



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

**PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Rhodotorula mucilaginosa* EM DIFERENTES
CONDIÇÕES DE PROCESSO A PARTIR DE GLICEROL BRUTO**

RENATA NUNES PEREIRA

RIO GRANDE – RS
2018

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

**PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Rhodotorula mucilaginosa* EM DIFERENTES
CONDIÇÕES DE PROCESSO A PARTIR DE GLICEROL BRUTO**

RENATA NUNES PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da FURG, como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert

Coorientadora: Dra. Joana da Costa Ores

RIO GRANDE – RS
2018

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio incondicional em cada realização da minha vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha mãe, **Déa**, por ser a pessoa que mais acredita em mim, me apoiando incondicionalmente.

À minha família, por todo o amor e dedicação, pelas diversas orações e palavras de incentivo. Em especial ao meu tio **Robert** por me orientar nesta trajetória e nas próximas que virão com todo o amor e auxílio.

Ao Prof. **Carlos André Veiga Burkert** pela orientação, apoio e valorosos ensinamentos.

À Dr.^a **Joana da Costa Ores**, obrigada pela coorientação, pelos momentos de desabafos, pelo apoio, pela amizade, além de tudo que me ensinaste. MUITO OBRIGADA!

Aos **professores** da PPGEQ pelos ensinamentos.

Ao **Laboratório de Micotoxinas** pelas análises de ácidos graxos realizadas.

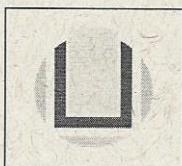
Ao pessoal do Bioprocessos e Sensorial: **Renata, Bruno, Joice, Carina, Tábita, Belkis** e agora **Carolina** e **Keslei**, por me receberem de braços abertos, fazendo parte deste grupo maravilhoso, pela convivência no laboratório e por toda a ajuda ao longo dos dois anos. Por todas as conversas e alegrias que vocês trouxeram para a minha vida.

À minha IC **Juliane Machado da Silveira**, por me ajudar quando eu mais precisava, pela paciência e pelas intermináveis análises de glicerol.

À minha amiga **Daniele Costa**, pela amizade, parceria, desabafos e conselhos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa.

A todos que fizeram parte dessa etapa: muito obrigada!

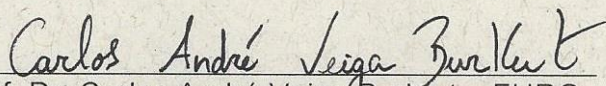


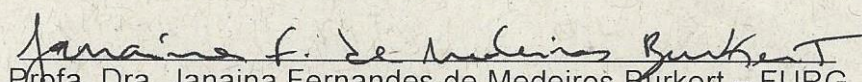
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PPG – ENGENHARIA QUÍMICA.

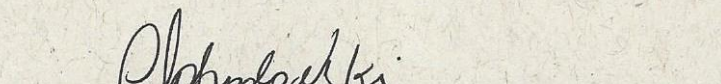
Av. Itália, km 8 – Bairro Carreiros – Rio Grande – RS – CEP: 96203-900 - E-mail -
ppgeq.sec@furg.br - Telefone (53) 3293-5437

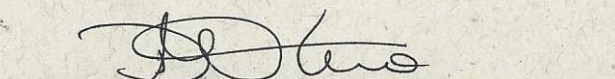
ATA DO EXAME DA DISSERTAÇÃO Nº 03/2018

Às 8:30hs do dia 26 de fevereiro de 2018 reuniu-se na sala 1104 do Prédio 1, do Campus Carreiros desta Universidade, a Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado, constituída para o exame da dissertação intitulada “PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Rhodotorula mucilaginosa* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PROCESSO A PARTIR DE GLICEROL BRUTO”, da Engenheira Química Renata Nunes Pereira, matrícula número 111973, tendo como orientador o Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert. As argumentações apresentadas demonstram que a aluna tem domínio do conhecimento utilizado na sua Dissertação. Portanto, a Comissão a considera APROVADA e APTA para receber o Título de MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA e recomenda que esta ata acompanhe os documentos necessários para a emissão do referido título.


Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG


Profa. Dra. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert – FURG


Profa. Dra. Christiane Saraiva Ogródowski – FURG


Dra. Deborah Murowaniecki Otero – UFPEL

EPÍGRAFE

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

Os óleos microbianos se destacam como alternativa de matéria-prima para obtenção de biodiesel, assim como outras aplicações. Estes óleos podem ser oriundos de microalgas, bactérias e leveduras. Contudo, as leveduras oleaginosas, como *Rhodotorula mucilaginosa*, se destacam por apresentarem alta taxa de crescimento e capacidade de assimilação de diversos substratos. Assim, o glicerol bruto gerado na produção de biodiesel é proposto como uma fonte de carbono promissora, também contribuindo para a sustentabilidade da cadeia produtiva do biocombustível. Além da fonte de carbono, diversos fatores influenciam no crescimento microbiano, como o modo de cultivo, podendo ser em batelada, batelada alimentada ou contínuo. A batelada alimentada apresenta algumas vantagens, como evitar a ação inibitória do substrato sobre o crescimento microbiano, favorecendo a obtenção de alta densidade celular. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* de acumular lipídios utilizando como fonte de carbono o glicerol bruto, investigando diferentes estratégias de alimentação no cultivo em batelada alimentada visando à obtenção de biomassa lipídica. Os cultivos foram realizados em frascos agitados incubados a 25 °C e 180 rpm, sendo avaliados dois meios de cultivo, o meio A (36,62 g L⁻¹ glicerol bruto; 5,0 g L⁻¹ KH₂PO₄; 1,0 g L⁻¹ Na₂HPO₄; 3,0 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 1,2 g L⁻¹ extrato de levedura) e o meio B (10,4 g L⁻¹ glicerol bruto; 4,3 g L⁻¹ peptona; 2,6 g L⁻¹ extrato de malte; 3,4 g L⁻¹ extrato de levedura). O cultivo M48A (alimentação de meio em 48 h, 72 h e 96 h) foi o que apresentou melhor desempenho para o meio A, resultando em um aumento de 112 % na biomassa, 108 % nos lipídios totais e 100 % na produtividade de lipídios em relação à batelada simples (BS-A). Para o meio B, a estratégia com melhor resultado foi YMG5 (alimentação de glicerol bruto em 24 h, 96 h e 144 h, com adição de magnésio no meio de cultivo inicial), apresentando lipídios totais produzidos 20 vezes maiores que o processo em batelada para o meio B (BS-B). Além disso, esta estratégia promoveu um aumento de 1,2 vezes na biomassa e conteúdo lipídico, e 1,5 vezes nos lipídios totais, em comparação à melhor condição para o meio A. Portanto, a melhor condição obtida neste estudo foi YMG5, resultando em conteúdo lipídico de 51,0 ± 0,3 %, concentração de biomassa de 21,00 ± 0,48 g L⁻¹, lipídios totais de 10,72 ± 0,18 g L⁻¹ e produtividade de lipídios de 0,037 ± 0,001 g L⁻¹ h⁻¹. Em relação aos ácidos graxos presentes nos óleos microbianos deste trabalho, para ambas as condições, o ácido linoleico foi o principal ácido graxo obtido. Assim, o presente trabalho demonstrou que os cultivos em batelada alimentada resultaram em maior crescimento microbiano e lipídios totais que os cultivos em batelada simples, podendo ser vista como uma alternativa promissora à produção de óleos vegetais.

Palavras-chave: Estratégias de alimentação. Leveduras oleaginosas. Lipídios microbianos. Glicerol residual. Biodiesel.

ABSTRACT

Microbial oils stand out as an alternative of raw material to obtain biodiesel, as well as other applications. These oils may come from microalgae, bacteria and yeasts. However, oleaginous yeasts, such as *Rhodotorula mucilaginosa*, stand out due to their high growth rate and capacity of assimilation of various substrates. Thus, the crude glycerol generated in the production of biodiesel is proposed as a viable carbon source, also contributing to the sustainability of the biofuel production chain. Besides the carbon source, several factors influence microbial growth, such as cultivation mode, which can be batch, fed-batch or continuous. The fed-batch one presents some advantages, like avoiding the inhibitory effect of the substrate on the microbial growth, favoring the obtainment of high cellular density. In this context, the present work aims to evaluate the ability of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* to accumulate lipids using as carbon source crude glycerol, investigating different feeding strategies in fed-batch cultivation to obtain lipid biomass. The cultivations were performed in shaken flasks at 25 °C and 180 rpm, being evaluated two culture media, medium A (36.62 g L⁻¹ crude glycerol; 5.0 g L⁻¹ KH₂PO₄; 1.0 g L⁻¹ Na₂HPO₄; 3.0 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 1.2 g L⁻¹ yeast extract) and medium B (10.4 g L⁻¹ crude glycerol; 4.3 g L⁻¹ peptone; 2.6 g L⁻¹ malt extract; 3.4 g L⁻¹ yeast extract). The M48A culture (medium feeding at 48 h, 72 h and 96 h) presented the best performance for medium A, resulting in an increase of 112 % in biomass, 108 % in total lipids and 100 % in lipid productivity in relation to the batch process (BS-A). For medium B, the strategy with the best result was YMG5 (crude glycerol feeding at 24 h, 96 h and 144 h, with addition of magnesium in the initial culture medium), presenting total lipids produced 20 times higher than the batch process for medium B (BS-B). In addition, this strategy promoted a 1.2-fold increase in biomass and lipid content, and 1.5-fold in total lipids, compared to the best condition for medium A. Therefore, the best condition obtained in this study was YMG5, resulting in lipid content of 51.0 ± 0.3 %, biomass concentration of 21.00 ± 0.48 g L⁻¹, total lipids of 10.72 ± 0.18 g L⁻¹ and lipid productivity of 0.037 ± 0.001 g L⁻¹ h⁻¹. In relation to the fatty acids present in the microbial oils of this work, for both conditions, linoleic acid was the main fatty acid obtained. Thus, the present work demonstrated that batch fed cultures resulted in greater microbial growth and total lipids than simple batch cultures, and it can be seen as a promising alternative to the production of vegetable oils.

Keywords: Feeding strategies. Oleaginous yeasts. Microbial lipids. Raw glycerol. Biodiesel.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais resíduos de ácidos graxos obtidos por diferentes leveduras oleaginosas.	15
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos de alguns óleos vegetais.	16
Tabela 3 - Conteúdo lipídico acumulado por diferentes leveduras no processo em batelada, em frascos agitados.	24
Tabela 4 - Conteúdo lipídico acumulado por diferentes leveduras em batelada alimentada.	27
Tabela 5 - Estratégias de alimentação em batelada alimentada com meio A empregadas no presente estudo.	32
Tabela 6 - Estratégias de alimentação em batelada alimentada com meio B empregadas no presente estudo.	33
Tabela 7 - Comparação dos cultivos em batelada alimentada com alimentação em 48 h e 96 h de meio e glicerol bruto, ou seja, M48, M96, G48 e G96.	39
Tabela 8 - Comparação dos cultivos em batelada alimentada com alimentação de meio em 96 h (M96), e estratégias M96A, M96B e M96C.	41
Tabela 9 - Comparação entre os cultivos em batelada alimentada: M48, M48A, M48B e M48C.	43
Tabela 10 - Comparação entre os cultivos em batelada alimentada: YMG24, YMG96, YMG1 e YMM24. Todos com tempo total de cultivo de 168 h, com exceção de YMM24 com tempo de 144 h.	48
Tabela 11 - Comparação entre os cultivos em batelada alimentada: YMG1 (em 168 h), YMG2 (em 240 h), YMG3 (em 240 h).	48
Tabela 12 - Descrição das estratégias YMG4, YMG5 e YMG6.	49
Tabela 13 - Comparação entre os cultivos em batelada alimentada com meio B.	51
Tabela 14 - Comparação dos cultivos em batelada alimentada M48A e YMG5.	54
Tabela 15 - Perfil de ácidos graxos dos lipídios obtidos ao final dos cultivos M48A e YMG5.	56
Tabela 1B - Comparação entre todos os cultivos em batelada alimentada com meio A.	74
Tabela 1C - Análise para determinação de carbono, nitrogênio e hidrogênio.	75
Tabela 2C - Calibração do equipamento utilizando material de referência certificado Acetanilida para controle de qualidade das análises de determinação de carbono, nitrogênio e hidrogênio.	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de obtenção do glicerol como coproduto da produção de biodiesel.	18
Figura 2 - Curva de crescimento do micro-organismo no cultivo em batelada simples (BS-A). Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).	37
Figura 3 – Biomassa, pH e consumo de glicerol pela levedura <i>R. mucilaginosa</i> ao longo do cultivo em batelada simples com meio A. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).	37
Figura 4 - Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura <i>R. mucilaginosa</i> em batelada alimentada, com alimentações de meio de cultivo ou glicerol bruto nos tempos de 48 h ou 96 h, com meio A. (a) Alimentação de 20 mL de glicerol em 48 h (G48). (b) Alimentação de 20 mL de meio em 48 h (M48). (c) Alimentação de 20 mL de glicerol em 96 h (G96). (d) Alimentação de 20 mL de meio em 96 h (M96). Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).	38
Figura 5 – Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura <i>R. mucilaginosa</i> em batelada alimentada para as estratégias M96A, M96B e M96C. (a) M96A: 20 mL de meio em 96 h, 10 mL em 144 h e 10 mL em 192 h. (b) M96B: 20 mL de meio em 96 h e 10 mL em 144 h. (c) M96C: 10 mL de meio em 96 h e 10 mL em 144 h. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).	41
Figura 6 – Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura <i>R. mucilaginosa</i> em batelada alimentada para as estratégias M48A, M48B e M48C. (a) M48A: 20 mL de meio em 48 h, 10 mL em 72 h e 10 mL em 96 h. M48B: 20 mL de meio em 48 h e 10 mL em 96 h. M48C: 10 mL de meio em 48 h e 10 mL de meio em 96 h. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).	42
Figura 7 - Consumo de glicerol pela levedura <i>R. mucilaginosa</i> ao longo do cultivo em batelada alimentada M48A. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3). As setas indicam a alimentação de meio de cultivo nos tempos 48 h, 72 h e 96 h.	44
Figura 8 - Curva de crescimento do micro-organismo no cultivo em batelada com meio B (BS-B). Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).	46
Figura 9 – Biomassa, pH e glicerol ao longo do cultivo da levedura <i>R. mucilaginosa</i> em batelada simples com meio B. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).	46
Figura 10 – Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura <i>R. mucilaginosa</i> em YMG24, YMG96, YMG1 e YMM24. (a) YMG24: Alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h. (b) YMG96: Alimentação de 20 mL de glicerol em 96 h. (c) YMG1: Alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h e 96 h. (d) YMM24: Alimentação de 20 mL de meio em 24 h. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).	47
Figura 11 – Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura <i>R. mucilaginosa</i> em YMG2 e YMG3. (a) YMG2: alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, 96 h e 144 h. (b) YMG3: alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, 72 h e 120 h. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).	49
Figura 12 – Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura <i>R. mucilaginosa</i> em YMG4, YMG5 e YMG6. (a) YMG4: Alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, 96 h e 144 h, com ajuste de pH. (b) YMG5: Alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, 96 h e 144 h, com adição de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. YMG6: Alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, 96 h e 144 h, com ajuste de pH e adição de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).	52
Figura 13 - Consumo de glicerol pela levedura <i>R. mucilaginosa</i> ao longo do cultivo em YMG5 (alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 24 h, 96 h e 144 h, com adição de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$). Valores médios \pm desvio padrão (n = 2). As setas indicam as alimentações de glicerol nos tempos de 48 h, 96 h e 144 h.	53
Figura 1A – Curva padrão de biomassa da levedura <i>R. mucilaginosa</i> CCT 7688.	73
Figura 1D – Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura <i>R. mucilaginosa</i> referente ao cultivo M48A.	76

Figura 2D – Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura <i>R. mucilaginosa</i> referente ao cultivo YMG5.....	76
Figura 3D – Cromatograma de ácidos graxos dos padrões utilizados nas análises.....	77

NOMENCLATURA

G48 – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL glicerol bruto em 48 h.

M48 – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL meio de cultivo em 48 h.

G96 – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL glicerol bruto em 96 h.

M96 – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL meio de cultivo em 96 h.

M96A – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL meio de cultivo em 96 h, mais 10 mL em 144 h e mais 10 mL em 192 h.

M96B – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL meio de cultivo em 96 h e mais 10 mL em 144 h.

M96C – Batelada alimentada com alimentação de 10 mL meio de cultivo em 96 h e mais 10 mL em 144 h.

M48A – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL meio de cultivo em 48 h, mais 10 mL em 72 h e mais 10 mL em 96 h.

M48B – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL meio de cultivo em 48 h e mais 10 mL em 96 h.

M48C – Batelada alimentada com alimentação de 10 mL meio de cultivo em 48 h e mais 10 mL em 96 h.

YMG24 – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 24 h.

YMG96 – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 96 h.

YMM24 – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL de meio de cultivo em 24 h.

YMG1 – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 24 h e mais 20 mL em 96 h.

YMG2 – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 24 h, mais 20 mL em 96 h e mais 20 mL em 144 h.

YMG3 – Batelada alimentada com alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 24 h, mais 20 mL em 72 h e mais 20 mL em 120 h.

YMG4 – Ajuste do pH do meio inicial em 4,5. Batelada alimentada com alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 24 h, mais 20 mL em 96 h e mais 20 mL em 144 h.

YMG5 – Adição de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no meio inicial. Batelada alimentada com alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 24 h, mais 20 mL em 96 h e mais 20 mL em 144 h.

YMG6 – Adição de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e ajuste do pH no meio inicial em 4,5. Batelada alimentada com alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 24 h, mais 20 mL em 96 h e mais 20 mL em 144 h.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	OBJETIVO GERAL	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	LIPÍDIOS E SUAS APLICAÇÕES	12
3.2	ÓLEOS MICROBIANOS	13
3.2.1	Leveduras oleaginosas	14
3.2.2	<i>Rhodotorula</i>	16
3.3	SUBSTRATOS	17
3.3.1	Fontes de carbono	17
3.3.2	Fontes de nitrogênio	20
3.4	INFLUÊNCIA DA RAZÃO C/N NO METABOLISMO DE MICRO-ORGANISMOS OLEAGINOSOS	20
3.5	OUTROS FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NO ACÚMULO DE LIPÍDIOS	22
3.6	PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR DIFERENTES MODOS DE CULTIVO	23
3.6.1	Cultivo em batelada	23
3.6.2	Cultivo em batelada alimentada	24
3.6.2.1	Produção de lipídios por batelada alimentada	25
3.6.3	Cultivo em modo contínuo	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	MICRO-ORGANISMO	30
4.2	GLICEROL BRUTO	30
4.3	PRÉ-INÓCULO E INÓCULO	30
4.4	CULTIVO EM BATELADA EM FRASCOS AGITADOS	30
4.5	CULTIVO EM BATELADA ALIMENTADA EM FRASCOS AGITADOS	31
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	33
4.6.1	Biomassa	33
4.6.2	pH	33
4.6.3	Lipídios	33
4.6.4	Glicerol	34
4.6.5	Perfil de ácidos graxos	34
4.6.6	Equações	35
4.6.7	Análise estatística	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	CULTIVOS COM O MEIO A	36

5.1.1. Cultivo em batelada simples	36
5.1.2 Cultivos em batelada alimentada	38
5.2 CULTIVOS REALIZADOS NO MEIO B	44
5.2.1 Cultivo em batelada simples	44
APÊNDICES	72
ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

Os lipídios são importantes para diversos ramos da indústria, podendo ser utilizados na alimentação, suplementação alimentar, ou mesmo na obtenção de biocombustíveis, como o biodiesel. Atualmente, a principal matéria-prima para o biodiesel é de origem vegetal (ANP, 2016), o que tem gerado muitas discussões sobre a competitividade desta produção em detrimento do uso para alimentação humana (KOIZUMI, 2015). Desta forma, a busca por alternativas para produção desta matéria-prima por outras vias se torna atrativa, resultando em diversos estudos sobre a produção de lipídios microbianos (CHANG et al., 2013; SAENGE et al., 2011; THIRU; SANKH; RANGASWAMY, 2011). Diversos micro-organismos podem ser utilizados na obtenção de lipídios, como microalgas (SONG et al., 2013), leveduras oleaginosas (LIANG et al., 2010), bolores (VICENTE et al., 2009) ou bactérias (CASTRO et al., 2017). Entretanto, as leveduras oleaginosas se sobressaem por apresentar uma alta taxa de crescimento, além de possuírem capacidade de assimilar uma variedade de fontes de carbono (MOLINÉ; LIBKIND; BROOCK, 2012).

