleos e gorduras. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 19, p. 28-31, 2001.

NOUREDDINI, H. System and process for producing biodiesel fuel with reduced viscosity and a cloud point below thirty-two (32) degrees Fahrenheit. **USPTO Patent Full**. United States Patent n<sup>o</sup> 6,174,501, p. 4-14, 1997.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on

industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 43-49, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.10, p. 425-435, 2007.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 80, p. 215–224, 2001.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 308–312, 2002 (a).

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, p. 60-71, 2008.

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

PÉREZ-CAMPO, F. M.; DOMÍNGUEZ, A. Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. **Current Microbiology**, v. 43, p. 429–433, 2001.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 179-187, 2006.

PLÁ, J. A. Perspectivas do biodiesel no Brasil. **Revista Indicadores Econômicos FEE**, v. 30, p.179-90, 2002.

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

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUČEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003.

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

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, p. 807–815, 2004.

RECH, R. Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 75 p. 1998.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. v. 3. Pelotas: Editora Universitária – UFPel, 2000.

RIBEIRO, B. R. C.; LARA, L. J. C.; BAIÃO, N. C.; LOPEZ, C. A. A.; FIUZA, M. A.; CANÇADO, S. V.; SILVA, G. M. M. Efeito do nível de ácido linoléico na ração de matrizes pesadas sobre o peso, composição e eclosão dos ovos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 789-796, 2007.

ROEHR, M.; KUBICEK, C. P.; KOMINEK, J. **Citric acid**. In: Roehr M, editor. *Biotechnology: products of primary metabolism*. 2<sup>nd</sup> ed. VCH Verlagsgesellschaft mbH, p. 307–345, 1996.

ROEPCKE, C. B. S. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 133 p. 2007.

ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Pretreatment of date syrup to increase citric acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p.273–276, 1997.

RUIZ-HERRERA, J.; SENTANDREU, R. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. **Archives of Microbiology**, v. 178, p. 477-483, 2002.

SANTOS, E. O. Aproveitamento do glicerol gerado na síntese de biodiesel para produção de biomassa de leveduras. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 80 p. 2009.

SANTOS, L. D.; FURUYA, W. M.; MATSUSHITA, M.; SILVA, L. C. R.; SILVA, T. S. C.; BOTARO, D. Ácido linoléico conjugado (CLA) em dietas para tilápia-do-nylo: desempenho produtivo, composição química e perfil de ácidos graxos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1481-1488, 2007.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica**. v. 2. 1<sup>o</sup> ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.

SHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, M. Transesterification of vegetable oils: A review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 9, p. 199-210, 1998.

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

SILVEIRA, L. Glicerina gerada na produção do biodiesel terá novos usos. Biodieselbr online. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>. Acesso em 05 de junho de 2008.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 1412-1415, 1967.

SUDBERY, P. E.; GOW, N. A. R.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 317-324, 2004.

SZABO, R.; ŠTOFANIKOVÁ, V. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, p. 45-50, 2002.

TAKAHASHI, N. S. Importância dos ácidos graxos essenciais (2005). Instituto de Pesca de São Paulo.

Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br>>. Acesso em 29 de junho de 2010.

TRIBOLI, E. P. D. R.; JURKIEWICZ, C. H.; BORZANI, W. Influence of the temperature on batch cultivation of *Candida utilis* IZ-1840 on a synthetic medium containing glycerol as the main carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 385-388, 1994.

ULIANA, O.; SILVA, J. H. S. S.; RADÜNZ NETO, J. Substituição parcial ou total de óleo de canola por lecitina de soja em rações para larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*), pisces, pimelodidae. **Ciência Rural**, v. 31, p. 677-681, 2001.

VASSILEV, P. M.; PENG, J. B.; HEDIGER, M. A.; BROWN, E. M. Single-channel activities of the human epithelial Ca<sup>2+</sup> transport proteins CaT1 and CaT2. **Journal of Membrane Biology**, v. 184, p. 113-120, 2001.

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

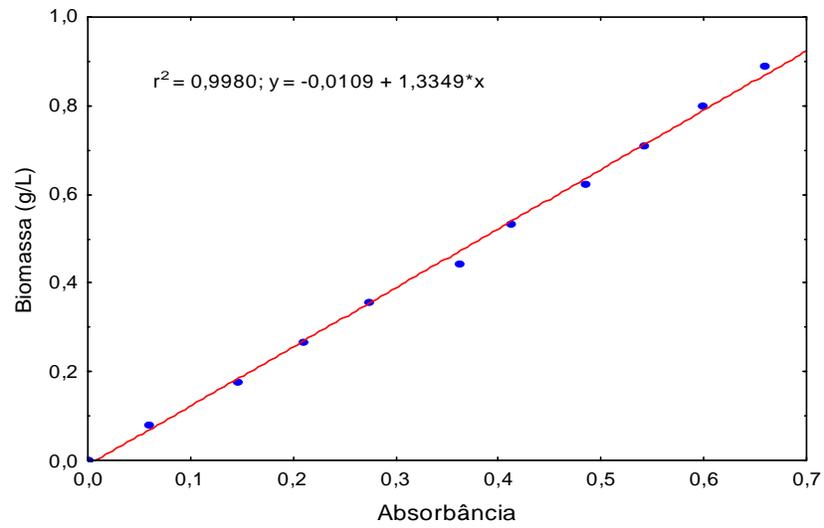
WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag System for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, p. 170-177, 1986.