O glicerol bruto, coproduto da produção de biodiesel, possui aplicação em indústrias farmacêuticas, tabaco, alimentação, tintas, entre outras (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011). Contudo, a demanda crescente de biodiesel gera uma disponibilidade ainda maior deste químico, por ser um coproduto desta produção, reduzindo o seu preço comercial. Portanto, com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação de glicerol, tornando a produção de biodiesel mais competitiva, vê-se necessária a busca de alternativas para o uso do glicerol bruto gerado nesta produção. Neste contexto, Spier (2014) estudou a obtenção de lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, utilizando como fonte de carbono o glicerol bruto, proveniente da indústria de biodiesel. Esta levedura se mostrou promissora para obtenção de lipídios, incitando a continuidade do trabalho, para obtenção de ainda mais lipídios, a partir de diferentes condições de processo. O uso do glicerol bruto no processo de obtenção de óleo para uma posterior reinserção na cadeia do biocombustível também se mostra relevante, visto que o aproveitamento agrega valor ao processo como um todo, contribuindo assim para sua competitividade (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Além da preocupação com a fonte de carbono do cultivo microbiano, é de interesse estabelecer condições que favoreçam o crescimento celular e o acúmulo de lipídios. Diversos fatores podem influenciar estes parâmetros, como: pH, aeração, agitação, razão C/N (relação entre a quantidade de carbono e nitrogênio no meio), entre outros (AGEITOS et al., 2011; ANGERBAUER et al., 2008; LIANG et al., 2010). Outro fator importante é o modo de cultivo,

os quais diferem na forma de alimentação do reator, podendo ser realizado de maneira contínua, batelada alimentada ou batelada. Em batelada a alimentação ocorre apenas no início do processo, no processo em batelada alimentada, as alimentações são intermitentes, enquanto que no modo contínuo a alimentação é constante, assim como a saída de caldo fermentado. A vantagem de se utilizar o processo em batelada alimentada é a possibilidade de regular a alimentação do substrato, impedindo a ação inibitória do mesmo sobre o crescimento de biomassa e o acúmulo de lipídios (SHULER; KARGI, 2012). Além disso, alguns estudos verificaram o aumento da produção de lipídios em batelada alimentada, quando comparados ao processo em batelada (FEI et al., 2016; SAENGE et al., 2011). Desta forma, esta estratégia de cultivo se mostra relevante frente aos demais modos, atraindo a atenção de diversos pesquisadores em estudos para a obtenção de óleo microbiano por este processo (ANSCHAU et al., 2014; BÉLIGON et al., 2015; CESCUT et al., 2014; FEI et al., 2016; PIROZZI et al., 2014; RAIMONDI et al., 2014; RAKICKA et al., 2015).

Assim, o presente trabalho vem contribuir nestes estudos, propondo a obtenção de lipídios microbianos a partir do cultivo em batelada alimentada da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, utilizando como fonte de carbono o glicerol bruto gerado como coproduto da síntese de biodiesel.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo geral avaliar diferentes estratégias de processo para produção de biomassa lipídica microbiana através do cultivo da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, utilizando como fonte de carbono o glicerol bruto gerado como coproduto da síntese de biodiesel de óleo de soja.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes estratégias de alimentação no cultivo em batelada alimentada em frascos agitados para produção de lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa*, utilizando dois meios de cultivo;
- Determinar o perfil de ácidos graxo obtidos no processo em batelada alimentada para ambos os meios de cultivos utilizados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LIPÍDIOS E SUAS APLICAÇÕES

Os lipídios são substâncias solúveis em solventes orgânicos como clorofórmio e metanol, mas insolúveis em água. Estes podem ser gorduras, óleos, algumas vitaminas e hormônios. As gorduras e os óleos são derivados de ácidos graxos, sendo constituídos por ácidos carboxílicos com grupos laterais de hidrocarbonetos de cadeia longa, dos quais os mais predominantes são os C₁₆ e C₁₈ (ácidos palmítico, oleico, linoleico e esteárico). Estes ácidos podem ser classificados como ácidos graxos saturados, insaturados ou poli-insaturados, determinados pelo grau de insaturação (VOET; VOET, 2013).

Os ácidos graxos poli-insaturados são muito utilizados, por exemplo, como suplemento alimentar, podendo ser obtidos a partir de plantas, como também de micro-organismos. Vários estudos demonstram a produção de importantes ácidos graxos, como ácido docosaenoico (DHA) e ácido araquidônico (ARA), os quais são encontrados em tecidos do cérebro e, também, estão presentes no leite materno, sendo importantes para o desenvolvimento neural ou de funções da retina. O DHA também pode ser utilizado para ajudar a prevenir problemas cardíacos, perturbações degenerativas (Alzheimer), ou ainda para o tratamento da síndrome de déficit de atenção em crianças (RATLEDGE, 2004).

Os óleos vegetais e gorduras animais possuem como maiores componentes os triacilgliceróis (TAG, também chamados de triglicerídeos). Os TAG são constituídos de ésteres de ácidos graxos (AG) e glicerol (1,2,3-propanotriol ou glicerina), contendo diferentes tipos de AG ligados à cadeia do glicerol. Estes diferentes AG compõem o perfil graxo de cada óleo (KNOTHE et al., 2006). A partir da reação de transesterificação destes óleos é possível obter-se ésteres metílicos de ácidos graxos, ou mais comumente chamado biodiesel (KNOTHE et al., 2006; LIANG; JIANG, 2013). Dentre os biocombustíveis, o biodiesel constitui uma alternativa viável para o mercado de combustíveis.

Nos Estados Unidos, esta produção começou em 2001, quando 9 milhões de galões foram produzidos, e ainda observa-se que a produção de biodiesel vem crescendo rapidamente, pois de 2001 a 2011, o crescimento foi de mais de 100 vezes (EIA, 2012). No Brasil, a introdução do biodiesel na matriz energética ocorreu pelo lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) em dezembro de 2004 (ANP, 2016). Desde então, foi sendo agregado ao diesel um teor mínimo de biodiesel, de modo a inserir este biocombustível no mercado brasileiro. A lei nº 13.236, de 23 de março de 2016, que altera os percentuais de

adição obrigatória de biodiesel, estabeleceu que em um prazo de doze meses o percentual passaria a ser de 8 % (já em vigor), e que após trinta e seis meses seria de 10 %. Esta demanda acarreta um crescente aumento da produção de biodiesel, estimulando a busca por soluções mais eficientes e rentáveis para sua produção.

Atualmente, a principal matéria-prima do biodiesel no Brasil, assim como nos Estados Unidos, é de origem vegetal, sendo cerca de 78 % das matérias-primas utilizadas correspondente ao óleo de soja (ANP, 2016). Desta forma, há discussões sobre a possibilidade desta produção de oleaginosas para biocombustíveis estar concorrendo com a produção de alimentos. Isto porque, com o aumento da demanda de biocombustíveis, aumenta também a demanda pela sua matéria-prima, ou seja, a busca por estes insumos agrícolas também aumenta, ocasionando uma competição por terras aráveis para biocombustíveis, alimentos, rações e outros usos industriais (KOIZUMI, 2015). Portanto, é possível identificar a necessidade de se investigar outras alternativas como matéria-prima para este biocombustível.

3.2 ÓLEOS MICROBIANOS

Em vista da necessidade de se obter alternativas para produção de biocombustíveis, o uso de micro-organismos oleaginosos tem sido proposto. Estes são capazes de acumular lipídios em seu organismo, permitindo a obtenção de biodiesel a partir deste óleo, em substituição aos óleos vegetais. Diversos estudos comprovaram a capacidade de produção de lipídios por micro-organismos como leveduras, microalgas, bactérias e bolores. Song et al. (2013) observaram que a microalga *Phaeodactylum tricornutum* possuía a capacidade de acumular lipídios, apresentando $61,43 \pm 0,95$ % de conteúdo lipídico em base seca e uma produtividade de $26,75 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Zhao et al. (2010) obtiveram, a partir da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, 52,2 % de conteúdo lipídico utilizando hidrolisado de alcachofra como substrato. Papanikolaou e Aggelis (2002) verificaram um acúmulo de lipídios de 43 %, utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* em meio contendo glicerol industrial como fonte de carbono.

Dentre os micro-organismos estudados, as leveduras oleaginosas apresentam algumas vantagens em relação aos demais, como: alta taxa de crescimento, o que acarreta na produção de grandes quantidades de biomassa; células resistentes, podendo ser cultivadas em biorreator convencional; podem se adaptar a diferentes fontes de carbono e nitrogênio; a biomassa seca pode ser aplicada para obtenção de diversos produtos, como farmacêuticos e aditivos alimentares (BHOSALE, 2001; MOLINÉ; LIBKIND; BROOCK, 2012).

Em relação aos óleos vegetais, as vantagens do uso de leveduras são: crescimento rápido; menor área de produção, para a mesma massa de material graxo (os biorreatores podem produzir em uma área limitada a mesma quantidade de lipídios de um vegetal que exige uma área de solo muito maior); a produção não está sujeita a variações climáticas ou mesmo pragas; melhor controle de produção e do produto (AQUARONE et al., 2001).

Entretanto, como desvantagem têm-se os altos preços que a produção de óleos microbianos pode gerar em função da matéria-prima empregada. Os custos da produção de óleo microbiano são atualmente superiores aos dos óleos vegetais, mas há muitos métodos para melhorar economicamente os processos de produção de óleo microbiano. Atualmente, a glicose é a fonte de carbono mais utilizada para a produção destes óleos, sendo importante a substituição desta fonte de carbono por outra de baixo custo, para redução do custo de produção dos óleos microbianos (LI et al., 2010). Outra forma seria o pleno uso dos subprodutos resultantes do cultivo. A biomassa residual resultante do processo de extração dos lipídios poderia ser utilizada para alimentação animal, pois contém quantidades significativas de proteínas, carboidratos e outros nutrientes. Ou ainda, poderia ser destinada para produção de metano por digestão anaeróbia, o que tornaria o preço final mais favorável e competitivo (MENG et al., 2009).

3.2.1 Leveduras oleaginosas

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, de forma oval ou esférica. Estas são encontradas na natureza, frequentemente observada como um pó branco cobrindo folhas e frutas. Elas podem se reproduzir por fissão (dividindo-se simetricamente) ou por brotamento (dividindo-se de forma assimétrica). As leveduras são micro-organismos aeróbios facultativos, pois o oxigênio ou um composto orgânico pode ser utilizado como acceptor final de elétrons. Esta característica permite que essas leveduras sobrevivam em diferentes ambientes quanto à presença de oxigênio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Leveduras capazes de acumular lipídios acima de 20 % de sua biomassa são denominadas leveduras oleaginosas (MENG et al., 2009). Aproximadamente 1600 espécies de leveduras são conhecidas, mas apenas 40 são conhecidas como oleaginosas (SITEPU et al., 2013). Estas são capazes de sintetizar e acumular lipídios cerca de 20 a 80 % de sua biomassa. Algumas leveduras oleaginosas que se destacam na literatura como produtoras de lipídios incluem: *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyi*, *Cryptococcus curvatus*, *Rhodotorula glutinis*, *R. graminis* e *Yarrowia lipolytica* (PAN et al., 2009).

Estes óleos microbianos acumulados consistem de 80-90 % de triacilgliceróis (TAG), cuja porcentagem de ácidos graxos saturados é de aproximadamente 44 %, assemelhando-se a vários óleos produzidos de sementes de plantas. Além disso, leveduras oleaginosas podem acumular triacilgliceróis ricos em ácidos graxos poli-insaturados, sendo os mais encontrados: ácido oleico (C18:1), linoleico (C18:2), palmítico (C16:0) e palmitoleico (C16:1) (MENG et al., 2009).

Em vista da relevância que os ácidos graxos possuem para vários segmentos industriais, pesquisadores buscam conhecer os perfis de ácidos graxos dos lipídios acumulados por micro-organismos. Mesmo para algumas leveduras pertencentes ao mesmo gênero, o perfil e o conteúdo lipídico podem apresentar diferenças. Por exemplo, *Cryptococcus curvatus* e *Cryptococcus albidus* possuem um conteúdo lipídico de 58% e 65%, respectivamente, porém com perfis de ácidos graxos significativamente diferentes. *C. curvatus* acumula principalmente ácido palmítico, enquanto *C. albidus* acumula ácido oleico como principal ácido graxo. Em contrapartida, espécies diferentes do gênero *Rhodotorula* divergem no nível de conteúdo lipídico. *R. glutinis* e *R. graminis* possuem conteúdo lipídico de 72 % e 36 %, respectivamente, enquanto seus perfis graxos são semelhantes (BEOPOULOS et al., 2009). Na Tabela 1 são apresentados alguns perfis graxos de estudos já realizados, estando descrito o percentual dos principais ácidos graxos obtidos, de acordo com cada micro-organismo.

Tabela 1 - Principais resíduos de ácidos graxos obtidos por diferentes leveduras oleaginosas.

Levedura	Principais resíduos de ácidos graxos (% m/m) *						Fonte
	Lipídios (%)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	
<i>Candida lipolytica</i>	59,9	21,6	5,2	27,1	19	12	KARATAY; DÖNMEZ (2010)
<i>Candida tropicalis</i>	46,8	29,7	5	56,2	2,3	-	KARATAY; DÖNMEZ (2010)
<i>R. mucilaginosa</i>	69,5	26,2	-	37,3	22,3	6,5	KARATAY; DÖNMEZ (2010)
<i>R. mucilaginosa</i>	52,2	21,56	1,96	9,1	54,68	11,27	ZHAO et al. (2010)
<i>L. starkeyi</i>	61,5	36,6	4,3	6,2	48,9	1,1	ZHAO et al. (2010)
<i>Candida</i> sp.	47,6	9,8	0,4	3,5	25,5	54,9	DUARTE; GHISELLI; MAUGERI (2013)

*Alguns ácidos em quantidades traços não foram incluídos na tabela.

A Tabela 2 mostra o perfil de ácidos graxos de alguns óleos vegetais, semelhantes aos provenientes de leveduras. Ao se comparar com a Tabela 1, ambos apresentam entre os

principais componentes os ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2).

No momento em que o metil éster, obtido por transesterificação dos lipídios brutos acumulados nas células microbianas, apresenta um rendimento elevado e átomos de carbono entre 16 e 18, pode-se sugerir que estes lipídios são viáveis para produção de biodiesel de segunda geração (KARATAY; DÖNMEZ, 2010). Por isso, a importância do conhecimento do perfil de ácido graxo dos lipídios obtidos por via biotecnológica.

Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos de alguns óleos vegetais.

Perfil de ácidos graxos de óleos vegetais (% m/m) *					
Vegetal	C16:0	C18:0	C16:1	C18:1	C18:2
Cacau	26	36	-	33	2,8
Palma	50,4	4,7	0,1	33,5	8,2
Milho	11,7	1,8	-	25,2	60,6
Soja	11,7	3,1	-	23,3	55,5
Girassol	6,1	3,3	-	16,9	73,7

*Alguns ácidos em quantidades traços não foram incluídos na tabela.

Fonte: ANSCHAU (2014).

3.2.2 *Rhodotorula*

Leveduras do gênero *Rhodotorula* se reproduzem por brotamento multilateral, sendo as duas espécies mais comuns em alimentos as leveduras *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, produzindo pigmentos rosados e vermelhos. Estas podem ser encontradas em carne de frango, camarão, peixes e carne de gado fresca, ou ainda, sobre a superfície da manteiga (JAY, 2005). Dentre as leveduras oleaginosas conhecidas, encontram-se algumas pertencentes ao gênero *Rhodotorula*, como *R. mucilaginosa*, *R. graminis* e *R. glutinis* (CESCUT et al., 2014; GALAFASSI et al., 2012; KARATAY; DÖNMEZ, 2010). Spier (2014) obteve 9,20 g L⁻¹ de biomassa e 5,51 g L⁻¹ de lipídios totais, a partir da levedura *R. mucilaginosa* para o processo em batelada, com glicerol bruto como substrato. Assim como Zhao et al. (2010), que obtiveram para *R. mucilaginosa* TJY15a, em batelada alimentada, 19,5 g L⁻¹ de biomassa e 10,18 g L⁻¹ de lipídios totais, utilizando hidrolisado de alcachofra como fonte de carbono. Para a levedura *R. glutinis*, Saenge et al. (2011) obtiveram 6,10 g L⁻¹ de lipídios totais em processo em batelada alimentada, com meio composto por glicerol bruto. Estes estudos confirmam o potencial dessas leveduras para obtenção de lipídios.

Além de acumularem lipídios, estas leveduras possuem a capacidade de produzirem carotenoides, os quais são biomoléculas de alto valor comercial (BUZZINI, 2001; LOPES, 2014; MOLINÉ; LIBKIND; BROOCK, 2012; OTERO, 2011). Esta produção apresenta vantagens sobre a produção a partir de outros micro-organismos, como algas e outros fungos, pois a taxa de crescimento é alta e uma grande quantidade de biomassa pode ser facilmente obtida, tanto em escala laboratorial, quanto em uma planta piloto. E, ainda, leveduras podem se adaptar a diferentes condições ambientais e crescer em uma vasta variedade de fontes de carbono e nitrogênio (MOLINÉ; LIBKIND; BROOCK, 2012).

3.3 SUBSTRATOS

As matérias-primas para uso em cultivos microbianos devem estar disponíveis em grande quantidade, ser de fácil obtenção e devem apresentar preferencialmente baixo custo. O crescimento microbiano se dá na presença de uma fonte de energia, sendo esta constituída de carboidratos ou hidrocarbonetos. Muitos estudos utilizam glicose, ou mesmo sacarose, como fonte de carbono, contudo o glicerol vem sendo aplicado como um ótimo recurso em substituição às fontes atuais (DUARTE et al., 2013; DUARTE; GHISELLI; MAUGERI, 2013; RAKICKA et al., 2015; SANTOS et al., 2012). A proporção da fonte de carbono é determinada em função da fonte de nitrogênio, mantendo as relações entre estes nutrientes de acordo com a exigência do micro-organismo para produção de matéria graxa. Os meios de cultivo são estudados para produzirem o máximo de lipídios, no entanto variam para cada micro-organismo (AQUARONE et al., 2001).

3.3.1 Fontes de carbono

As fontes de energia mais tradicionais na indústria biotecnológica são os carboidratos, sendo a glicose e a sacarose as mais utilizadas (CRUEGER; CRUEGER, 1993). Contudo, diversos estudos vêm apresentando alternativas de fontes de carbono, como o uso do glicerol, xilose, melão, hidrolisado de milho, e outros (OTERO, 2011; GALAFASSI et al., 2012).

Para alguns micro-organismos, como *R. mucilaginosa*, algumas pesquisas têm apresentado resultados de capacidade de crescimento e de produção de lipídios em diversos meios. Li et al. (2012) demonstraram que o uso de xilose como substrato permite um

crescimento mais satisfatório do que a sacarose, entretanto observaram que meios contendo carboximetilcelulose e amido solúvel não são indicados para esta espécie de levedura.

Evans e Ratledge (1983), para a levedura *Candida curvata*, obtiveram a maior quantidade de lipídios acumulados a partir de xilose (48,6 %), enquanto que o menor acúmulo foi obtido com etanol (30,1 %). Segundo Zhao et al. (2008), para a levedura *Lipomyces starkeyi* AS 2.1560, o uso de glicose juntamente com xilose, resultou um maior acúmulo de lipídios (61 %), quando comparado a estudos em que estas fontes são analisadas separadamente, ou mesmo diferentes fontes de carbono.

3.3.1.1 Glicerol

O glicerol, ou 1-2-3-propanotriol, também chamado glicerina, é um álcool tri-hidroxiado. Este é um líquido claro, viscoso, incolor, de gosto doce e higroscópico a temperaturas acima de seu ponto de fusão. É completamente solúvel em água e etanol, levemente solúvel em acetato de etila e dioxano, e insolúvel em hidrocarbonetos. Sabendo-se que o glicerol ocorre naturalmente em formas combinadas como os TAG em plantas e óleos graxos animais, e o mesmo pode ser recuperado quando óleos ou gorduras são esterificados com álcool para produção de biodiesel (KNOTHE et al, 2006; LORA; VENTURINI, 2012). Segundo Yazdani e Gonzalez (2007), 45 kg de biodiesel produzidos por transesterificação de óleos vegetais ou animais resultam em 4,5 kg de glicerol bruto. A reação de obtenção de glicerol na síntese do biodiesel está apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Reação de obtenção do glicerol como coproduto da produção de biodiesel.



Fonte: LIANG & JIANG (2013).

O glicerol pode ser empregado em diversos segmentos, como na fabricação de medicamentos, cosméticos, pastas de dentes e resinas sintéticas. Também é aplicado na fabricação de tabaco e de alimentos, na forma de glicerol ou de acilgliceróis. Em alimentos, o glicerol age como solvente e sua viscosidade atribui consistência ao produto. Também é usado

como meio para transferir calor por contato direto durante o rápido congelamento de alimentos, por exemplo. Os poligliceróis têm sido cada vez mais usados em alimentos, especialmente em gorduras e margarinas (KNOTHE et al., 2006).

Com o aumento da produção nacional e mundial do biodiesel, a glicerina tende a sofrer uma redução de preço no mercado, afetando não só a cadeia nacional de produção de glicerina animal, como pequenos produtores de biodiesel que precisam agregar maior valor a sua cadeia produtiva (LORA; VENTURINI, 2012). Assim, há vários estudos sobre como reaproveitar este glicerol, alguns desses estudos apresentam uma rota de reaproveitamento na própria cadeia do biodiesel, no qual se utiliza o glicerol como fonte de carbono em cultivos de micro-organismos oleaginosos obtendo-se lipídios que podem ser reinseridos como matéria-prima de biodiesel (CHATZIFRAGKOU et al., 2011; THIRU; SANKH; RANGASWAMY, 2011; ZHU et al., 2008).

Entretanto, o glicerol bruto oriundo da produção de biodiesel pode apresentar algumas impurezas em sua composição, sendo estas compostas basicamente por metanol e sabões, variando de acordo com a planta do qual foi obtido. Além destas impurezas, alguns elementos como cálcio, potássio, fósforo, magnésio e enxofre podem estar presentes nesta composição (PYLE; GARCIA; WEN, 2008). Contudo, mesmo apresentando estas características, o glicerol bruto tem sido utilizado como substrato por diversos pesquisadores e resultando em uma potencial fonte de carbono microbiana na obtenção de lipídios (LIANG et al., 2010; SAENGE et al., 2011).

3.3.1.2 Uso do glicerol como fonte de carbono

O uso de glicerol bruto como fonte de carbono para leveduras tem apresentado bons resultados de conversão em lipídios (KITCHA; CHEIRSILP, 2011; LADEIRA, 2016; LIANG et al., 2010; SAENGE et al., 2011; THIRU; SANKH; RANGASWAMY, 2011). Spier (2014) obteve aproximadamente 60 % de conteúdo lipídico, utilizando este substrato para *R. mucilaginosa*. Papanikolaou e Aggelis (2002), para levedura *Yarrowia lipolytica*, obtiveram 43 % de conteúdo lipídico com glicerol como fonte de carbono. Com a levedura *Candida* sp. foi possível obter aproximadamente 50 % de conteúdo lipídico, sendo 9,9 g L⁻¹ a concentração de lipídios totais (DUARTE; GHISELLI; MAUGERI, 2013).

No estudo de Spier, Buffon e Burkert (2015), as leveduras oleaginosas *Cryptococcus curvatus*, *Candida cylindracea*, *Rhodotorula glutinis*, *Lipomyces starkeyi* e *Lipomyces lipofer* apresentaram habilidade de consumir glicerol bruto como principal fonte de

carbono no meio de cultivo, onde *L. lipofer* foi capaz de acumular aproximadamente 58 % de conteúdo lipídico com produção de 5,46 g L⁻¹ de lipídios totais.

Segundo Easterling et al. (2009), durante o estudo da influência do substrato para o acúmulo de lipídios a partir da levedura oleaginosa *R. glutinis*, o uso de apenas glicerol como fonte de carbono resultou em uma maior produção de lipídios em comparação com as fontes dextrose e xilose. Xu et al. (2012) compararam a produção de lipídios com diferentes substratos (glicose, glicerol puro e glicerol bruto), onde *Rhodospiridium toruloides* apresentou um melhor crescimento em glicerol bruto, quando comparado ao demais substratos.

3.3.2 Fontes de nitrogênio

Para processos de grande escala muitas vezes são utilizados amônia, sais ou ureia como fontes de nitrogênio. Extrato de levedura tem sido utilizado de forma eficiente como substrato para micro-organismos. Este é produzido a partir de leveduras por autólise a 50-55 °C ou por plasmólise na presença de NaCl, em altas concentrações. O extrato de levedura contém aminoácidos, peptídeos, vitaminas hidrossolúveis e carboidratos, contudo sua composição varia de acordo com os substratos utilizados para o cultivo das leveduras. Outra fonte de nitrogênio que pode ser utilizada por micro-organismos são as peptonas, que são hidrolisados de proteínas. Sua fonte pode ser a carne, a caseína, a queratina, a semente de algodão ou girassol, entre outras (CRUEGER; CRUEGER, 1993). De acordo com Li et al. (2010), para a levedura *R. mucilaginosa* TJY15a, o meio composto por extrato de levedura foi o mais adequado para o acúmulo de lipídios, quando comparado com outras fontes de nitrogênio como nitrato de sódio e peptona.

O tipo de fonte de nitrogênio pode influenciar na quantidade de lipídios produzidos pelo micro-organismo, podendo ser utilizadas fontes de nitrogênio inorgânicas ou orgânicas. Evans e Ratledge (1984) demonstraram que algumas leveduras são capazes de acumular maiores concentrações de lipídios quando na presença de uma fonte de nitrogênio orgânica, ao invés da inorgânica.

3.4 INFLUÊNCIA DA RAZÃO C/N NO METABOLISMO DE MICRO-ORGANISMOS OLEAGINOSOS

Estudos têm demonstrado que o esgotamento da fonte de nitrogênio do meio de cultivo propicia o acúmulo de lipídios por micro-organismos oleaginosos. Outro fator

importante é o excesso de uma fonte de carbono, podendo ser glicose, xilose, glicerol, entre outros (CHEN et al., 2013; EASTERLING et al., 2009; LIANG et al., 2010; WU et al., 2010). Estas duas condições compõem a razão C/N, ou seja, quantidade de carbono pela quantidade de nitrogênio no meio. Esta fonte de carbono permanece sendo assimilada pelas células, mesmo após a exaustão do nitrogênio, sendo convertida em triacilglicerol. Ao se interromper o fornecimento de nitrogênio para o meio, impede-se a proliferação celular do micro-organismo, cessando o crescimento de biomassa, enquanto que o acúmulo de lipídios se mantém (RATLEDGE, 2002).

A limitação de nitrogênio é geralmente o tipo de regulação mais eficiente para indução do acúmulo de lipídios, visto que durante a fase de crescimento do micro-organismo o fluxo de carbono se distribui entre os quatro grupos macromoleculares (carboidrato, lipídio, ácido nucleico e proteína), sendo o nitrogênio essencial para a síntese de ácido nucleico e proteína, que são requeridos na proliferação celular. Esse processo é diminuído pela limitação de nitrogênio, com isso a taxa de crescimento diminui rapidamente, enquanto a taxa de assimilação de carbono diminui de uma forma mais gradual. Assim, o fluxo de carbono é canalizado para a síntese de lipídios, permitindo o acúmulo de triacilglicerol (BEOPOULOS et al., 2009).

Em outras palavras, com a exaustão do nitrogênio, ocorre a diminuição da concentração de adenosina monofosfato (AMP). Isto compromete a respiração celular, já que AMP é requerida pela isocitrato desidrogenase (ICDH) no interior da mitocôndria, responsável pelo consumo de oxigênio e saída de CO₂. A inatividade da ICDH ocasiona rapidamente o acúmulo de citrato na forma de isocitrato, pois este não está mais sendo metabolizado, sendo transportado para o citoplasma e clivado a acetil-CoA pela enzima ATP-citrato liase (ACL). Esta enzima não está presente em espécies não oleaginosas, evidenciando a correlação entre a presença da atividade da enzima ACL com a capacidade de determinados micro-organismos produzirem lipídios (RATLEDGE, 2002).

Além disso, para estes micro-organismos serem chamados de oleaginosos, precisam apresentar pelo menos 20% de sua biomassa constituída de lipídios, ou seja, a presença da enzima ATP-citrato liase não determina se a espécie é oleaginosa ou não. O acúmulo de lipídios pode ser determinado pela atividade da enzima málica (ME), que atua como fonte de NADPH para síntese de ácidos graxos. Este acúmulo se torna muito baixo quando esta enzima é inibida, percebendo-se, então, uma correlação entre a enzima ME e o acúmulo de lipídios em micro-organismos. Por conseguinte, pode-se afirmar que espécies que apresentam as enzimas ATP-

citrato liase e ME são aquelas que produzem lipídios em concentrações diferenciadas, sendo, então, denominadas como oleaginosas (RATLEDGE, 2002).

Assim, a razão C/N influencia diretamente no acúmulo de lipídios, sendo a razão ótima próxima de 100 (AGEITOS et al., 2011). Angerbauer et al. (2008), utilizando a levedura *L. starkeyi*, e lodo de esgoto como substrato, obtiveram 68 % de conteúdo lipídico quando a razão C/N foi de 150, enquanto que apenas 40 % de lipídios foram acumulados para uma razão de 60. Entretanto, alguns estudos demonstram que quando se trata de glicerol como substrato, altas concentrações podem suprimir o crescimento microbiano, sendo utilizados valores próximos de 30 para a razão C/N (LIANG et al., 2010). Contudo, para Spier (2014), foi obtido, aproximadamente, 60 % de conteúdo lipídico pela levedura *R. mucilaginosa*, a partir de uma razão C/N de 93, demonstrando que a influência da concentração pode variar de acordo com o micro-organismo utilizado.

De acordo com Ladeira (2016), para *Meyerozyma guilliermondii*, utilizando glicerol bruto como fonte de carbono, quando a razão C/N esteve próxima de 100 (98,6), obteve-se um acúmulo maior de lipídios, contudo houve uma redução significativa de biomassa. Quando usada uma razão C/N de 55,8 houve uma redução de apenas 11 % no conteúdo lipídico e um incremento de biomassa em 78 %, aumentando a produtividade do processo.

3.5 OUTROS FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NO ACÚMULO DE LIPÍDIOS

O acúmulo de lipídios depende de diversos fatores como a fisiologia do micro-organismo, a limitação de nutrientes e condições ambientais, assim como pH, temperatura e aeração. A produção de metabólitos secundários também pode afetar o acúmulo de lipídios, como, por exemplo, citrato e etanol produzidos pela levedura *Yarrowia lipolytica* (BEOPOULOS et al. 2009). Segundo Ageitos et al. (2011), o cultivo em batelada ou batelada alimentada deve estar fortemente aerado, mantido a temperaturas entre 25 e 30°C e o pH deve estar entre 3 e 6. Contudo, o pH depende da fonte de carbono empregada (ANGERBAUER et al., 2008). Por exemplo, no estudo de Karatay e Dönmez (2010), utilizando melão como fonte de carbono no meio, observaram que a mudança do pH de 4 para 5 resultou em aumento de 31,5 % para 59,9 % de conteúdo lipídico para a levedura *Candida lipolytica*, demonstrando a relevância do ajuste do pH no meio.

Alguns microelementos como Mg^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} e Ca^{+2} também influenciam no acúmulo de lipídios, assim como alguns sais orgânicos (AGEITOS et al.; 2011; LI; DU; LIU, 2008; ZHAO et al., 2008). Wu et al. (2010) observaram uma correlação entre a limitação

de fósforo e o excesso de carbono para a produção de lipídios, para a levedura *R. toruloides* Y4, que apresentou um conteúdo lipídico de 63,7 %. Neste caso, evidencia-se que a limitação de fósforo para estimular o acúmulo de lipídios por micro-organismos pode ser tão efetiva quanto a limitação de nitrogênio.

Spier (2014) analisou o efeito de elementos como K^+ , Mg^{+2} , Na^+ , Ca^{+2} , Zn^{+2} e Fe^{+3} sobre o acúmulo de lipídios, determinando que para a levedura *R. mucilaginosa* apenas Mg^{+2} apresentou efeito positivo significativo sobre o conteúdo lipídico, sendo que o incremento de 0 para 3 g L^{-1} resultou em um aumento significativo de 10,94 % no conteúdo lipídico, demonstrando que microelementos podem afetar o acúmulo de lipídios em leveduras.

Outro fator que influencia na quantidade de lipídios acumulada é o modo de cultivo, como a batelada, batelada alimentada ou contínuo (ZHAO et al., 2011).

3.6 PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR DIFERENTES MODOS DE CULTIVO

Para a produção microbiana de lipídios em escala laboratorial têm sido usados processos em batelada, batelada alimentada e no modo contínuo (ANSCHAU et al., 2014). Estes diferentes modos de alimentação impactam no acúmulo de lipídios obtido ao final do processo (ZHAO et al., 2011). A diferença de cada modo de cultivo é a forma como se alimenta o biorreator com o meio. No modo em batelada, após a alimentação inicial do meio de cultivo adicionado do inóculo, nada é adicionado ou removido do processo. Em batelada alimentada, alimentações são realizadas à medida que ocorre o processo. Enquanto que no processo contínuo, essa alimentação é constante, assim como a saída de caldo fermentado (BAILEY; OLLIS, 1986).

3.6.1 Cultivo em batelada

Em um processo em batelada, a solução de nutrientes é inoculada com micro-organismos, permitindo até o final da incubação condições ótimas de cultivo, ou seja, todos os substratos são adicionados no início do cultivo. Ao longo de todo o cultivo não se acrescenta nada, exceto oxigênio (em um sistema aerado), antiespumante e ácidos ou bases para o controle do pH. Como resultado do metabolismo das células, a composição do meio de cultivo, a concentração de biomassa e a concentração de metabólitos mudam de forma contínua (CRUEGER; CRUEGER, 1993).

Segundo Beopoulos et al. (2009), no processo em batelada, o substrato e os minerais estão inicialmente misturados no biorreator com uma razão inicial C/N alta, para impulsionar o

acúmulo de lipídios. Isto porque, conforme dito anteriormente, após a exaustão do nitrogênio no meio, a proliferação celular cessa, enquanto a síntese de lipídios permanece (RATLEDGE, 2002). Desde o início do processo o nitrogênio é consumido e a razão C/N, de carbono e nitrogênio residuais, aumenta continuamente, tendendo ao infinito. Enquanto não ocorrer a limitação do nitrogênio, o crescimento é exponencial. Contudo, o uso de uma razão C/N alta inicial pode ser prejudicial ao crescimento microbiano (BEOPOULOS et al., 2009).

Além disso, Beopoulos et al. (2009) observaram para a levedura *Yarrowia lipolytica* que a produção de ácido cítrico também pode ser induzida em função da razão C/N, comprometendo a conversão total de lipídios a partir do substrato, concorrendo com a síntese de lipídios desejada. Isto porque o ácido cítrico está presente no ciclo de reações metabólicas, como o ciclo de Krebs, responsável pela respiração celular, que compete com a rota metabólica que dá origem aos lipídios (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Na Tabela 3 estão compilados alguns dados da literatura com relação ao conteúdo lipídico produzido por diferentes leveduras oleaginosas em batelada.

Tabela 3 - Conteúdo lipídico acumulado por diferentes leveduras no processo em batelada, em frascos agitados.

Levedura	Substrato	Lipídios (%)	Referências
<i>Kodamaea ohmeri</i>	Glicerol bruto	53,3	KITCHA; CHEIRSILP (2011)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Hidrolisado de milho	45,4	CHEN et al. (2013)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Lodo de esgoto	68,0	ANGERBAUER et al. (2008)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Melaço	69,5	KARATAY; DÖNMEZ (2010)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Glicose e xilose	61,5	ZHAO et al. (2008)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Resíduo de levedura	37,7	RYU et al. (2013)
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	Hidrolisado de milho	37,8	HUANG et al. (2013)

3.6.2 Cultivo em batelada alimentada

Uma otimização do processo descontínuo é o processo em batelada alimentada, onde os substratos são adicionados sequencialmente ao longo do cultivo. A formação de subprodutos secundários é suprimida pela regulação das concentrações de carboidratos ou compostos nitrogenados, por isso, neste processo, elementos críticos da solução de nutrientes são adicionados em pequenas concentrações ao longo de toda produção (CRUEGER; CRUEGER, 1993).

A vantagem deste processo é que a concentração do nutriente limitante pode ser mantida a níveis mais baixos, evitando a repressão que este elemento pode ocasionar ao sistema quando em concentrações elevadas. Além disso, permite um controle sobre a taxa de crescimento dos micro-organismos, uma vez que está relacionada com a taxa específica de captação de oxigênio, garantindo um maior controle sobre a demanda de oxigênio (STANBURY et al., 1995).

Para que o processo de produção de lipídios por levedura seja eficiente e reprodutível é necessário ter-se um processo controlado, com regulação das variáveis ambientais, maximizando a estabilidade do estado metabólico. Para isso, é necessário ter um controle preciso da taxa de fluxo de nutrientes, já que maior controle significa maior estabilidade metabólica e, conseqüentemente, maior produção. No processo de batelada alimentada é possível realizar este controle, já que as taxas de nitrogênio e carbono são monitoradas para regular a taxa específica de crescimento e a razão C/N (STANBURY et al., 1995).

3.6.2.1 Produção de lipídios por batelada alimentada

Em uma operação em batelada alimentada os nutrientes são continuamente ou semicontinualmente alimentados, enquanto o efluente é removido descontinuamente. Este modo de cultivo é utilizado para superar a inibição do substrato pela alimentação intermitente. Se o substrato é inibidor, a adição intermitente de substrato aumenta a produtividade através da manutenção da concentração do substrato baixa (SHULER; KARGI, 2012). Li, Zhao e Bai (2007) estudaram a ação inibidora da concentração do substrato, constatando que ao aumentar a concentração de glicose no meio até 150 g L⁻¹ havia um crescimento satisfatório de biomassa e lipídios, mas a partir de 200 g L⁻¹ a concentração de ambos começou a diminuir, identificando-se a possibilidade de que um efeito inibitório tenha ocorrido. Zhang et al. (2011) também verificaram a ação inibitória da concentração de glicose sobre o crescimento de biomassa e acúmulo de lipídios, a partir da levedura *C. curvatus* O3. Identificou-se que para concentrações até 60 g L⁻¹ havia um aumento no número de células, então estabilizando, e um declínio acima de 120 g L⁻¹.

Segundo Ward (1991), concentrações de carbono elevadas podem inibir o crescimento devido aos efeitos osmóticos, pois a velocidade de crescimento das células microbianas depende da atividade de água ou da umidade relativa.

Beopoulos et al. (2009) relatam a influência que o excesso de carbono pode ocasionar no acúmulo de lipídios. Ele afirma que uma razão C/N muito elevada gera uma severa deficiência de nitrogênio, levando a um rápido declínio da viabilidade celular, antes mesmo da etapa de acúmulo de lipídios na célula. Papanikolaou et al. (2002) afirmam que para levedura *Yarrowia lipolytica* o precursor do acúmulo de lipídios é o ácido cítrico, e que em altas concentrações de carbono uma quantidade significante deste é produzido em detrimento ao acúmulo de lipídios. Isto porque a enzima ATP-citrato liase, enzima responsável pela biogênese de lipídios, é inativada quando há excesso de carbono no meio, resultando em baixos níveis de acumulação de lipídios.

Diante destas situações, salienta-se a importância de introduzir a batelada alimentada ao processo, visto que sua principal vantagem é a possibilidade de adicionar o substrato ao meio em mais de uma alimentação, dificultando que ocorra a inibição do crescimento microbiano pelo excesso de substrato. Esta inibição provavelmente explica o motivo pelo qual se tem relatado diferença entre cultivos em batelada e batelada alimentada.

Diversos estudos vêm sendo realizados para a obtenção de óleo microbiano provenientes de leveduras oleaginosas utilizando batelada alimentada como modo de cultivo (ANSCHAU et al., 2014; BÉLIGON et al., 2015; CESCUT et al., 2014; CHANG et al., 2013; FEI et al., 2016; FONTANILLE et al., 2012; GALAFASSI et al., 2012; SAENGE et al., 2011; THIRU; SANKH; RANGASWAMY, 2011; ZHANG et al., 2011; ZHAO et al., 2011). Na Tabela 4 estão compilados alguns dados da literatura com relação ao conteúdo lipídico produzido por diferentes leveduras oleaginosas em batelada alimentada, onde se pode observar a capacidade que diferentes micro-organismos podem apresentar no acúmulo de lipídios.

Além de evitar a ação inibitória de determinadas concentrações de substrato, o que se espera obter com o emprego do modo de cultivo em batelada alimentada é o aumento da produtividade em relação ao acúmulo de lipídios na levedura oleaginosa. Saenge et al. (2011) compararam os resultados obtidos entre os processos em batelada e batelada alimentada, para a levedura *R. glutinis* TISTR 5159, verificando que a utilização da batelada alimentada resultou em um aumento de aproximadamente 41 % na quantidade de lipídios totais produzidos (de 4,33 g L⁻¹ para 6,10 g L⁻¹). Conseqüentemente, a produtividade também aumentou, de 0,058 g L⁻¹ h⁻¹ para 0,085 g L⁻¹ h⁻¹. Fei et al. (2016) compararam o processo em batelada com a batelada alimentada, sendo esta com alimentação automática, verificando-se um aumento de produtividade de 0,28 g L⁻¹ h⁻¹ para 0,40 g L⁻¹ h⁻¹.

Tabela 4 - Conteúdo lipídico acumulado por diferentes leveduras em batelada alimentada.