YAMADA, E. A.; SGARBIERI, V. C. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein concentrate: Preparation, chemical composition, and nutritional and functional properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3931-3936, 2005.

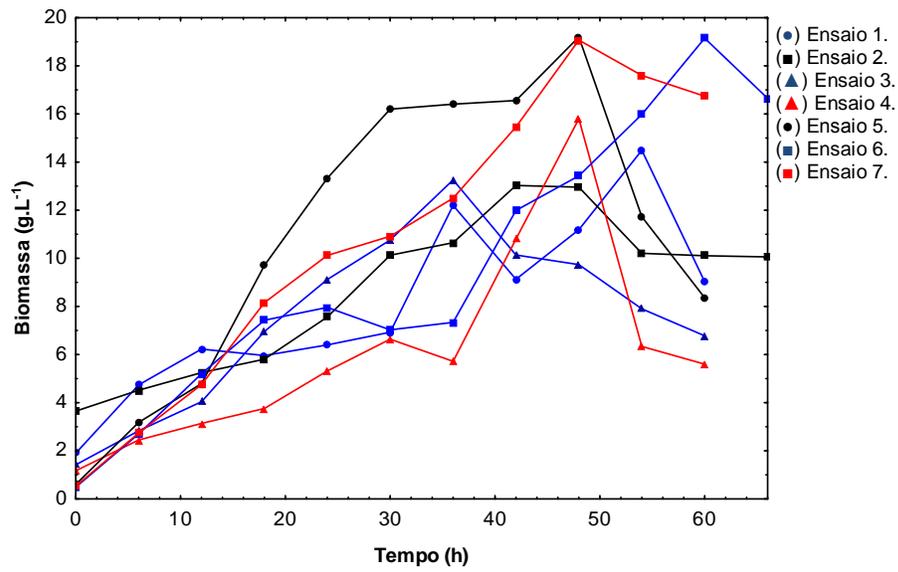
ZHANG, Y.; RITTMANN, B. E.; WANG, J.; SHENG Y.; YU, J.; SHI, H.; QIAN, Y. High-carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicalis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 857-863, 2005.

ZHENG, S.; YANG, M.; YANG, Z. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1183-1187, 2005.