Levedura	Substrato	Modo de operação	Lipídios (%)	Referência
<i>Cryptococcus</i> sp.	Glicose	Frascos agitados	63,5	CHANG et al. (2013)
<i>R. glutinis</i>	Glicerol bruto	Frascos agitados	60,7	SAENGE et al. (2011)
<i>R. toruloides</i>	Glicose	Frascos agitados	67,5	LI; ZHAO; BAI (2007)
<i>R. mucilaginosa</i>	Hidrolisado de mandioca	Frascos agitados	52,9	LI et al. (2010)
<i>C. curvatus</i>	Glicerol bruto	Biorreator	48,0	THIRU; SANKH; RANGASWAMY (2011)
<i>C. curvatus</i>	Glicose	Biorreator	82,7	ZHANG et al. (2011)
<i>R. toruloides</i>	Glicose	Biorreator	61,8	ZHAO et al. (2011)
<i>C. curvatus</i>	Glicerol bruto	Biorreator	52	LIANG et al. (2010)
<i>L. starkeyi</i>	Glicose e xilose	Biorreator	36,2	ANSCHAU et al. (2014)
<i>C. curvatus</i>	Acetato	Biorreator	60,0	BÉLIGON et al. (2015)
<i>R. toruloides</i>	Hidrolisado de milho	Biorreator	59,0	FEI et al. (2016)
<i>Y. lipolytica</i>	Glicose	Biorreator	40,0	FONTANIELLE et al. (2012)

3.6.3 Cultivo em modo contínuo

O processo em modo contínuo se diferencia dos demais, pois o meio nutriente é continuamente alimentado, e as células são simultaneamente retiradas, tendendo ao estado estacionário ao longo de um determinado período, onde a concentração de biomassa, produto e substrato se mantém constante (SHULER; KARGI, 2012). Diferente do cultivo em batelada, o modo contínuo permite um crescimento equilibrado, com poucas flutuações dos nutrientes, metabólitos ou biomassa. No cultivo em batelada, fatores como pH e concentração de nutrientes variam constantemente ao longo do cultivo, já no processo contínuo estas variáveis podem operar praticamente constantes (SMITH, 2009).

Além disso, é esperado que o modo contínuo favoreça o crescimento microbiano, assim como a produção de lipídios. Papanikolaou e Aggelis (2002) observaram que os experimentos realizados em estágio único no modo contínuo acumularam maiores quantidades de lipídios que os realizados em frascos agitados para levedura *Yarrowia lipolytica*.

Em contrapartida, o processo contínuo pode oferecer muitas dificuldades, como: alto custo; problemas de assepsia da operação; necessidade de operadores altamente treinados; entre outros (SMITH, 2009).

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme observado através da revisão bibliográfica, há um grande interesse na obtenção de lipídios por via biotecnológica, por ser uma possível alternativa de matéria-prima para produção de biodiesel. Além disso, o uso de glicerol bruto como fonte de carbono, oriundo da cadeia produtiva de biodiesel agrega valor ao processo como um todo.

A partir da utilização do modo em batelada alimentada nos cultivos, espera-se obter maior crescimento microbiano e acúmulo de lipídios. Isto porque, comparado ao modo em batelada, este permite maior controle sobre as alimentações do substrato evitando possíveis inibições do mesmo sobre o desenvolvimento celular.

Assim, este trabalho visa contribuir nestes estudos, avaliando o comportamento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688, em um meio composto por glicerol bruto gerado como coproduto da síntese de biodiesel, identificando os efeitos produzidos pelas diferentes estratégias de alimentação no cultivo em batelada alimentada, sobre a obtenção de biomassa lipídica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO

Nos cultivos foi utilizada a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, isolada pela equipe do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG em estudo anterior (OTERO, 2011), estando depositada na Fundação André Tosello (CCT 7688). Para reativação e manutenção, esta levedura foi transferida para tubos de ensaio com ágar inclinado YM (*Yeast Malt*), composto por (g L⁻¹): 10 glicose, 5 peptona, 3 extrato de malte, 3 extrato de levedura, 20 ágar bacteriológico. Para o crescimento, os tubos foram incubados em estufa a 25 °C por 48 h.

4.2 GLICEROL BRUTO

O glicerol bruto utilizado foi proveniente da empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo – RS, obtido da produção de biodiesel a partir do óleo degomado de soja por via metanólica, com especificação da composição do glicerol em laudo anexo (Anexo A).

4.3 PRÉ-INÓCULO E INÓCULO

Para o preparo do pré-inóculo, dois tubos da cultura microbiana reativada foram raspados com água peptonada 0,1 % m/v, sendo adicionados 10 mL em cada tubo, para remoção das células e as mesmas foram transferidas para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 180 mL de caldo YM. Posteriormente, o pré-inóculo foi incubado a 30°C em incubadora rotatória (Tecnal TE-424, Brasil) a 180 rpm (SPIER, 2014). Após 48 h, 20 mL do pré-inóculo foi transferido para o meio de inóculo (180 mL), com a mesma composição, e incubado nas mesmas condições de temperatura e rotação. Após 72 h, a quantidade mínima de 1×10^8 células mL⁻¹ foi verificada por contagem em câmara de Neubauer, sendo transferido 10 % do volume inicial para o início de cada cultivo.

4.4 CULTIVO EM BATELADA EM FRASCOS AGITADOS

Os cultivos em batelada simples foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume inicial de 200 mL de meio em incubadora rotatória (Tecnal TE-424, Brasil) a 180 rpm. Primeiramente, o meio e as condições de cultivo utilizadas foram as mesmas

propostas por Spier (2014), denominado como meio A: 30 g L^{-1} glicerol, $5,0 \text{ g L}^{-1}$ KH_2PO_4 , $1,0 \text{ g L}^{-1}$ Na_2HPO_4 , $3,0 \text{ g L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,2 \text{ g L}^{-1}$ extrato de levedura, pH inicial 4,5 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Contudo, foi adicionado glicerol bruto na concentração de $36,62 \text{ g L}^{-1}$ em virtude de sua composição não conter apenas glicerol.

Outro meio de cultivo também foi testado, cuja composição foi adaptada do caldo YM (*Yeast Malt*), substituindo a glicose do meio por glicerol bruto. Para esse fim, foi modificada a composição do meio, mantendo fixa a razão C/N, utilizando a ferramenta SOLVER disponível no programa EXCEL (Microsoft Inc., EUA), onde a razão C/N desejada foi de 7,63, correspondente ao meio YM, de acordo com a composição em carbono e nitrogênio de seus constituintes. Este foi denominado meio B, composto por (g L^{-1}): 10,4 glicerol bruto, 4,3 peptona, 2,6 extrato de malte, 3,4 extrato de levedura, sem ajuste de pH. As demais condições de cultivo foram as mesmas utilizadas por Spier (2014).

Ao longo dos cultivos, foram retiradas amostras para determinação de biomassa e pH, e ao término foi realizada a determinação de lipídios. Os tempos de cultivo foram diferentes para cada estratégia utilizada, sendo estabelecidos de acordo com a estabilidade do crescimento microbiano.

4.5 CULTIVO EM BATELADA ALIMENTADA EM FRASCOS AGITADOS

As condições do cultivo, assim como a composição do meio, foram as mesmas do modo em batelada. A curva de crescimento microbiano da batelada simples foi utilizada como base para determinação das estratégias de alimentação dos cultivos em batelada alimentada, as quais estão descritas a seguir.

Primeiramente, foram realizados os cultivos com o meio A. Diferentes estratégias de alimentação foram abordadas neste estudo (Tabela 5). As primeiras estratégias empregadas foram com alimentação composta de 10 % do volume inicial (ou seja, 20 mL) de apenas glicerol bruto ou de meio de cultivo, ambos 10 vezes mais concentrados. No preparo do meio utilizado para as alimentações foi mantida a proporção inicial entre os componentes ($366,2 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol, 50 g L^{-1} de KH_2PO_4 , 10 g L^{-1} de Na_2HPO_4 , 30 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12 g L^{-1} de extrato de levedura), sendo alimentados em diferentes tempos (pulsos de alimentação): um pulso na fase exponencial (48 h) ou na fase estacionária (96 h). Diante dos resultados obtidos destes cultivos, novas estratégias foram propostas de acordo com o resultado de cada ensaio, visando um maior acúmulo de lipídios na célula e/ou maior produção de biomassa.

Tabela 5 - Estratégias de alimentação em batelada alimentada com meio A empregadas no presente estudo.

Código	Variáveis
G48	Glicerol (20 mL) em 48 h
M48	Meio (20 mL) em 48 h
G96	Glicerol (20 mL) em 96 h
M96	Meio (20 mL) em 96 h
M96A	Meio (20 mL) em 96 h + 10 mL (144 h) + 10 mL (192 h)
M96B	Meio (20 mL) em 96 h + 10 mL (144 h)
M96C	Meio (10 mL) em 96 h + 10 mL (144 h)
M48A	Meio (20 mL) em 48 h + 10 mL (72 h) + 10 mL (96 h)
M48B	Meio (20 mL) em 48 h + 10 mL (72 h)
M48C	Meio (10 mL) em 48 h + 10 mL (72 h)

Para o meio B, diferentes estratégias de alimentação foram realizadas (Tabela 6). As primeiras estratégias testadas foram com alimentação de 20 mL de glicerol bruto, ou seja, 10 % do volume inicial, e 10 vezes mais concentrado (104 g L^{-1} de glicerol bruto), sendo alimentados em diferentes tempos: um pulso na fase exponencial (24 h) ou na fase estacionária (96 h), correspondendo às estratégias YMG24 e YMG96. O cultivo YMGM foi alimentado com 20 mL de meio, também 10 vezes mais concentrado (104 g L^{-1} de glicerol, 43 g L^{-1} de peptona, 26 g L^{-1} de extrato de malte, 34 g L^{-1} de extrato de levedura). De acordo com os resultados obtidos nesses cultivos, novas estratégias foram propostas de acordo com o resultado de cada ensaio, buscando um maior acúmulo de lipídios na célula e/ou maior produção de biomassa.

Assim como o processo em batelada, ao longo do cultivo foram retiradas amostras para determinação de biomassa e pH, sendo realizado ao término do cultivo, a determinação de lipídios. Os tempos de cultivo foram diferentes para cada estratégia utilizada, sendo estabelecidos de acordo com a estabilidade do crescimento microbiano.

Tabela 6 - Estratégias de alimentação em batelada alimentada com meio B empregadas no presente estudo.

Código	Variáveis
YMG24	Glicerol (20 mL) em 24 h
YMG96	Glicerol (20 mL) em 96 h
YMM24	Meio (20 mL) em 24 h
YMG1	Glicerol (20 mL) em 24 h + 20 mL (96 h)
YMG2	Glicerol (20 mL) em 24 h + 20 mL (96 h) + 20 mL (144 h)
YMG3	Glicerol (20 mL) em 24 h + 20 mL (72 h) + 20 mL (120 h)
YMG4	Ajuste de pH 4,5, glicerol (20 mL) em 24 h + 20 mL (96 h) + 20 mL (144 h)
YMG5	Adição de MgSO ₄ .7H ₂ O, glicerol (20 mL) em 24 h + 20 mL (96 h) + 20 mL (144 h)
YMG6	Adição de MgSO ₄ .7H ₂ O e ajuste de pH 4,5, glicerol (20 mL) em 24 h + 20 mL (96 h) + 20 mL (144 h)

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Biomassa

Amostras com volume de 10 mL foram centrifugadas (Eppendorf 5804 R, Alemanha) a $10414 \times g$ por 15 min e as células lavadas com água destilada, sendo novamente centrifugadas. Posteriormente, as células foram ressuspensas em água destilada e realizada a leitura de absorvância no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro (Bioespectro SP 220, China). O valor de absorvância obtido foi convertido em concentração de massa seca ($g L^{-1}$) através de uma curva padrão de biomassa previamente determinada para o micro-organismo (Figura 1A, Apêndice A), baseado no método descrito por Choi e Park (2003).

4.6.2 pH

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

4.6.3 Lipídios

A concentração de lipídios foi determinada pelo método de Bligh e Dyer (1959), adaptado por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001). A biomassa foi seca a 35 °C por 24 h em estufa de secagem com circulação de ar. Após, foi triturada utilizando gral e pistilo por

aproximadamente 1 min, obtendo-se uma biomassa em forma de pó, sendo pesada entre 300 e 500 mg. Logo, foi adicionado 5 mL de HCl 2 M para o rompimento da parede celular da levedura. Após digestão em banho a 80 °C por 1 h, o tubo contendo a biomassa e o ácido foi resfriado e centrifugado por 15 min a $10414 \times g$ (Eppendorf 5804 R, Alemanha). Então, a fase de fundo foi retirada, ou seja, o ácido, com o auxílio de uma seringa, permanecendo a biomassa no tubo.

Posteriormente, na fração da biomassa foi realizada a extração dos lipídios com a adição de 4 mL de metanol, 2 mL de clorofórmio, e mais 2 mL de clorofórmio, intercalando agitações de 2 min entre as adições. Também foram adicionados 3,6 mL de água destilada, e após agitação o tubo foi então centrifugado por 5 min a $10414 \times g$. Desta centrifugação, resultou um sistema bifásico constituído de metanol e água (fase superior), biomassa (interface) e clorofórmio (fase inferior). Os lipídios ficaram solubilizados no clorofórmio, na fase inferior, sendo separado do sistema. Uma segunda extração foi necessária, com adição de 4 mL de uma solução de 10 % de metanol em clorofórmio ao resíduo contido no tubo. Após agitação, este foi centrifugado por 5 min a $10414 \times g$, retirando-se o extrato e juntando-o ao primeiro. Este extrato foi evaporado em um rotaevaporador e os lipídios quantificados por gravimetria.

4.6.4 Glicerol

A determinação do glicerol foi realizada no sobrenadante das alíquotas do cultivo, utilizando o método descrito por Bondioli e Bella (2005), onde 0,5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo de ensaio de 10 mL. Posteriormente, 1,5 mL de solvente de trabalho (água destilada e etanol 95 %, 1:1) foram adicionados, seguindo a adição de 1,2 mL de solução de periodato de sódio 10 mM e agitação por 30 s. Logo, 1,2 mL de solução de acetilacetona 0,2 M foram adicionados, sendo o tubo de ensaio colocado em banho a 70 °C por 1 min. Após o tempo de reação, o tubo foi resfriado, imediatamente, por imersão em banho (20 a 25 °C), e então a absorvância foi lida em espectrofotômetro (Bioespectro SP 220, China) em comprimento de onda de 410 nm. O valor obtido foi convertido em concentração de glicerol (g L^{-1}) através de uma curva padrão previamente determinada.

4.6.5 Perfil de ácidos graxos

A determinação do perfil de ácidos graxos foi realizada utilizando o método adaptado de Metcalfe, Schmitz e Pelka (1966) para a esterificação da fração lipídica. As

amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso (Shimadzu 2010 Plus, Japão), equipado com injetor *split/splitless*, coluna capilar RTX®-1 (30 m × 0,25 mm diâmetro interno × 0,25 µm) e detector por ionização de chama. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio em uma vazão de 1,25 mL min⁻¹, e as temperaturas do injetor e do detector foram de 260 °C. Para a separação, as condições cromatográficas foram: temperatura inicial da coluna de 50 °C, elevando-se para 200 °C em uma taxa de 6 °C min⁻¹, sendo mantida nesta temperatura por 4 min; na segunda rampa de aquecimento, a taxa de aumento foi de 2 °C min⁻¹ até 240 °C, sendo mantida nesta temperatura por 10 min. Os padrões Sigma-Aldrich foram utilizados para identificação dos ácidos graxos, sendo estes quantificados por normatização da área (MASSAROLO et al., 2016).

4.6.6 Equações

Os lipídios totais e produtividade de lipídios foram calculados a partir das Equações 1 e 2.

$$\text{Lipídios totais (g L}^{-1}\text{)} = \text{Biomassa final} \times \text{Conteúdo lipídico} \quad (1)$$

$$\text{Produtividade de lipídios (g L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Lipídios totais}}{\text{Tempo total de cultivo}} \quad (2)$$

4.6.7 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata, empregando-se ANOVA seguida pelo teste de Tukey ou teste t de Student para verificação de diferenças significativas entre as condições de cultivo testadas, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

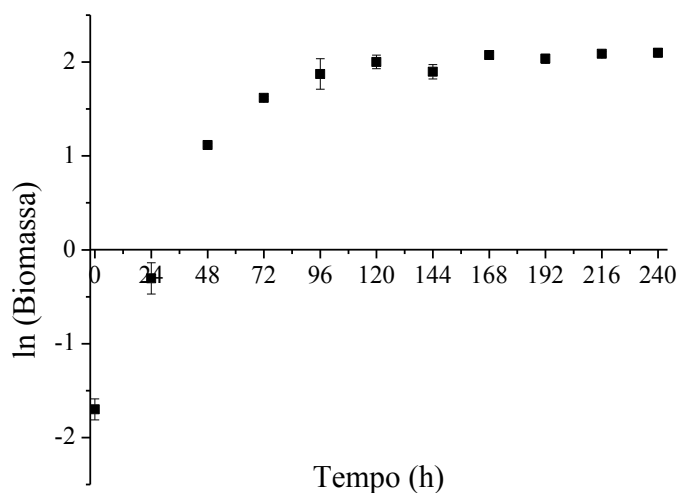
5.1 CULTIVOS COM O MEIO A

5.1.1. Cultivo em batelada simples

O cultivo em batelada simples (BS-A) com o meio A teve duração de 10 dias (240 h), sendo encerrado no momento em que se constatou a estabilidade do crescimento microbiano. Conforme os resultados obtidos no cultivo (Tabela 1B, Apêndice B), foi confirmado que a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* apresenta a capacidade de crescer em um meio contendo glicerol bruto como fonte de carbono, resultando na concentração de biomassa, no conteúdo lipídico e nos lipídios totais produzidos ($8,16 \pm 0,36 \text{ g L}^{-1}$, $42,9 \pm 0,8 \%$ e $3,50 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente) similares aos valores encontrados por outros pesquisadores. As leveduras *Trichosporonoides spathulata* e *Kodamaea ohmeri* também apresentaram a capacidade de crescer em glicerol bruto, sendo que resultaram em uma concentração de biomassa de $9,17 \text{ g L}^{-1}$ e $10,45 \text{ g L}^{-1}$, e de lipídios totais de $3,85 \text{ g L}^{-1}$ e $3,17 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (KITCHA; CHEIRSILP, 2011). Apesar do crescimento microbiano ter sido maior, os lipídios totais obtidos foram semelhantes ao deste trabalho. Papanikolaou e Aggelis (2002) observaram o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* em glicerol bruto, apresentando uma concentração de biomassa de $8,1 \text{ g L}^{-1}$, conteúdo lipídico de 43 % e lipídios totais de $3,5 \text{ g L}^{-1}$. Li et al. (2010) verificaram que a levedura *R. mucilaginosa* TJY15a, quando cultivada em meio contendo hidrolisado de amido de mandioca como fonte de carbono, apresentou o maior acúmulo de lipídios (45,9 % de conteúdo lipídico e $10,9 \text{ g L}^{-1}$ de concentração de biomassa) em relação a outras fontes de carbono.

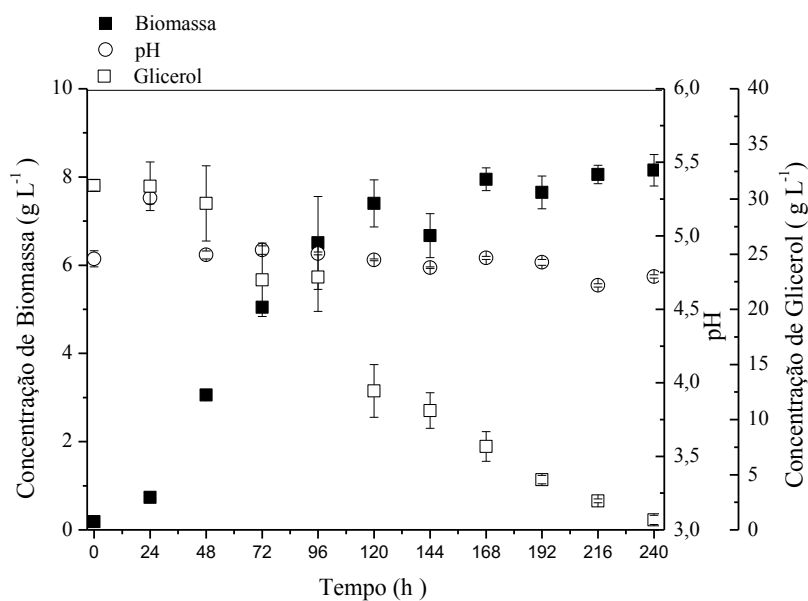
Através da curva de crescimento da *R. mucilaginosa* (Figura 2) foi possível identificar a duração das fases de crescimento do micro-organismo, sendo que a fase exponencial foi até 72 h e a fase estacionária iniciou em 96 h.

Figura 2 - Curva de crescimento do micro-organismo no cultivo em batelada simples (BS-A). Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).



As curvas de concentração de biomassa em função do tempo e os resultados obtidos no monitoramento do pH e concentração de glicerol estão apresentados na Figura 3. O pH se manteve próximo de 5,0, enquanto que a concentração de glicerol apresentou um decréscimo até aproximadamente 1 g L^{-1} , demonstrando o consumo da fonte de carbono no meio de cultivo.

Figura 3 – Biomassa, pH e consumo de glicerol pela levedura *R. mucilaginosa* ao longo do cultivo em batelada simples com meio A. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).

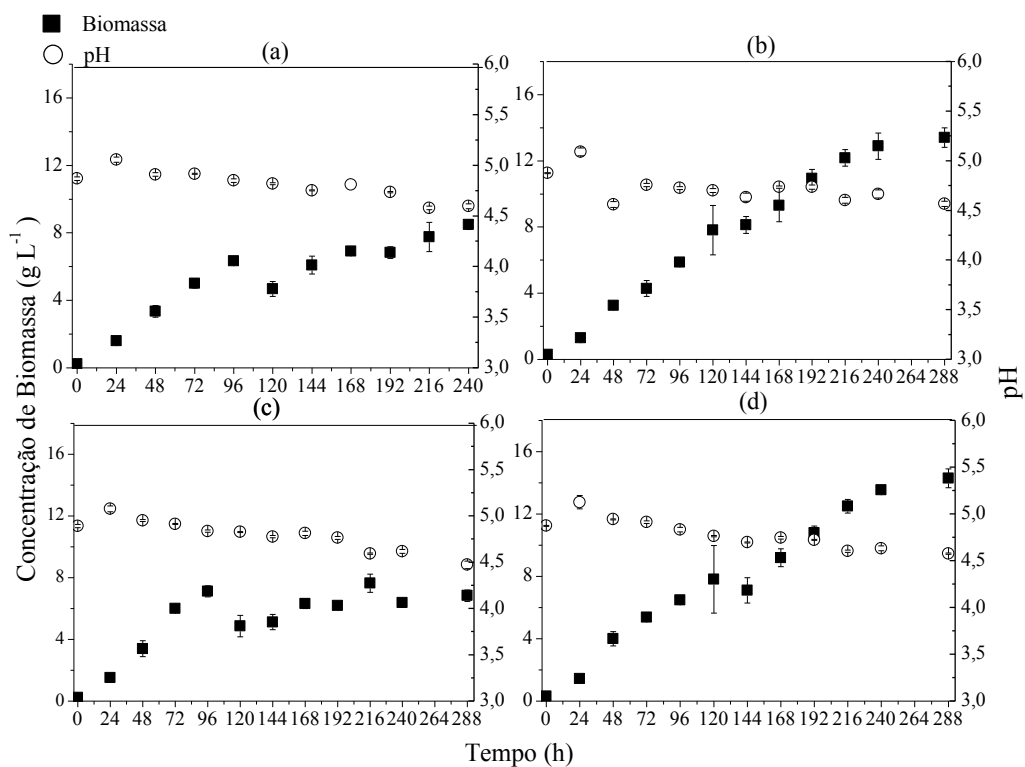


5.1.2 Cultivos em batelada alimentada

A partir da curva de crescimento celular do cultivo em batelada (Figura 2) foi possível identificar as fases de crescimento do micro-organismo. Diante disso, foram definidas as primeiras estratégias de alimentação dos cultivos em batelada alimentada: alimentação na fase exponencial (48 h) e alimentação na fase estacionária (96 h). Para cada alimentação foi avaliada a adição de apenas glicerol bruto e de meio de cultivo, para comparar a influência de cada um no crescimento celular e na obtenção de lipídios.

As curvas de concentração de biomassa em função do tempo e os resultados obtidos do monitoramento do pH estão apresentados na Figura 4, onde se pode observar que as alimentações provocaram um prolongamento no tempo de crescimento do micro-organismo (com exceção de G48), passando o tempo total de cultivo de 240 h (BS-A) para 288 h. Além disso, as estratégias com alimentação de meio apresentaram incrementos de quase 1,5 vezes na biomassa em relação ao processo em batelada (Tabela 1B, Apêndice B), em razão da maior disponibilidade de carbono e nitrogênio no meio.

Figura 4 - Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura *R. mucilaginosa* em batelada alimentada, com alimentações de meio de cultivo ou glicerol bruto nos tempos de 48 h ou 96 h, com meio A. (a) Alimentação de 20 mL de glicerol em 48 h (G48). (b) Alimentação de 20 mL de meio em 48 h (M48). (c) Alimentação de 20 mL de glicerol em 96 h (G96). (d) Alimentação de 20 mL de meio em 96 h (M96). Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).



Os resultados obtidos para cada cultivo estão apresentados na Tabela 7, onde se pode observar que os valores de conteúdo lipídico foram os mesmos para todos os casos, sem apresentar diferença significativa ($p > 0,05$). Os cultivos com alimentação de glicerol apresentaram diferenças significativas entre si ($p \leq 0,05$) entre os diferentes tempos de alimentação em relação a lipídios totais, biomassa e produtividade, já que foram maiores no cultivo com alimentação em 48 h. Isto pode estar relacionado ao consumo de glicerol no meio, ou seja, em 48 h (fase exponencial) o micro-organismo pode ter apresentado uma maior capacidade de consumo da fonte de carbono, quando comparado à fase estacionária. Até porque o micro-organismo consegue consumir mais carbono quando se tem mais nitrogênio presente no meio, ou seja, na fase estacionária a maior parte deste nitrogênio já pode ter sido consumida.

Tabela 7 – Comparação dos cultivos em batelada alimentada com alimentação em 48 h e 96 h de meio e glicerol bruto (M48, M96, G48 e G96).

	Composição da alimentação	Tempo de alimentação (h)	
		48	96
Conteúdo lipídico (%)	Glicerol bruto	42,9 ^{a,A} ± 0,3	42,9 ^{a,A} ± 1,3
	Meio	42,0 ^{a,A} ± 1,5	41,4 ^{a,A} ± 2,2
Lipídios totais (g L ⁻¹)	Glicerol bruto	3,64 ^{a,B} ± 0,29	2,93 ^{b,B} ± 0,09
	Meio	5,63 ^{a,A} ± 0,11	5,30 ^{a,A} ± 0,53
Biomassa (g L ⁻¹)	Glicerol bruto	8,48 ^{a,B} ± 0,29	6,84 ^{b,B} ± 0,37
	Meio	13,42 ^{a,A} ± 0,58	12,80 ^{a,A} ± 0,87
Produtividade de lipídios totais (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Glicerol bruto	0,015 ^{a,B} ± 0,001	0,010 ^{b,B} < 0,001
	Meio	0,020 ^{a,A} < 0,001	0,018 ^{a,A} ± 0,002

M48: 20 mL de meio em 48 h; M96: 20 mL de meio em 96 h; G48: 20 mL de glicerol bruto (366,2 g L⁻¹) em 48 h; G96: 20 mL de glicerol bruto (366,2 g L⁻¹) em 96 h. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferenças significativas entre os tempos de alimentação para a mesma composição de alimentação ($p > 0,05$). Letras maiúsculas iguais indicam que não há diferenças significativas entre as composições de alimentação para um mesmo tempo de alimentação ($p > 0,05$).

Por outro lado, os cultivos com alimentação de meio de cultivo em diferentes tempos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Este comportamento é justificado, já que as alimentações foram com meio de cultivo, contendo tanto fonte de carbono como nitrogênio, evitando que ocorresse o mesmo comportamento dos cultivos com adição de glicerol, no qual a redução de nitrogênio presente no meio dificultou o consumo de glicerol.

Ao se comparar os cultivos com alimentação de glicerol e com alimentação de meio, percebe-se que lipídios totais, biomassa e produtividade foram maiores com alimentação de meio ao invés de glicerol bruto, corroborando com os argumentos já mencionados. Portanto,

foi possível concluir que a alimentação de meio em 48 h e 96 h apresentaram os melhores resultados.

Com base nestas estratégias, foram propostos experimentos com uma primeira alimentação de meio de cultivo no tempo de 48 h ou 96 h, sendo sucedida de uma segunda, ou até terceira, alimentação no mesmo cultivo. Assim foram estipulados os cultivos M48A, M48B e M48C, resultantes do cultivo M48, e os cultivos M96A, M96B e M96C, resultantes do M96. Entende-se por: M48A o cultivo com alimentação de 20 mL de meio em 48 h, 10 mL em 72 h e 10 mL em 96 h; M48B com 20 mL de meio em 48 h e 10 mL em 96 h; M48C com 10 mL de meio em 48 h e 10 mL de meio em 96 h; M96A o cultivo alimentado com 20 mL de meio em 96 h, 10 mL de meio em 144 h e 10 mL de meio em 192 h; M96B com 20 mL de meio em 96 h e 10 mL de meio em 144 h; e M96C com 10 mL de meio em 96 h e 10 mL de meio em 144 h (segundo Tabela 5). A partir destas estratégias, visou-se obter uma maior concentração de biomassa, assim como de lipídios totais, visto que uma única alimentação já resultou em aumento para ambos os parâmetros.

Iniciando pelos cultivos com a primeira alimentação em 96 h, o melhor resultado foi para M96B (Tabela 8), pois o conteúdo lipídico e os lipídios totais foram maiores significativamente ($p \leq 0,05$) que os demais cultivos. A adição de mais 10 mL de meio ao cultivo (M96B), quando comparado a M96, resultou em um aumento significativo de biomassa, e consequentemente de lipídios totais. Além disso, a biomassa obtida foi igual para todas as demais estratégias, ou seja, alimentações posteriores ao tempo de 144 h (M96A) não se mostraram necessárias, visto que não favoreceu o acúmulo de lipídios. Da mesma forma, pulsos com volumes reduzidos (M96C) não exerceram influência positiva sobre o acúmulo de lipídios, nem sobre o crescimento microbiano.

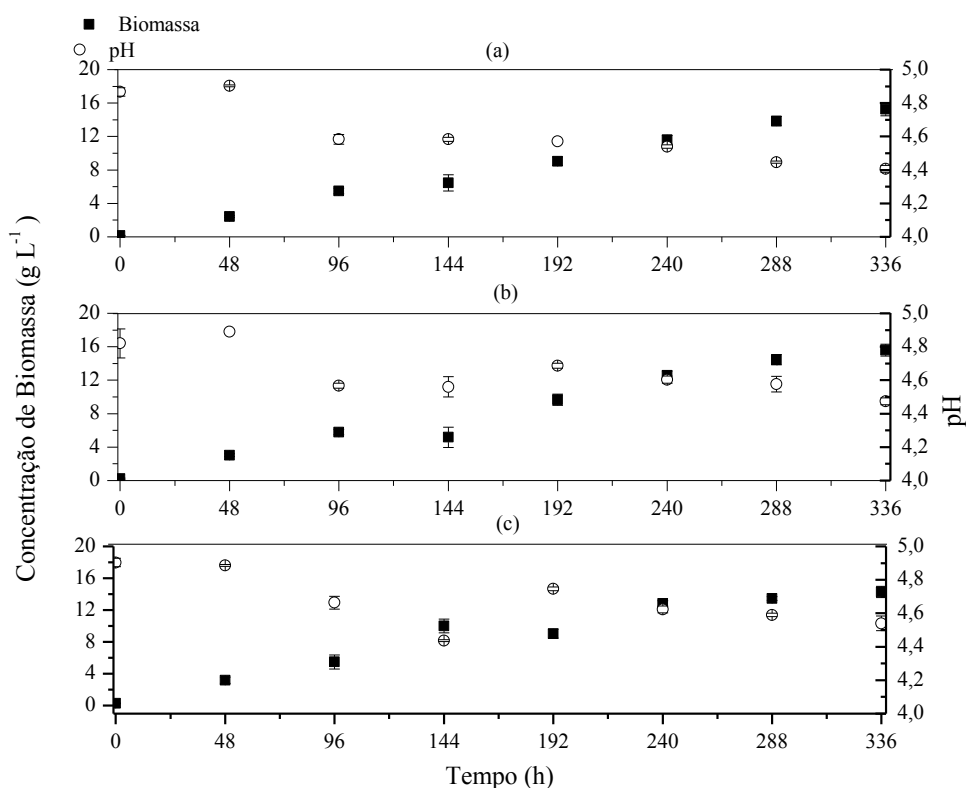
As curvas de concentração de biomassa em função do tempo e os resultados obtidos do monitoramento do pH estão apresentados na Figura 5, onde se observa que as alimentações tardias resultaram em um alongamento do tempo total de cultivo ainda maior (336 h).

Tabela 8 - Comparação dos cultivos em batelada alimentada com alimentação de meio em 96 h (M96) e estratégias M96A, M96B e M96C.

	Estratégia de Alimentação			
	M96	M96A	M96B	M96C
Conteúdo lipídico (%)	41,4 ^{a,b} ± 2,2	37,1 ^c ± 0,7	43,9 ^a ± 1,4	38,0 ^{b,c} ± 1,5
Lipídios totais (g L⁻¹)	5,30 ^b ± 0,53	5,67 ^b ± 0,26	6,86 ^a ± 0,49	5,42 ^b ± 0,06
Biomassa (g L⁻¹)	12,80 ^b ± 0,87	15,29 ^a ± 0,78	15,61 ^a ± 0,72	14,30 ^{a,b} ± 0,70
Produtividade de lipídios totais (g L⁻¹h⁻¹)	0,018 ^a ± 0,002	0,017 ^b ± 0,001	0,020 ^a ± 0,001	0,016 ^b < 0,001

M96: 20 mL de meio em 96 h; M96A: 20 mL de meio em 96 h, mais 10 mL em 144 h e mais 10 mL em 192 h; M96B: 20 mL de meio em 96 h e mais 10 mL em 144 h; M96C: 10 mL de meio em 96 h e mais 10 mL em 144 h. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p \leq 0,05$).

Figura 5 – Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura *R. mucilaginosa* em batelada alimentada para as estratégias M96A, M96B e M96C. (a) M96A: 20 mL de meio em 96 h, 10 mL em 144 h e 10 mL em 192 h. (b) M96B: 20 mL de meio em 96 h e 10 mL em 144 h. (c) M96C: 10 mL de meio em 96 h e 10 mL em 144 h. Valores médios ± desvio padrão (n = 3).



Por conseguinte, os cultivos M48A, M48B e M48C foram propostos, onde M48A foi o cultivo com alimentação de 20 mL de meio em 48 h, 10 mL em 72 h e 10 mL em 96 h; M48B foi com 20 mL de meio em 48 h e 10 mL em 96 h; e M48C foi com 10 mL de meio em 48 h e 10 mL de meio em 96 h. Ao se comparar estes três cultivos entre eles

e com o M48 (Figura 6 e Tabela 9), pode-se afirmar que a melhor estratégia proposta foi a M48A, pois mesmo os demais parâmetros sendo iguais estatisticamente ($p > 0,05$), para M48A e M48B a produtividade de lipídios foi maior ($p \leq 0,05$). Isto é, a estratégia M48A resultou em lipídios totais produzidos, concentração de biomassa e conteúdo lipídico iguais ou superiores às demais estratégias, contudo em um tempo menor (tempo total de cultivo de 240 h, sendo M48B de 288 h e M48C de 288 h). Este comportamento pode ter acontecido em função da segunda alimentação ter ocorrido ainda na fase exponencial, visto que provavelmente o consumo de glicerol seja maior nesta fase, que na fase estacionária, pela maior atividade celular.

Figura 6 – Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura *R. mucilaginosa* em batelada alimentada para as estratégias M48A, M48B e M48C. (a) M48A: 20 mL de meio em 48 h, 10 mL em 72 h e 10 mL em 96 h. M48B: 20 mL de meio em 48 h e 10 mL em 96 h. M48C: 10 mL de meio em 48 h e 10 mL de meio em 96 h. Valores médios \pm desvio padrão ($n = 3$).

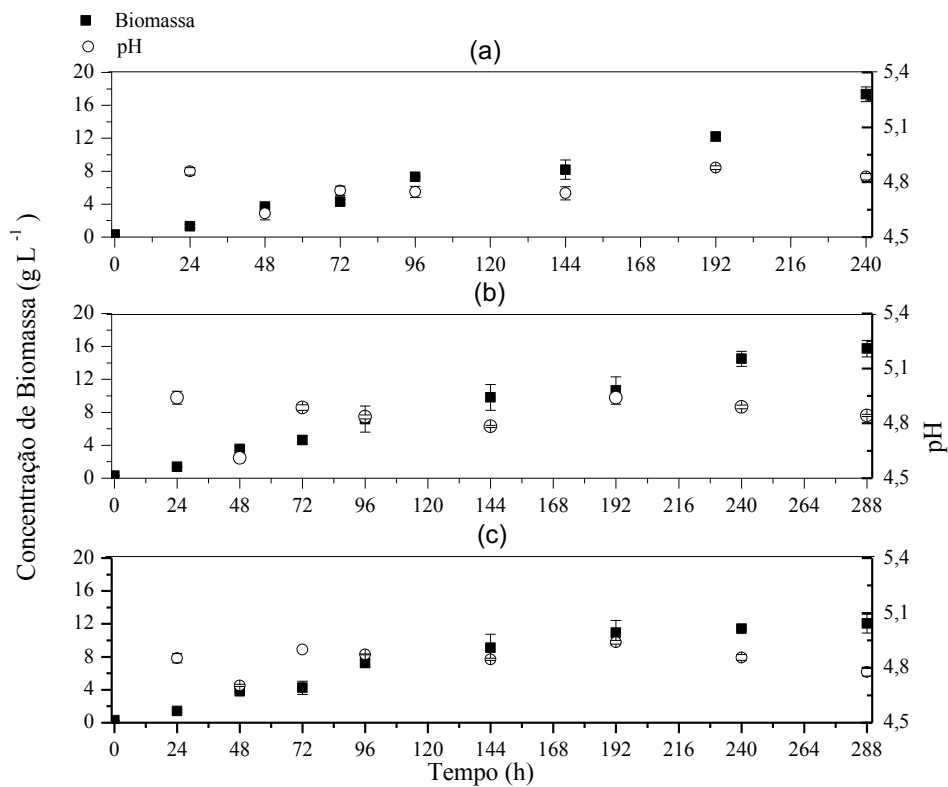


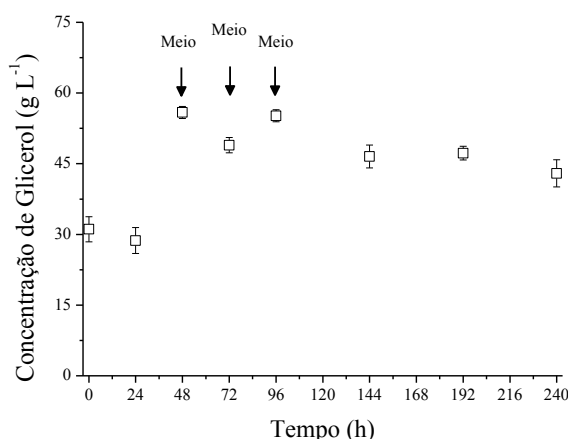
Tabela 9 - Comparação entre os cultivos em batelada alimentada: M48, M48A, M48B e M48C.

	Estratégia de alimentação			
	M48	M48A	M48B	M48C
Conteúdo lipídico (%)	42,0 ^a ± 1,5	42,0 ^a ± 2,2	42,5 ^a ± 2,5	37,3 ^a ± 5,8
Lipídios totais (g L⁻¹)	5,63 ^{a,b} ± 0,11	7,30 ^a ± 0,68	6,72 ^a ± 0,79	4,52 ^b ± 1,01
Biomassa (g L⁻¹)	13,42 ^{b,c} ± 0,58	17,38 ^a ± 0,89	15,76 ^{a,b} ± 1,00	12,07 ^c ± 1,13
Produtividade de lipídios totais (g L⁻¹h⁻¹)	0,020 ^{b,c} < 0,001	0,030 ^a ± 0,003	0,023 ^b ± 0,003	0,016 ^c ± 0,004

M48: 20 mL de meio em 48 h; M48A: 20 mL de meio em 48 h, 10 mL em 72 h e 10 mL em 96 h; M48B: 20 mL de meio em 48 h e 10 mL em 96 h; M48C: 10 mL de meio em 48 h e 10 mL de meio em 96 h. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p \leq 0,05$).

A partir da análise de todos os resultados obtidos, é possível afirmar que a melhor estratégia foi a M48A frente aos resultados apresentados (Tabela 1B, Apêndice B), pois o mesmo resultou em aproximadamente 42 % de conteúdo lipídico, 7,30 g L⁻¹ de lipídios totais produzidos e 17,38 g L⁻¹ de concentração de biomassa. Quando comparado com o cultivo em batelada, houve um aumento de biomassa de 8,16 g L⁻¹ para 17,38 g L⁻¹, e de lipídios totais de 3,50 para 7,30 g L⁻¹, ou seja, um aumento de aproximadamente 112 % e 108 %, respectivamente. Para a produtividade de lipídios também foi observado um aumento de 100 %, a qual passou de 0,015 g L⁻¹ h⁻¹ para 0,030 g L⁻¹ h⁻¹. Isto se deve ao aumento da disponibilidade da fonte de carbono e nitrogênio em função das alimentações, permitindo um maior crescimento microbiano, sem efeitos inibitórios. Na Figura 7 está apresentado o consumo de glicerol ao longo do cultivo M48A, demonstrando que apesar do consumo não ter sido total, a estratégia de alimentação ainda na fase exponencial, mantendo a concentração de glicerol elevada, permitiu um maior crescimento celular. Este fato se deve, possivelmente, pelo nitrogênio estar sendo consumido preferencialmente nesta fase de crescimento, e seu acréscimo ao meio contribuir para o desenvolvimento microbiano.