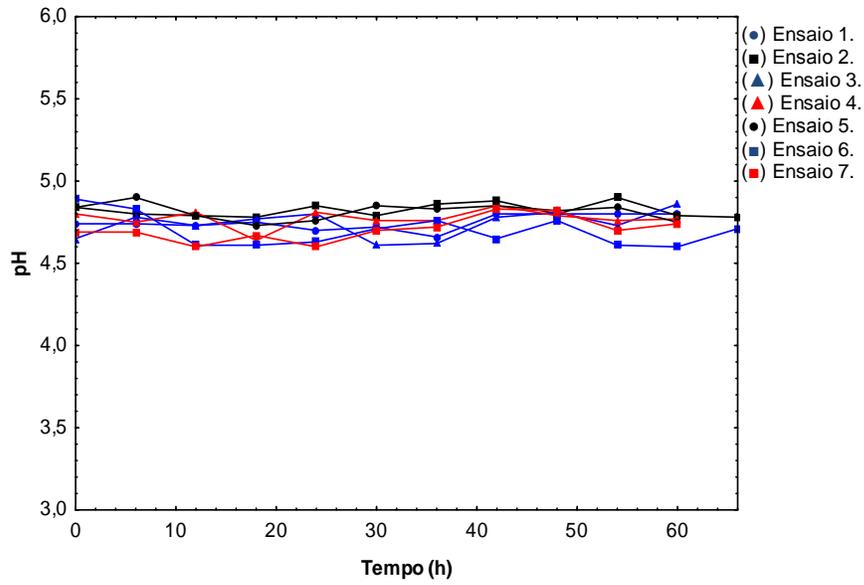
## APÊNDICE



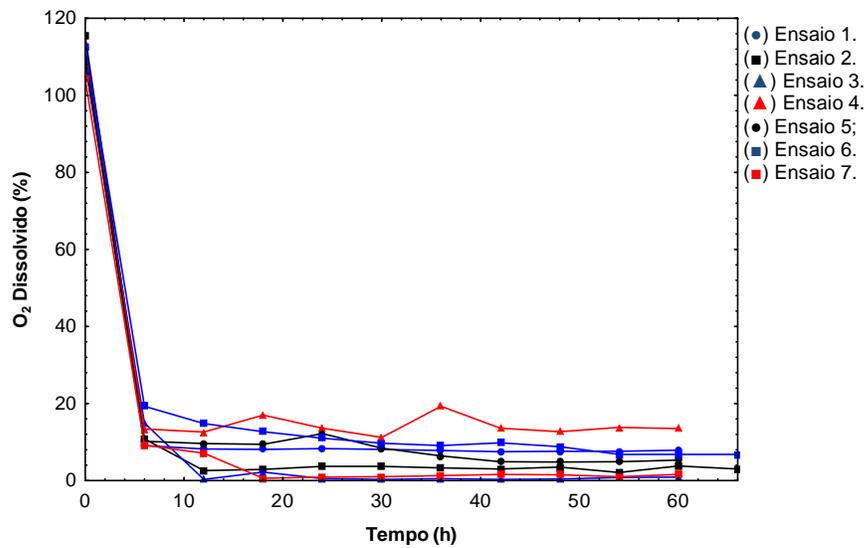
**Figura 1.** Curva padrão de biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423.



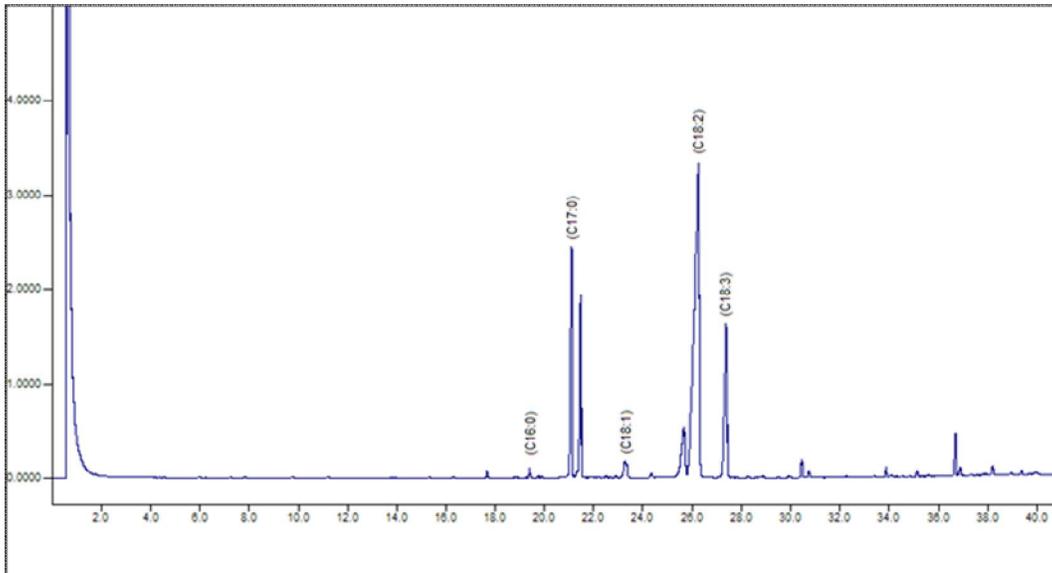
**Figura 2.** Acompanhamento do crescimento celular nos ensaios do planejamento fatorial.



**Figura 3.** Acompanhamento do pH nos ensaios do planejamento fatorial.



**Figura 4.** Acompanhamento do oxigênio dissolvido nos ensaios do planejamento fatorial.



**Figura 5.** Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423 cultivada em meio contendo glicerina residual.

**ANEXO**



## Laudo Analítico

Produto:

Glicerina Bruta

Data de carregamento:

\*\*\*

Lote:

Amostra grátis Universidade de Rio Grande

Item Analítico	Unidade	Resultado	Especificação	Métodos
Glicerol	% massa	83,08	mínimo 80	Official Monographs USP XXI
Cinzas	% massa	6,37	máximo 8,0	Official Monographs USP XXI
Cloreto de sódio	% massa	6,03	máximo 7,0	Mohr
Umidade	% massa	10,31	máximo 13,0	Karl Fisher
MONG	% massa	0,24	máximo 2,0	cálculo
pH	-	6,68	4,5 - 9,0	***

Origem do produto: 100% de origem vegetal - Óleo degomado de soja.

Larissa Garibotti

CRQ.05302605 - 5ª Região / CREA 10.471/D

VERIFICADO  
Controle de Qualidade  
BSBIOS

Passo Fundo, 21 de janeiro de 2009.

Controle de Qualidade - BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A  
BR 285, km 174, s/nº - Distrito Industrial - Passo Fundo/RS - CEP99050-000 - (0xx54)2103-7100 - www.bsbios.com

Figura 1. Laudo analítico da glicerina residual.