Figura 7 - Consumo de glicerol pela levedura *R. mucilaginosa* ao longo do cultivo em batelada alimentada M48A. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3). As setas indicam a alimentação de meio de cultivo nos tempos 48 h, 72 h e 96 h.



5.2 CULTIVOS REALIZADOS NO MEIO B

5.2.1 Cultivo em batelada simples

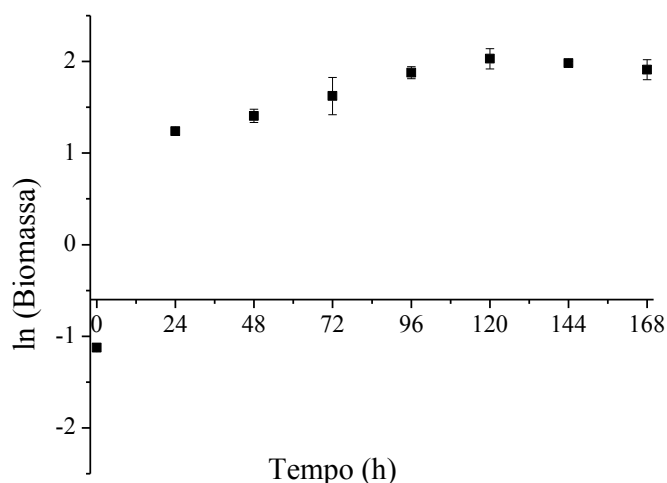
Outra estratégia de cultivo foi testada, onde se utilizou um meio com composição similar ao YM (*Yeast Malt*), contudo com a substituição de glicose por glicerol bruto (meio B). As determinações de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram realizadas em Analisador Elementar CHNS/O, Modelo 2400 Serie II da Perkin Elmer, cujos resultados estão nas Tabelas 1C e 2C (Apêndice C). A decisão de se testar outro meio foi tomada em função do acúmulo de lipídios no interior das células do micro-organismo observado na etapa anterior do estudo (meio A), pois apesar de se analisar diferentes alimentações no cultivo com meio A, não ocorreu um aumento da capacidade de acúmulo de lipídios (o conteúdo lipídico não foi afetado pelas alimentações). Dessa forma, estudar um novo meio, cuja composição não foi otimizada, poderia permitir uma avaliação mais completa sobre o impacto das alimentações na obtenção de lipídios. Isto porque o meio A possui uma razão C/N inicial alta de 93, ou seja, quando novas alimentações com apenas glicerol bruto foram realizadas, estas não apresentaram influência sobre o teor de lipídios acumulados. Isto contradiz a literatura, visto que de acordo com Angerbauer et al. (2008), o aumento da razão C/N favorece o acúmulo de lipídios na célula microbiana. Em contrapartida, novas alimentações de meio ao longo do cultivo favoreceram o crescimento microbiano, entretanto mantendo o mesmo teor de lipídios produzidos pela célula. Isto significa que a razão C/N já inicia alta, e que alimentações intermitentes de carbono e nitrogênio praticamente não alteram a razão C/N, apenas a mantém em patamares elevados.

Para um processo em batelada, esta razão C/N empregada é adequada, contudo, para o processo em batelada alimentada busca-se obter incrementos no acúmulo de lipídios significativos a partir destas alimentações.

Os resultados obtidos para o cultivo em batelada simples com meio B (BS-B) foram: conteúdo lipídico de $8,5 \pm 0,5$ %, concentração de biomassa de $6,77 \pm 0,76$ g L⁻¹, lipídios totais de $0,57 \pm 0,09$ g L⁻¹ e produtividade de lipídios de $0,003 \pm 0,001$ g L⁻¹. Claramente, se verifica a diferença de comportamento entre este cultivo com meio B e a batelada simples com meio A (conteúdo lipídico de $42,9 \pm 0,8$ %, concentração de biomassa de $8,16 \pm 0,36$ g L⁻¹, lipídios totais de $3,50 \pm 0,14$ g L⁻¹ e produtividade de lipídios de $0,015 \pm 0,001$ g L⁻¹). As concentrações de biomassa obtidas foram semelhantes, contudo ao se avaliar o acúmulo de lipídios, os resultados diferiram inteiramente. Isto se deve à razão C/N empregada no meio de cultivo, pois o meio B apresenta uma razão C/N de 7,63, enquanto que o meio A tem uma razão C/N de 93. Estes valores indicam que o meio B apresenta uma maior quantidade de nitrogênio que o meio A, que possui uma limitação de nitrogênio. Esta limitação favorece o acúmulo de lipídios intracelulares em função do estresse gerado ao micro-organismo pela elevada razão C/N. No estudo de Angerbauer et al. (2008) com variação da razão de C/N de 15 até 150 para levedura *Lipomyces starkeyi*, utilizando lodo de esgoto como substrato, foi verificado que para razões C/N mais altas os lipídios totais aumentaram ($4,1$ g L⁻¹ e $6,4$ g L⁻¹, respectivamente). E ainda, Liang et al. (2010) realizaram dois cultivos em batelada alimentada, um com alimentação de fonte de carbono e nitrogênio, e outro com alimentação apenas de fonte de carbono. Com *Cryptococcus curvatus* e utilizando como substrato glicerol bruto, os autores obtiveram um aumento de aproximadamente 5 % na concentração de biomassa ao limitar a fonte de nitrogênio, enquanto que o aumento para lipídios foi de 24 %. Diante disso, justifica-se os resultados obtidos para o cultivo em batelada simples com meio B.

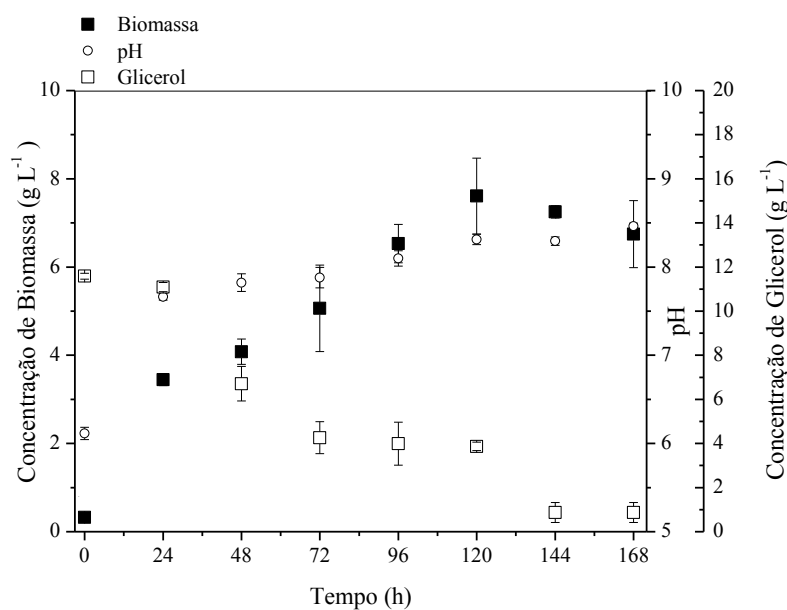
Outro fator relevante identificado neste desempenho foi o tempo de cultivo do processo em batelada com o meio B (168 h), que foi mais rápido que o cultivo em batelada com o meio A (240 h), também apresentando uma fase exponencial mais curta, BS-B de 0 h até 24 h (Figura 8) e BS-A de 0 h até 72 h. Este comportamento se explica pelo consumo mais rápido da fonte de carbono (Figura 9), visto que havia uma maior concentração de nitrogênio presente no meio do cultivo BS-B, reduzindo o tempo de cultivo. Até porque não há limitação de nitrogênio no meio, favorecendo o consumo e, conseqüentemente, o crescimento microbiano.

Figura 8 - Curva de crescimento do micro-organismo no cultivo em batelada com meio B (BS-B). Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).



As curvas de concentração de biomassa, pH e concentração de glicerol estão apresentadas na Figura 9. O pH se manteve próximo de 8,0, enquanto que o glicerol foi quase todo consumido.

Figura 9 – Biomassa, pH e glicerol ao longo do cultivo da levedura *R. mucilaginosa* em batelada simples com meio B. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).



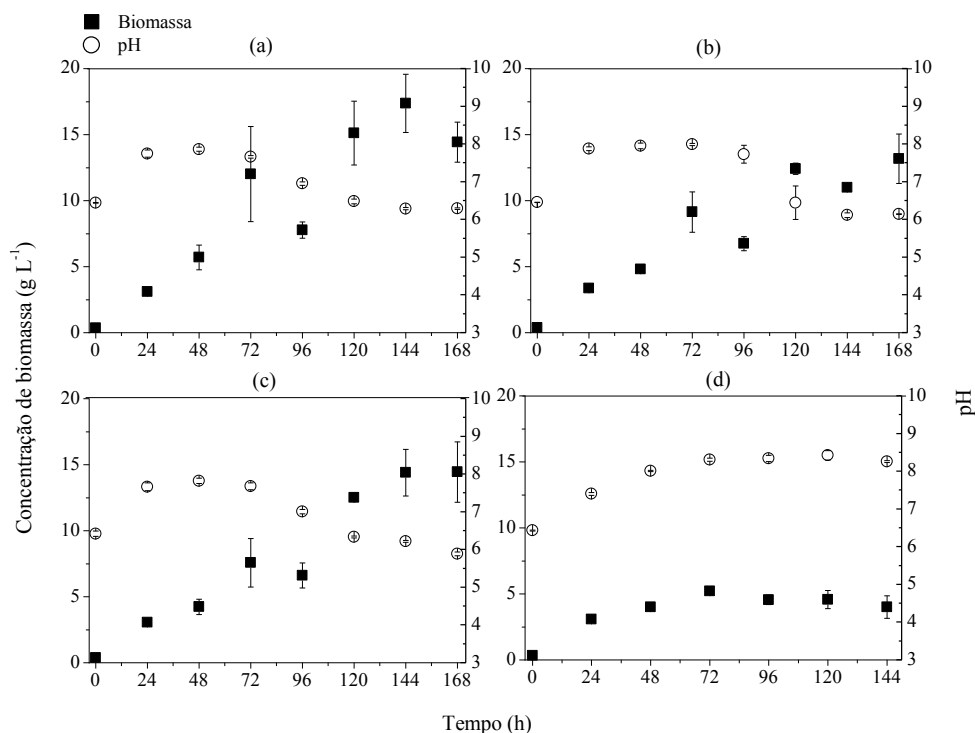
5.2.2 Cultivo em batelada alimentada

Diante da curva de crescimento microbiano do cultivo BS-B, foi possível identificar as fases de crescimento da *R. mucilaginosa*, sendo a fase exponencial até 24 h e fase estacionária

a partir de 48 h. A partir desta curva foram estabelecidas as alimentações na fase exponencial (24 h) e na fase estacionária (96 h), além de se testar alimentação de glicerol e de meio de cultivo (YMG24, YMG96, YMG1 e YMM24). A adição de glicerol foi realizada com o objetivo de avaliar como isso poderia influenciar no crescimento celular e na produção de lipídios pelo micro-organismo, devido ao aumento da razão C/N. Entende-se por YMG24 o cultivo com alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, YMG96 com alimentação de 20 mL de glicerol em 96 h, YMG1 com alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h e 20 mL em 96 h, e YMM24 com alimentação de 20 mL de meio em 24 h.

As curvas de crescimento microbiano e acompanhamento do pH estão apresentadas na Figura 10, verificando-se que as concentrações de biomassa foram iguais em todas as estratégias, com exceção do YMM24. Assim como o pH, que variou entre 6 e 8, aproximadamente.

Figura 10 – Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura *R. mucilaginosa* em YMG24, YMG96, YMG1 e YMM24. (a) YMG24: Alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h. (b) YMG96: Alimentação de 20 mL de glicerol em 96 h. (c) YMG1: Alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h e 96 h. (d) YMM24: Alimentação de 20 mL de meio em 24 h. Valores médios \pm desvio padrão ($n = 3$).



Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10, onde se pode observar que os cultivos YMG24 e YMG96 foram iguais estatisticamente. Contudo, quando realizada as duas

alimentações no mesmo cultivo, uma em 24 h e outra em 96 h (YMG1), conteúdo lipídico, lipídios totais e produtividade de lipídios se tornam maiores significativamente ($p \leq 0,05$). Isto porque aumentou a razão C/N do meio, favorecendo a produção de lipídios pelo micro-organismo.

Tabela 10 - Comparação entre os cultivos em batelada alimentada: YMG24, YMG96, YMG1 e YMM24. Tempo total de cultivo de 168 h, com exceção de YMM24 (144 h).

	Estratégia de alimentação			
	YMG24	YMG96	YMG1	YMM24
Conteúdo lipídico (%)	9,5 ^b ± 1,9	9,1 ^b ± 0,5	16,0 ^a ± 1,3	12,9 ^{a,b} ± 2,7
Biomassa (g L⁻¹)	14,47 ^a ± 1,52	13,22 ^a ± 1,87	14,54 ^a ± 2,28	4,03 ^b ± 0,84
Lipídios totais (g L⁻¹)	1,38 ^b ± 0,27	1,21 ^b ± 0,24	2,35 ^a ± 0,55	0,50 ^b ± 0,01
Produtividade de lipídios totais (g L⁻¹ h⁻¹)	0,008 ^b ± 0,002	0,007 ^b ± 0,001	0,014 ^a ± 0,003	0,004 ^b < 0,001

YMG24: 20 mL de glicerol bruto em 24 h; YMG96: 20 mL de glicerol bruto em 96 h; YMG1: 20 mL de glicerol bruto em 24 h e 20 mL em 96 h; YMM24: 20 mL de meio em 24 h. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p \leq 0,05$).

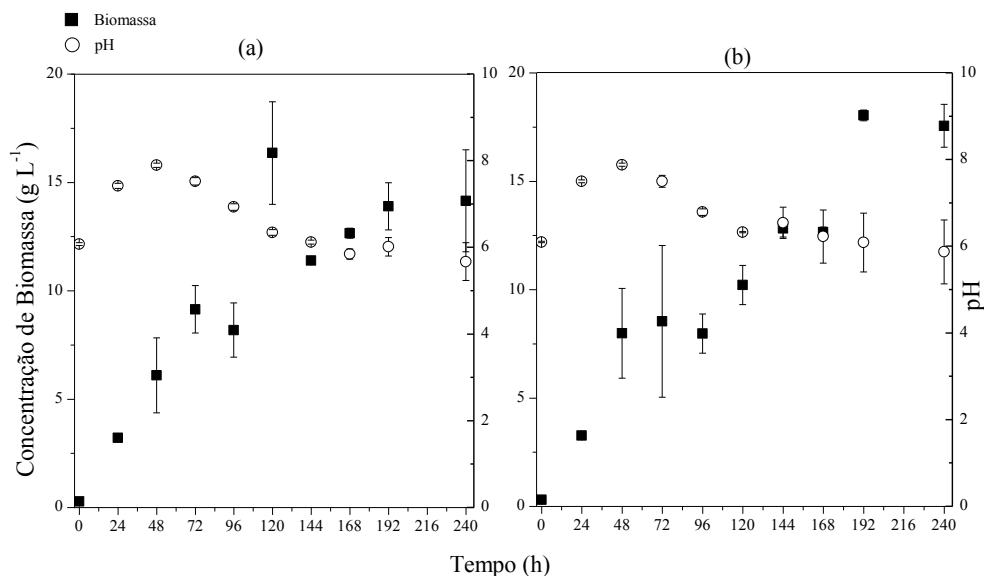
Assim, sabendo que a estratégia YMG1 foi a que apresentou o melhor resultado entre as testadas, foi pertinente avaliar novas alimentações em diferentes tempos, de modo a identificar os melhores pontos de alimentação neste processo com o meio de cultivo B. Portanto, foram estudadas as estratégias YMG2 (alimentação de 20 mL glicerol bruto em 24 h, 96 h e 144 h) e YMG3 (alimentação de 20 mL glicerol bruto em 24 h, 72 h e 120 h). Estes novos cultivos não resultaram em incrementos em quaisquer dos parâmetros estudados (Tabela 11 e Figura 11), contudo a condição YMG2 se mostrou promissora, já que o conteúdo lipídico poderia ter sido maior significativamente que nas demais estratégias, caso o cultivo YMG3 apresentasse um menor desvio padrão para este parâmetro ($15,9 \pm 4,1$ %).

Tabela 11 - Comparação entre os cultivos em batelada alimentada: YMG1 (168 h), YMG2 (240 h) e YMG3 (240 h).

	Estratégia de alimentação		
	YMG1	YMG2	YMG3
Conteúdo lipídico (%)	16,0 ^a ± 1,3	21,4 ^a ± 1,5	15,9 ^a ± 4,1
Biomassa (g L⁻¹)	14,54 ^a ± 2,28	14,23 ^a ± 2,35	17,57 ^a ± 0,99
Lipídios totais (g L⁻¹)	2,35 ^a ± 0,55	3,04 ^a ± 0,39	2,78 ^a ± 0,7
Produtividade de lipídios totais (g L⁻¹ h⁻¹)	0,014 ^a ± 0,003	0,013 ^a ± 0,002	0,012 ^a ± 0,003

YMG2: alimentação de 20 mL glicerol bruto em 24 h, 96 h e 144 h; YMG3: alimentação de 20 mL glicerol bruto em 24 h, 72 h e 120 h. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p \leq 0,05$).

Figura 11 – Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura *R. mucilaginosa* em YMG2 e YMG3. (a) YMG2: alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, 96 h e 144 h. (b) YMG3: alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, 72 h e 120 h. Valores médios \pm desvio padrão (n = 3).



Logo, as próximas estratégias que foram estudadas basearam-se no cultivo YMG2 (com as alimentações em 24 h, 96 h e 144 h) e, ainda, foi proposto avaliar esta estratégia ajustando o pH inicial do meio de cultivo em 4,5 (YMG4), pois, conforme foram sendo desenvolvidos os cultivos, foi observado o aumento do pH além dos valores recomendados na literatura para o crescimento microbiano, pH entre 3 e 6 segundo Ageitos et al. (2011), chegando próximos ao pH 8. Além disso, para resultar em um incremento no acúmulo de lipídios pela célula, as estratégias YMG5 e YMG6 foram definidas, baseando-se no estudo de Spier (2014), que determinou uma influência positiva da adição de magnésio no meio sobre a produção de lipídios, sendo este adicionado na composição do meio de cultivo inicial na concentração de 3 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O (Tabela 12).

Tabela 12 - Descrição das estratégias YMG4, YMG5 e YMG6.

Código	Estratégia
YMG4	Alimentação de 20 mL glicerol em 24 h, 96 h e 144 h, com ajuste do pH do meio inicial em 4,5
YMG5	Alimentação de 20 mL glicerol em 24 h, 96 h e 144 h, com adição de MgSO ₄ .7H ₂ O no meio inicial
YMG6	Alimentação de 20 mL glicerol em 24 h, 96 h e 144 h, com ajuste do pH em 4,5 e adição de MgSO ₄ .7H ₂ O no meio inicial

Como pode ser verificado na Tabela 13 e Figura 12, os cultivos YMG4, YMG5 e YMG6 resultaram em um aumento significativo da quantidade de lipídios acumulados pela

célula microbiana ($p \leq 0,05$), demonstrado não só para o cultivo com melhor desempenho (YMG5), como também para as estratégias com ajuste de pH. O ajuste de pH pode ter influenciado no acúmulo de lipídios em razão das reações enzimáticas que ocorrem no metabolismo celular, visto que a maioria das enzimas tem um pH ótimo no qual sua atividade é máxima (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Karatay e Dönmez (2010) observaram um aumento de 31,5 % para 59,9 % de conteúdo lipídico para levedura *Candida lipolytica*, na mudança do pH do meio de 4 para 5. Angerbauer et al. (2008) avaliaram a influência do pH para a levedura *Lipomyces starkeyi*, verificando que, ao empregar um pH 7,0 no meio de cultivo, o acúmulo de lipídios foi de aproximadamente 7 %, enquanto que com o pH 5 o conteúdo lipídico foi de aproximadamente 56 %, demonstrando como a diferença no pH pode afetar drasticamente a produção de lipídios.

O maior acúmulo de lipídios pelo micro-organismo, na presença de $MgSO_4$, pode ser explicado pela atuação de Mg^{2+} no metabolismo celular durante a biossíntese de lipídios. Segundo Beopoulos et al. (2009), a síntese de triacilglicerol (TAG) acontece a partir da rota de Kennedy e monoacilglicerol, onde a primeira etapa é quando glicerol-3-fosfato é acilado a ácido lisofosfatídico (LPA) pela enzima G-3-P aciltransferase (SCT1), que após ser acilado pela enzima ácido lisofosfatídico aciltransferase (SLC1) gera o ácido fosfatídico (PA). Este sofre desfosforilação pela enzima ácido fosfatídico fosfohidrolase (PAP), se tornando diacilglicerol (DAG), que resulta em tricilglicerol (TAG) após acilação pela reação de acil-CoA, catalisada pelas enzimas DGAT1 e DGAT2. Segundo Taha et al. (2013), o magnésio pode influenciar em duas etapas deste processo, primeiro sobre a enzima PAP (no caso PAP1, ou seja, Mg^{2+} -dependente), pois esta enzima requer Mg^{2+} como cofator para atividade catalítica. E segundo, sobre as enzimas DAGT1 e DAGT2, que de acordo com Yen et al. (2008), podem ter suas atividades catalíticas favorecidas pela concentração de magnésio disponível. Portanto, a adição de magnésio no meio de cultivo pode ter atuado sobre a atividade catalítica na síntese de lipídios de modo a favorecer o seu acúmulo. Este efeito da adição de magnésio ao meio é corroborado pelos resultados apresentados por Spier (2014), que verificou um efeito positivo da adição de magnésio sobre o acúmulo de lipídios para esta mesma levedura.

Singh et al. (2016) observaram o comportamento da microalga *Aurantiochytrium* sp. na presença de magnésio no meio de cultivo (5 g L^{-1}), resultando em um aumento de aproximadamente 10 % de conteúdo lipídico, e quando aumentada a concentração para 10 g L^{-1} , o incremento foi de aproximadamente 30 % no conteúdo lipídico, comparado à ausência de magnésio no meio. Para a levedura *Trichosporon cutaneum*, o maior conteúdo lipídico acumulado e maior biomassa foram obtidos com a adição de $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

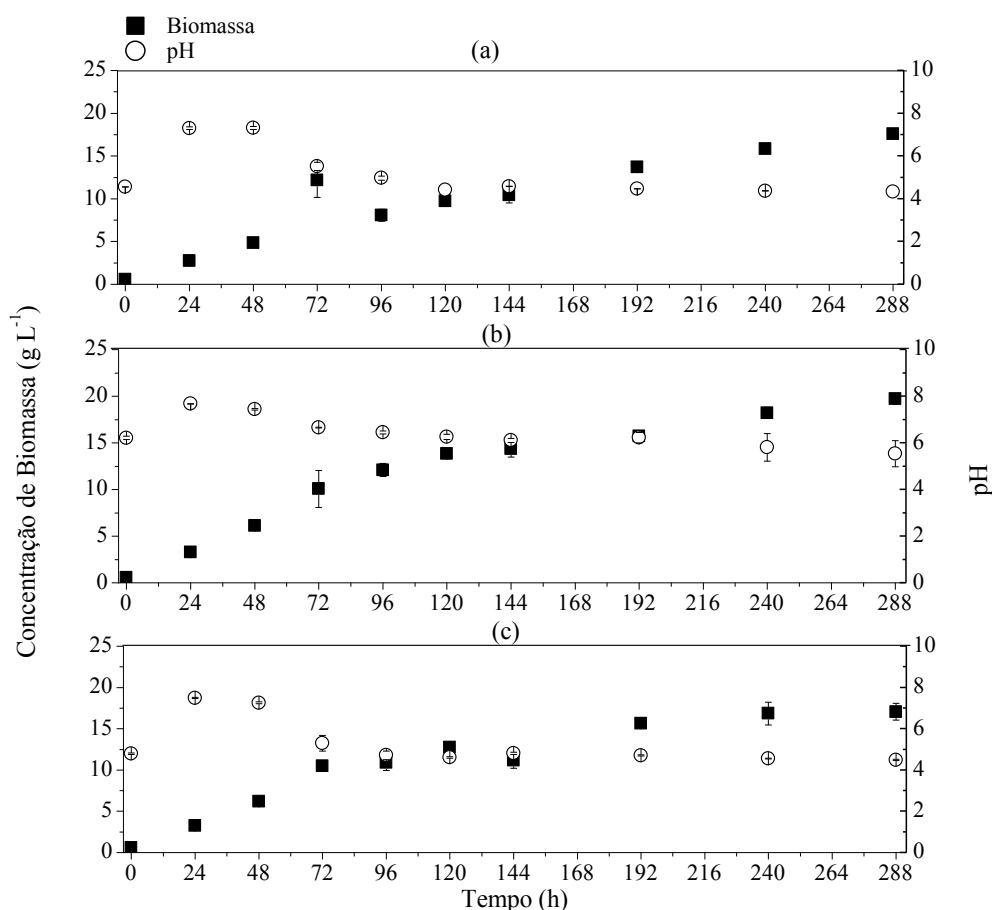
no meio de cultivo contendo hidrolisado de milho (CHEN et al., 2013). Para *Lipomyces starkeyi*, ao se comparar a adição de 0,5 e 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O ao meio de cultivo, foi observado um aumento de 41,6 % para 56,1 % de conteúdo lipídico (ZHAO et al., 2008). Assim, pode-se afirmar que o acréscimo de magnésio ao meio de cultivo estimula a produção de lipídios pelo micro-organismo.

Tabela 13 - Comparação entre os cultivos em batelada alimentada com meio B.

Código	Conteúdo lipídico (%)	Biomassa (g L⁻¹)	Lipídios totais (g L⁻¹)	Produtividade de lipídios totais (g L⁻¹ h⁻¹)
YMG24	9,5 ^e ± 1,9	14,47 ^b ± 1,52	1,38 ^{d,e} ± 0,27	0,008 ^{d,e} ± 0,002
YMG96	9,1 ^{d,e} ± 0,5	13,22 ^b ± 1,87	1,21 ^{d,e} ± 0,24	0,007 ^{c,d,e} ± 0,001
YMM24	12,9 ^{d,e} ± 2,7	4,03 ^c ± 0,84	0,50 ^e ± 0,01	0,004 ^e < 0,001
YMG1	16,0 ^{c,d} ± 1,3	14,54 ^b ± 2,28	2,35 ^{c,d} ± 0,55	0,014 ^c ± 0,003
YMG2	21,4 ^c ± 1,5	14,23 ^c ± 2,35	3,04 ^c ± 0,39	0,013 ^{c,d} ± 0,002
YMG3	15,9 ^{c,d} ± 4,1	17,57 ^{a,b} ± 0,99	2,78 ^c ± 0,70	0,012 ^{c,d} ± 0,003
YMG4	44,3 ^b ± 1,3	17,61 ^{a,b} ± 0,54	7,81 ^b ± 0,47	0,027 ^b ± 0,002
YMG5	51,0 ^{a,b} ± 0,3	21,00 ^a ± 0,48	10,72 ^a ± 0,18	0,037 ^a ± 0,001
YMG6	50,9 ^a ± 1,2	17,08 ^{a,b} ± 1,02	8,68 ^b ± 0,47	0,030 ^b ± 0,002

YMG24: 20 mL de glicerol bruto em 24 h; YMG96: 20 mL de glicerol bruto em 96 h; YMG1: 20 mL de glicerol bruto em 24 h e 20 mL em 96 h; YMM24: 20 mL de meio em 24 h; YMG2: 20 mL de glicerol bruto em 24 h, 20 mL em 96 h e 20 mL em 144 h. YMG3: 20 mL de glicerol bruto em 24 h, 20 mL em 72 h e 20 mL em 120 h; YMG4: 20 mL de glicerol bruto em 24 h, 20 mL em 96 h e 20 mL em 144 h, com ajuste do pH do meio inicial em 4,5; YMG5: 20 mL de glicerol bruto em 24 h, 20 mL em 96 h e 20 mL em 144 h, com adição de 3 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O no meio inicial; YMG6: 20 mL de glicerol bruto em 24 h, 20 mL em 96 h e 20 mL em 144 h, com ajuste do pH em 4,5 e adição de 3 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O no meio inicial. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias (p ≤ 0,05).

Figura 12 – Biomassa e pH ao longo dos cultivos da levedura *R. mucilaginosa* em YMG4, YMG5 e YMG6. (a) YMG4: Alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, 96 h e 144 h, com ajuste de pH. (b) YMG5: Alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, 96 h e 144 h, com adição de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. YMG6: Alimentação de 20 mL de glicerol em 24 h, 96 h e 144 h, com ajuste de pH e adição de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Valores médios \pm desvio padrão ($n = 3$).

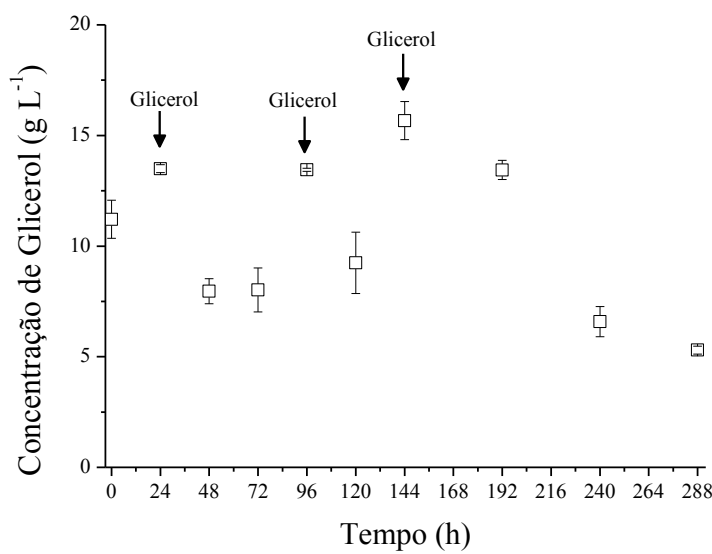


Por conseguinte, o cultivo com o melhor desempenho foi o YMG5, resultando em conteúdo lipídico de $51,0 \pm 0,3 \%$, concentração de biomassa de $21,00 \pm 0,48 \text{ g L}^{-1}$, lipídios totais de $10,72 \pm 0,18 \text{ g L}^{-1}$ e produtividade de lipídios de $0,037 \pm 0,001 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Esta estratégia, comparada ao processo em batelada, representou um aumento de aproximadamente 500 % no conteúdo lipídico acumulado e 200 % na biomassa produzida, sendo que os lipídios produzidos aumentaram em aproximadamente 20 vezes e a produtividade de lipídios 12 vezes. Isto se deve, além do comportamento já descrito para adição de magnésio, também a introdução de mais carbono no meio de cultivo, permitindo um maior aporte ao micro-organismo e, consequentemente, um maior crescimento.

O consumo de glicerol pelo micro-organismo está apresentado na Figura 13, onde pode ser verificado que a cada alimentação, a concentração de glicerol quase dobrou em relação à quantidade presente no meio de cultivo sendo em seguida rapidamente consumido pela levedura. Esta disponibilidade de fonte de carbono permitiu um maior crescimento celular.

Ademais, o fato de elevar a razão C/N do meio, ocasionando estresse à levedura, também favoreceu o acúmulo de lipídios intracelulares.

Figura 13 - Consumo de glicerol pela levedura *R. mucilaginosa* ao longo do cultivo em YMG5 (alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 24 h, 96 h e 144 h, com adição de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Valores médios \pm desvio padrão ($n = 2$). As setas indicam as alimentações de glicerol nos tempos de 48 h, 96 h e 144 h.



5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS CULTIVOS COM MEIO A E MEIO B.

As estratégias com melhor desempenho usando meio A e meio B foram, respectivamente, M48A (alimentação de 20 mL de meio em 48 h, 10 mL em 72 h e 10 mL em 96 h) e YMG5 (20 mL de glicerol bruto em 24 h, 20 mL em 96 h e 20 mL em 144 h, com adição de 3 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no meio inicial). Claramente, se observa que o cultivo YMG5 apresentou resultados significativamente maiores ($p \leq 0,05$) em relação à biomassa produzida, conteúdo lipídico e os lipídios totais acumulados, quando comparados ao cultivo M48A (Tabela 14). Estes resultados para o YMG5 foram possíveis ao se aliar o favorecimento do crescimento celular, pela baixa razão C/N inicial, e o favorecimento do acúmulo de lipídios pelas alimentações, que aumentaram a razão C/N.

Além disso, a concentração de glicerol bruto empregada no meio A foi quase duas vezes maior que a empregada no meio B. Esta alta concentração pode ter prejudicado o crescimento microbiano, quando comparado ao crescimento no meio B, visto que novas alimentações com meio concentrado foram realizadas ao longo do cultivo. Ou seja, a alta concentração inicial, para um processo em batelada alimentada, pode não ter sido necessária.

Ao se comparar as Figuras 7 e 13 pode-se perceber que a levedura consome quase todo o glicerol do meio no cultivo YMG5, chegando próximo de 5 g L^{-1} , enquanto que no cultivo M48A o glicerol permanece presente no meio em altas concentrações até o final do cultivo (aproximadamente 45 g L^{-1}).

Tabela 14 - Comparação dos cultivos em batelada alimentada M48A e YMG5.

	Estratégia de alimentação	
	M48A	YMG5
Conteúdo lipídico (%)	$42,0^b \pm 2,2$	$51,0^a \pm 0,3$
Biomassa (g L^{-1})	$17,38^b \pm 0,89$	$21,00^a \pm 0,48$
Lipídios totais (g L^{-1})	$7,30^b \pm 0,68$	$10,72^a \pm 0,18$
Produtividade de lipídios totais ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$0,030^a \pm 0,003$	$0,037^a \pm 0,001$

M48A: 20 mL de meio em 48 h, 10 mL em 72 h e 10 mL em 96 h; YMG5: 20 mL de glicerol bruto em 24 h, 20 mL em 96 h e 20 mL em 144 h, com adição de 3 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no meio inicial. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p \leq 0,05$).

Assim, o desempenho do cultivo YMG5 foi o melhor entre todas as estratégias utilizadas, em ambos os meios, apresentando lipídios totais acumulados 20 vezes maior que o processo em batelada BS-B, e quase 1,5 vezes maior que a melhor estratégia com o meio A (M48A).

Saenge et al. (2011) compararam o crescimento da levedura *R. glutinis* utilizando glicerol bruto entre o modo de cultivo em batelada e em batelada alimentada, verificando um aumento na produção de biomassa de $8,17 \text{ g L}^{-1}$ para $10,05 \text{ g L}^{-1}$, e também consequentemente um aumento nos lipídios totais de $4,33 \text{ g L}^{-1}$ para $6,10 \text{ g L}^{-1}$, sendo que em relação à produtividade o aumento foi de aproximadamente 46 %. Chang et al. (2013) observaram um incremento de aproximadamente 20 % na biomassa produzida e lipídios acumulados para levedura *Cryptococcus* sp. com a implementação do modo em batelada alimentada. Para *R. mucilaginosa* TJY15a, utilizando-se hidrolisado de tubérculos de alcachofra como substrato, obteve-se $14,4 \text{ g L}^{-1}$ e $19,5 \text{ g L}^{-1}$ de concentração de biomassa e 48,6 % e 52,2 % de conteúdo lipídico, para os processos em batelada (frascos agitados) e batelada alimentada (biorreator de 2 L), respectivamente (ZHAO et al., 2010), sendo estes valores em batelada alimentada próximos dos obtidos com *R. mucilaginosa* CCT 7688 utilizada no presente estudo, em frascos agitados.

Além disso, os resultados obtidos no presente trabalho são relevantes, pois utilizando um coproduto, como glicerol bruto como fonte de carbono, se obteve desempenho semelhante, senão melhor, quando comparado com estudos que utilizam carboidratos puros como substrato. Como Li et al. (2010), que avaliou diferentes fontes de carbono para levedura *R. mucilaginosa*, verificando que para glicose, xilose e sacarose, a concentração de biomassa foi menor que 15 g L^{-1} e conteúdo lipídico de no máximo 35 %. Chang et al. (2013) obtiveram $11,4 \text{ g L}^{-1}$ de concentração de biomassa e $7,3 \text{ g L}^{-1}$ de lipídios totais utilizando glicose como fonte de carbono para levedura *Cryptococcus* sp., para processo em batelada alimentada. Estes estudos validam a importância dos resultados obtidos neste trabalho.

5.4 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Conforme a Tabela 15, o principal ácido graxo encontrado nos óleos produzidos pela levedura *R. mucilaginosa* foi o ácido linoleico. Os cromatogramas obtidos estão apresentados das Figuras 1D a 3D (Apêndice D). Este ácido é comum de ser encontrado no óleo de girassol, milho e soja, ou seja, importantes óleos vegetais utilizados na obtenção de biodiesel (ANSCHAU, 2014). Isto significa que o óleo obtido no presente trabalho pode ser utilizado para este fim, por ser semelhante a óleos vegetais atualmente empregados neste ramo. Além disso, a suplementação de ácidos graxos essenciais, como ácido linoleico, pode ser realizada na alimentação, podendo ser inserido em dietas de animais, como peixes e aves, contribuindo para o ganho de peso destes animais, assim como na qualidade de suas carnes ou ovos (MACHADO JR, 2010). A presença de ácidos graxos essenciais no presente estudo, como o ácido araquidônico, γ -linolênico e α -linolênico, também é importante de salientar. Os humanos não possuem a capacidade de sintetizar o ácido graxo α -linolênico, por exemplo, sendo necessário ingeri-lo a partir de dieta. Este é um precursor de dois outros ácidos graxos poli-insaturados importantes como o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosaexaenoico (DHA), sendo que um desequilíbrio entre os ácidos graxos ômega 6 e ômega 3 está associado a doenças cardiovasculares (NELSON; COX, 2011).

Liang et al. (2010), para levedura *C. curvatus* ATCC 20509 utilizando glicerol bruto como substrato, observaram como majoritários os ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e esteárico (C18:0). Duarte, Ghiselli e Maugeri (2013) verificaram a presença dos ácidos linoleico, oleico, palmítico, esteárico e palmitoleico como principais ácidos graxos oriundos da levedura *Candida* sp.. Spier (2014) observou para levedura *R. mucilaginosa* a

presença destes mesmos ácidos, incluindo C14:0, C18:3n3, C20:1n9, C22:0 e C22:6n3 como os mais relevantes.

Segundo Nogueira (2017), a biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados é proveniente do ácido oleico (18:1), assim como ácido linoleico (18:2), que atua como precursor dos ácidos graxos ômega 6 (ω 6), e deste forma-se o ácido linolênico (18:3), precursor de ácidos graxos ômega 3. O autor observou, para microalga *Chaetoceros calcitrans*, que à medida que a proporção de ácido oleico diminuiu, aumentou a do ácido linoleico, assim como as quantidades de γ -linolênico e α -linolênico, de acordo com o tempo de cultivo, verificando que para uma determinada condição ocorreu o aumento de ácido linoleico (quase 4 vezes mais) ao final de 10 dias. Desta forma, percebe-se que há a possibilidade do tempo de cultivo (240 h) ter influenciado o perfil graxo do presente estudo, contribuindo para a predominância do ácido linoleico.

Tabela 15 - Perfil de ácidos graxos dos lipídios obtidos ao final dos cultivos M48A e YMG5.

Ácido graxo	Distribuição dos Ácidos Graxos (% m/m)		
	M48A	YMG5	Óleo de Girassol ^a
Ácidos graxos saturados	2,5	1,9	9,4
Palmitico 16:00	1,5	1,4	6,1
Tricosanoico 23:00	1	0,5	-
Esteárico 18:00	-	-	3,3
Ácidos graxos monoinsaturados	13,6	18,1	16,9
Palmitoleico 16:01	11,4	13,5	-
miristoleico 14:01	0,5	0,4	-
Oleico 18:1n9c	0,5	3,4	16,9
Elaidico 18:1n9t	0,1	0,2	-
Nervônico 24:1n9	1,1	0,6	-
Ácidos graxos poli-insaturados	83,9	79,8	73,7
Linoleico 18:2n6c	80	76,8	73,7
α -linolênico 18:3n3	2	1,7	-
γ -linolênico 18:3n6	0,4	0,4	-
Araquidônico 20:4n6	0,8	0,4	-
Eicosatrienoico 20:3n3	0,7	0,5	-

M48A: 20 mL de meio em 48 h, 10 mL em 72 h e 10 mL em 96 h; YMG5: 20 mL de glicerol bruto em 24 h, 20 mL em 96 h e 20 mL em 144 h, com adição de 3 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O no meio inicial.

^aAnschau (2014).

CONCLUSÃO

Neste trabalho foram avaliadas diferentes estratégias de alimentação a partir da batelada simples e diferentes meios de cultivo. Entre os cultivos microbianos com meio A, o cultivo em batelada alimentada M48A foi o que resultou em maior produtividade de lipídios, havendo um aumento de 100 % em relação à batelada simples (BS-A). Com relação à biomassa e aos lipídios totais produzidos, incrementos de 112 % e 108 %, respectivamente, foram observados. Para os cultivos com meio B, a melhor estratégia foi o cultivo em batelada alimentada YMG5 que, comparado ao processo em batelada simples (BS-B), demonstrou um aumento de aproximadamente 500 % no conteúdo lipídico acumulado e 200 % na biomassa produzida, representando um aumento de aproximadamente 12 vezes na produtividade de lipídios e 20 vezes nos lipídios totais. Esta estratégia demonstrou ser a melhor entre todas as testadas no presente estudo, resultando em $51,0 \pm 0,3$ % de conteúdo lipídico, $21,00 \pm 0,48$ g L⁻¹ de concentração de biomassa, $10,72 \pm 0,18$ g L⁻¹ de lipídios totais e $0,037 \pm 0,001$ g L⁻¹ h⁻¹ de produtividade de lipídios.

Deste modo, foi comprovado o melhor desempenho do processo em batelada alimentada e, no caso da estratégia YMG5, permitindo um aumento não só do crescimento celular, como também da quantidade de lipídios acumulados pelo micro-organismo, confirmando-a como uma boa estratégia na produção de óleos microbianos.

Assim, a produção de lipídios por *R. mucilaginosa* em batelada alimentada pode ser vista como uma alternativa promissora à produção de óleos vegetais. Além disso, o uso de glicerol bruto como fonte de carbono demonstra que este processo pode agregar um maior valor à cadeia produtiva do biodiesel.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar os cultivos BS-A e M48A em biorreator de bancada em diferentes condições de aeração e agitação.
- Realizar o cultivo BS-B e YMG5 em biorreator de bancada em diferentes condições de aeração e agitação.
- Estudar a cinética do acúmulo de lipídios nos cultivos microbianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

ANP - **Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Brasília – DF, Brasil. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 25 set. 2016.

ANSCHAU, A. **Produção de lipídeos por *Lipomyces starkeyi*: estratégia para obtenção de alta densidade celular a partir de xilose e glicose**. 1998. 207 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

ANSCHAU, A.; XAVIER, M. C. A.; HERNALSTEENS, S.; FRANCO, T. T. Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 214 – 222, 2014.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotecnologia industrial**. v. 4. São Paulo: Edgar Blucher Ltda, 2001. 523 p.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2th ed. Singapore: McGraw-Hill Book Co, 1986. 948 p.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306 – 319, 2011.

BÉLIGON, V.; POUGHON, L.; CHRISTOPHE, G.; LEBERT, A.; LARROCHE, C.; FONTANILLE, P. Improvement and modelling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 582-591, 2015.

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

BHOSALE, P B. **Studies on yeasts *Rhodotorula*, its carotenoids and their applications**. 2001. 210 p. Thesis (Doctor of Philosophy in Microbiology) – University of Pune, India, 2001.

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

BONDIOLI, P.; BELLA, L. D. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, o. 153 – 157, 2005.

BRASIL. Decreto-lei nº 13.236, de 23 de março de 2016. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 mar. 2016.

BUZZINI, P. Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* – *Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 843–847, 2001.

CASTRO, A. R.; GUIMARÃES, M.; OLIVEIRA, J. V.; PEREIRA, M. A. Production of added value bacterial lipids through valorization of hydrocarbon-contaminated cork waste. **Science of the Total Environment**, v. 605 – 606, p. 677-682, 2017.

CESCUT, J.; FILLAUDEAU, L.; JOUVE, C. M.; URIBELARREA, J. L. Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 164-175, 2014.

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

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

CHEN, X. F.; HUANG, C.; YANG, X. Y.; XIONG, L.; CHEN, X. D.; MA, L. L. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 18-24, 2013.

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

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

DUARTE, S. H.; ANDRADE, C. C. P.; GHISELLI, G.; MAUGERI, F. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 377– 381, 2013.

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

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.

EIA. **Biofuels issues and trends**. Washington: Independent Statistics & Analysis, 2012. 48 p.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. **Lipids**, v. 18, p. 623 – 629, 1983.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Effect of nitrogen source on lipid accumulation in oleaginous yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 1693–1704, 1984.

FEI, Q.; O'BRIEN, M.; NELSON, R.; CHEN, X.; LOWELL, A.; DOWE, N. Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 130-142, 2016.

FONTANILLE, P.; KUMAR, V.; CHRISTOPHE, G.; NOUAILLE, R.; LARROCHE, C. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 443-449, 2012.

GALAFASSI, S.; CUCCHETTI, D.; PIZZA, F.; FRANZOSI, G.; BIANCHI, D.; COMPAGNO, C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 398–403, 2012.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

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

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

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de biodiesel**. São Paulo: Edgar Blucher, 2006. 340 p.

KOIZUMI, T. Biofuels and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.52, p. 829 – 841, 2015.

LADEIRA, B. L. **Cultivo de *Meyerozyma guilliemondii* em batelada e batelada alimentada para produção de lipídios a partir de glicerol bruto**. 2016. 75 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

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

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 749–756, 2008.

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

LI, S. L.; LIN, Q.; LI, X. R.; XU, H.; YANG, Y. X.; QIAO, D. R.; CAO, Y. Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 627 – 634, 2012.

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

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

LOPES, N. A. **Recuperação de carotenoides microbianos por diferentes técnicas de ruptura celular**. 2014. 96 f. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

LORA, E. E. S.; VENTURI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Interciência, 2012. 1200 p.

MACHADO JR, F. R. S. **Conversão por via biotecnológica de glicerina residual em biomassa de leveduras como fonte de proteínas e lipídios**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

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

MASSAROLO, K. C.; SOUZA, T. D.; RIBEIRO, A. C.; FURLONG, E. B.; SOARES, L. A. S. Influence of cultivation *Rhizopus oryzae* on rice bran on lipid fraction: fatty acids and phospholipids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 204 – 208, 2016.

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

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

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.

NOGUEIRA, D. A. **Condições de cultivo mixotrófico de *Chaetoceros calcitrans* em meio contendo glicerol residual e ruptura celular para a extração de lipídios**. 2017. 196 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

OTERO, D. M. **Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides**. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

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

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

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

PIROZZI, D.; TRAVAGLINI, G.; SAGNELLI, D.; SANNINO, F.; TOSCANO, G. Study of a discontinuous fed-batch fermentor for the exploitation of agricultural biomasses to produce II-generation biodiesel. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 169-174, 2014.

PYLE, D. J.; GARCIA, R. A.; WEN, Z. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3933 – 3939, 2008.

RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; LEONARDI, A.; BIANCHI, M. M.; RINALDI, T.; AMARETTI, A. Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 83- 94, 2014.

RAKICKA, M.; LAZAR, Z.; DULERMO, T.; FICKERS, P.; NICAUD, J. M. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 104-114, 2015.

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

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

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

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

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering**. 2nd ed. New York: Prentice Hall PTR, 2012. 553 p.

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.

SINGH, D.; BARROW, C. J.; PURI, M.; TULI, D. K.; MATHUR, A. S. Combination of calcium and magnesium ions prevents substrate inhibition and promotes biomass and lipid production in thraustochytrids under higher glycerol concentration. **Algal Research**, v. 15, p. 202 – 209, 2016.

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

SMITH, J. E. **Biotechnology**. 5th ed. New York: Cambridge University, 2009. 266 p.

SONG, N.; PEI, H.; HU, W.; MA, G. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 245 – 251, 2013.

SPIER, F. **Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto gerado na síntese de biodiesel**. 2014. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

SPIER, F.; BUFFON, J. G.; BURKERT, C. A. V. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: lipid content and fatty acid profile of biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 415 – 422, 2015.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1995. 357 p.

TAHA, A. I. B. H. M.; KIMOTO, T.; KANADA, T.; OKUYAMA, H. Growth optimization of thraustochytrid strain 12B for the commercial production of docosahexaenoic acid. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, p. 53 – 58, 2013.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10^a ed. São Paulo: Artmed, 2012, 934 p.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ, F. J.; SÁDABA, I.; VÁZQUEZ, R. M. R.; MARTÍNEZ, S. R.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 22 – 27, 2009.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1481 p.

WARD, O. P. **Biotechnology de la fermentacion**. Zaragoza: Acribia, 1991, 274 p.

WU, S.; HU, C.; JIN, G.; ZHAO, X.; ZHAO, Z. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6124 – 6129, 2010.

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

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

YEN, C. L. E.; STONE, S. J.; KOLIWAD, S.; HARRIS, C.; FARESE, R. V. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. **Journal of Lipid Research**, v. 49, p. 2283 – 2301, 2008.

ZHANG, J.; FANG, X.; ZHU, X. L.; LI, Y.; XU, H. P.; ZHAO, B. F.; CHEN, L.; ZHANG, X. D. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 1906–1911, 2011.

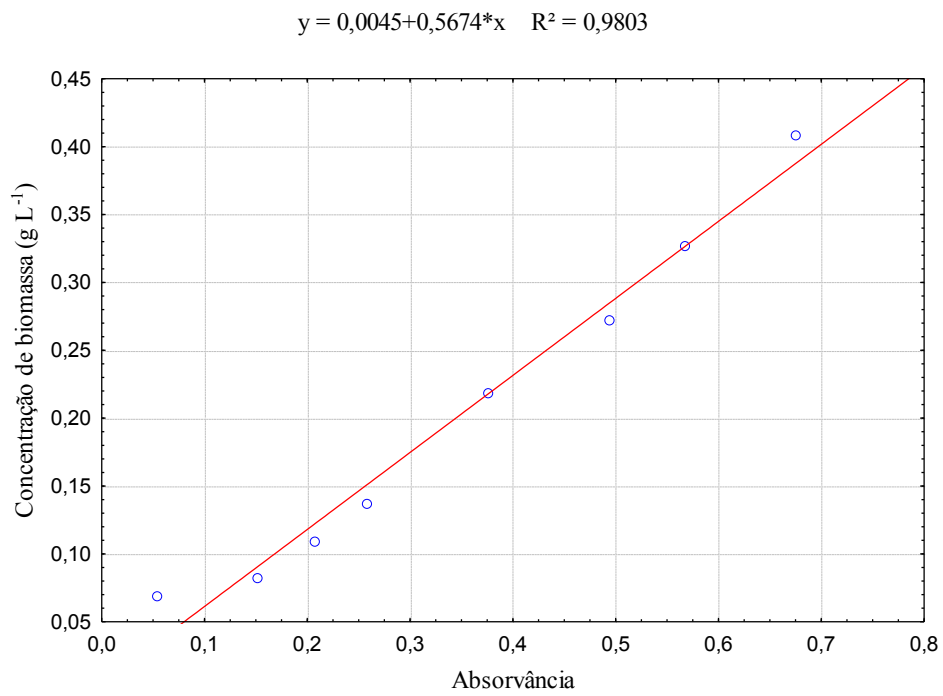
ZHAO, X.; KONG, X.; HUA, Y.; FENG, B.; ZHAO, Z. K. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology** v. 110, p. 405–412, 2008.

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

ZHAO, X.; HU, C.; WU, S.; SHEN, H.; ZHAO, Z. Lipid production by *Rhospordium torulooides* Y4 using different substrate feeding strategies. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 627 – 632, 2011.

ZHU, L.Y.; ZONG, M. H.; WU H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. **Bioresource Technology** v. 99, p. 7881–7885, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curva Padrão para a levedura *R. mucilaginosa*.**Figura 1A** – Curva padrão de biomassa da levedura *R. mucilaginosa* CCT 7688.

APÊNDICE B – Resultados dos cultivos com o meio A.

Tabela 1B - Comparação entre todos os cultivos em batelada alimentada com meio A.

Código	Conteúdo lipídico (%)	Lipídios totais (g L⁻¹)	Biomassa (g L⁻¹)	Produtividade de lipídios totais (g L⁻¹ h⁻¹)
BS-A	42,9 ^{a,b} ± 0,8	3,50 ^{e,f} ± 0,14	8,16 ^f ± 0,36	0,015 ^{d,e} ± 0,001
G48	42,9 ^{a,b} ± 0,3	3,64 ^{e,f} ± 0,29	8,48 ^f ± 0,29	0,015 ^{d,e} ± 0,001
M48	42,0 ^{a,b} ± 1,5	5,63 ^{b,c,d} ± 0,11	13,42 ^{c,d,e} ± 0,58	0,020 ^{b,c,d} < 0,001
G96	42,9 ^{a,b} ± 1,3	2,93 ^f ± 0,09	6,84 ^f ± 0,37	0,010 ^e < 0,001
M96	41,4 ^{a,b} ± 2,2	5,30 ^{c,d} ± 0,53	12,80 ^{d,e} ± 0,87	0,018 ^{b,c,d} ± 0,002
M96A	37,1 ^b ± 0,7	5,67 ^{b,c,d} ± 0,26	15,29 ^{a,b,c} ± 0,78	0,017 ^{c,d} ± 0,001
M96B	43,9 ^a ± 1,4	6,86 ^{a,b} ± 0,49	15,61 ^{a,b} ± 0,72	0,020 ^{b,c} ± 0,001
M96C	38,0 ^{a,b} ± 1,5	5,42 ^{b,c,d} ± 0,06	14,30 ^{b,c,d} ± 0,70	0,016 ^{c,d} < 0,001
M48A	42,0 ^{a,b} ± 2,2	7,30 ^a ± 0,68	17,38 ^a ± 0,89	0,030 ^a ± 0,003
M48B	42,5 ^{a,b} ± 2,5	6,72 ^{a,b,c} ± 0,79	15,76 ^{a,b} ± 1,00	0,023 ^b ± 0,003
M48C	37,3 ^{a,b} ± 5,8	4,52 ^{d,e} ± 1,01	12,07 ^e ± 1,13	0,016 ^{c,d} ± 0,004

BS-A: batelada simples; G48: 20 mL de glicerol bruto (366,2 g L⁻¹) em 48 h; M48: 20 mL de meio em 48 h; G96: 20 mL de glicerol bruto (366,2 g L⁻¹) em 96 h; M96: 20 mL de meio em 96 h; M96A: 20 mL de meio em 96 h, 10 mL em 144 h e 10 mL em 192 h; M96B: 20 mL de meio em 96 h e 10 mL em 144 h; M96C: 10 mL de meio em 96 h e 10 mL em 144 h; M48A: 20 mL de meio em 48 h, 10 mL em 72 h e 10 mL em 96 h; M48B: 20 mL de meio em 48 h e 10 mL em 96 h; M48C: 10 mL de meio em 48 h e 10 mL de meio em 96 h. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias ($p \leq 0,05$).

APÊNDICE C – Análises para determinação de carbono, nitrogênio e hidrogênio.

Tabela 1C - Análise para determinação de carbono, nitrogênio e hidrogênio.

Amostras analisadas	% C	% H	% N
Peptona	43,47	6,32	15,32
Extrato de levedura	39,12	6,23	10,66
Glicerol	31,50	2,27	< 0,07
Extrato de malte	40,47	5,25	1,22

Tabela 2C – Calibração do equipamento utilizando material de referência certificado Acetanilida para controle de qualidade das análises de determinação de carbono, nitrogênio e hidrogênio.

Material de referência (Acetanilida)		% C	% H	% N
Valor certificado	Para todas as amostras	71,09	6,71	10,36
Valor analisado	Extrato de malte	71,12	6,09	10,49
% Recuperação		100,04	90,76	101,25
Valor analisado	Outros	71,14	7,19	10,51
% Recuperação		100,07	107,15	101,44

APÊNDICE D – Cromatogramas obtidos na determinação do perfil de ácidos graxos.

Figura 1D – Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *R. mucilaginosa* referente ao cultivo M48A.

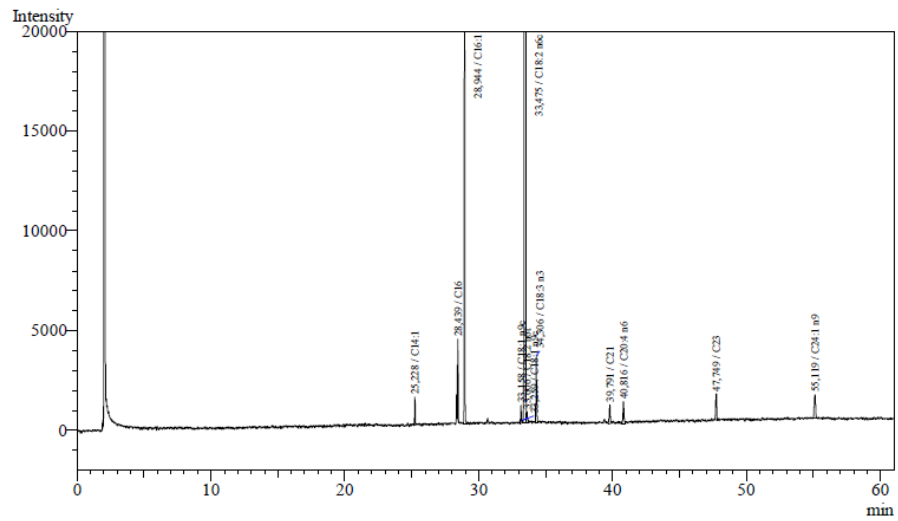


Figura 2D – Cromatograma de ácidos graxos da fração de lipídios obtida da biomassa da levedura *R. mucilaginosa* referente ao cultivo YMG5.

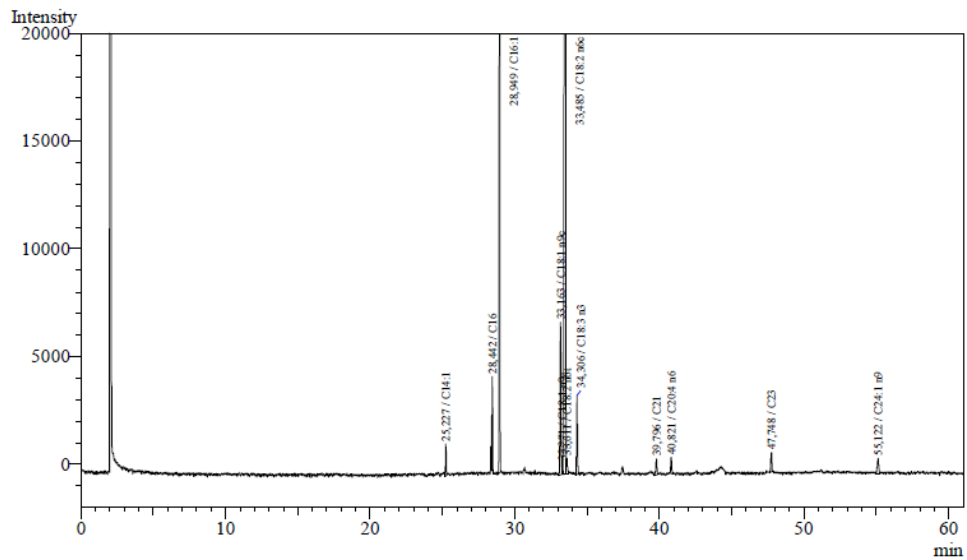
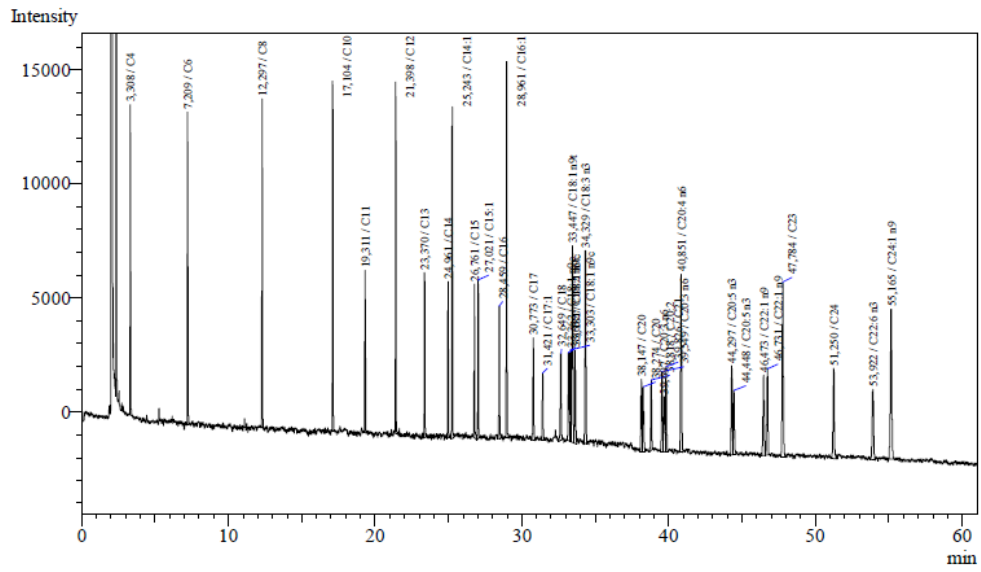


Figura 3D – Cromatograma de ácidos graxos dos padrões utilizados nas análises.



ANEXOS

ANEXO A – Laudo analítico do glicerol bruto.



Laudo Analítico

Produto: 9-GLICERINA BRUTA Número do Lote: 890000001475 Data de Carregamento:

Item Analítico	Unidade	Resultado	Especificação (1)		Métodos
			Min	Máx	
Umidade	% (m)	11.290	-	13.000	AOCS Ca 2e-84
Glicerol	% (m)	81.920	80.000	-	Official Mon.XXI
Cinza	% (m)	5.380	-	8.000	Official Mon.XXI
Cloretos	% (m)	6.180	-	7.000	Método de Mohr
pH		5.390	4.500	9.000	-
MONG	% (m)	1.410	-	2.000	Cálculo

LARISSÉ GARIBOTTI
CRQ 05302605 - 5ª Região / CREA 10.471D