**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por
leveduras oleaginosas**

Rodrigo Fernandes Castanha

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2012**

Rodrigo Fernandes Castanha
Tecnólogo em Saneamento Ambiental

**Utilização do soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras
oleaginosas**

Orientador:
Profa.Dra. **REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Castanha, Rodrigo Fernandes

Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas /
Rodrigo Fernandes Castanha. - - Piracicaba, 2012.
83 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Biodiesel 2. Levedura - Oleaginosas 3. Lipídeos - Extração, composição 4. Soro
de queijo I. Título

CDD 660.62
C346u

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

A minha família, em especial aos meus pais Orivaldo Castanha Filho e Vilma Aparecida Fernandes Castanha, pelo carinho, confiança, cumplicidade e apoio incondicional ao longo de toda a minha vida, e, principalmente, durante toda minha vida acadêmica, dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela minha família, pelos amigos, pela minha saúde, pelas oportunidades que surgiram durante a minha trajetória de vida;

À professora Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro pela oportunidade de desenvolver o projeto, pela amizade, orientação e pelos valiosos ensinamentos acadêmicos;

Ao pós doutorando da École Polytechnique de Montréal: Adriano Pinto Mariano, pelo grande auxílio no planejamento dos experimentos e análises estatísticas;

À pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente: Dra. Lilia Aparecida Salgado de Moraes, pela amizade e pelo suporte ao desenvolvimento deste trabalho;

À pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente: Dra. Shirlei Scramin, pela amizade e auxílio no fracionamento dos lipídeos microbianos;

À assistente Rosângela Mauri Quintinho do Laboratório de Produtos Biológicos da Embrapa Meio Ambiente, pela amizade e colaboração nos experimentos;

À professora Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis do Departamento de Microbiologia e Bioquímica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro - SP, pela doação das linhagens de leveduras utilizadas nos experimentos;

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, – ESALQ/USP, em especial ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, pela formação profissional e pelos valorosos ensinamentos nas disciplinas;

À empresa Jamava Laticínios pelo fornecimento do soro de queijo para execução dos experimentos, em especial ao senhor Samuel Rothenberger grande facilitador na aquisição deste resíduo;

À empresa Fermentec S/c Ltda pelo fornecimento de melaço de cana de açúcar para execução dos experimentos;

À empresa ALGAE – Pesquisa e desenvolvimento de biomassa renovável pelo apoio financeiro para realização das análises de composição de ácidos graxos dos lipídeos;

Às amigas Aline Bortoletto, Fernanda Spada, Gislaine Reis, Nataly Toledo e Stefania Vital pela amizade, colaboração e companheirismo para o desenvolvimento nas disciplinas;

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais e Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente: Ana Gabriela Barbosa, Andreia Casemiro, Liliana Matos, Milena Thyunski, Mírian Sáber, Suikina Nobre, Vanessa Nessner, Wallace Souza e Zayame Pinto, pela amizade e convívio;

Aos amigos Ana Paula Bonfim e João Augusto Nogueira Vanzeli, pela amizade, colaboração, apoio e incentivo para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos Aline Tagliaferro, Beatriz Ochandio, Mariana Peterlini, Monica Rodrigues, Nathalia Varquio, Paula Paiva, Priscila Bertini e Vitor Bertini Junior, pela amizade por todos estes anos e apoio incondicional para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo principal.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 Utilização de resíduos agroindustriais.....	21
3.2 Soro de queijo.....	23
3.3 Produção de lipídeos por micro-organismos.....	24
3.4 Leveduras oleaginosas.....	26
3.5 Síntese de lipídeos de leveduras.....	28
4 METODOLOGIA.....	31
4.1 Micro-organismos e condições de cultivo.....	31
4.2 Preparo do meio de soro de queijo.....	31
4.3 Seleção da linhagem com maior eficiência para produção de lipídeos em meio de soro de queijo.....	32
4.4 Comparação de meios de cultivo e métodos de extração na produção de lipídeos por <i>C. laurentii</i>	32
4.5 Estratégia de delineamento experimental para produção de lipídeos por <i>C. laurentii</i>	33
4.5.1 Estudo do efeito do pH, tempo de fermentação e concentração de melaço na produção de biomassa e lipídeos totais.....	33
4.5.1.1 Primeiro delineamento fatorial completo.....	33
4.5.1.2 Segundo delineamento fatorial completo.....	35
4.5.2 Estudo do efeito da suplementação do meio de cultivo com extrato de levedura e sais inorgânicos na produção de biomassa e lipídeos totais.....	35
4.6 Metodologia analítica.....	37
4.6.1 Determinação gravimétrica da biomassa seca.....	37

4.6.2 Extração dos lipídeos totais pelo método de Bligh e Dyer (1959).....	37
4.6.3 Extração dos lipídeos totais pelo método de Folch et al (1957).....	38
4.6.4 Fracionamento dos lipídeos totais.....	39
4.6.5 Composição em ácidos graxos.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Seleção da linhagem com maior eficiência para produção de lipídeos em meio de soro de queijo.....	41
5.2 Comparação de meios de cultivo e métodos de extração na produção de lipídeos por <i>C. laurentii</i>	42
5.3 Estratégia de delineamento experimental para produção de lipídeos por <i>C. laurentii</i>	44
5.3.1 Estudo do efeito do pH, tempo de fermentação e concentração de melaço na produção de biomassa e lipídeos totais.....	44
5.3.1.1 Primeiro delineamento fatorial completo.....	44
5.3.1.2 Segundo delineamento fatorial completo.....	52
5.3.2 Estudo do efeito da suplementação do meio de cultivo com extrato de levedura e sais inorgânicos na produção de biomassa e lipídeos totais.....	60
5.4 Fracionamento dos lipídeos totais e perfil de ácidos graxos.....	64
6 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	73

RESUMO

Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas

A exploração de resíduos agroindustriais como matérias-primas aplicadas na conversão de lipídeos por leveduras, possibilitam um destino mais sustentável a estes resíduos, visto que matéria-prima lipídica possui grande interesse comercial, tanto para suplementação alimentar como na síntese de biocombustíveis e outros produtos da indústria oleoquímica. Foram avaliadas nove linhagens de leveduras, identificadas anteriormente como boas ou ótimas produtoras de lipídeos em meio mel, para seleção da estirpe mais adequada para a produção de lipídeos em meio de soro de queijo. O crescimento celular foi quantificado pela determinação gravimétrica da biomassa seca a 60°C por 24 h e a extração dos lipídeos totais foi determinada utilizando o método de Bligh e Dyer. A maior produção de lipídeos totais foi de 1,27 g L⁻¹ obtida pela linhagem de *Cryptococcus laurentii*, apresentando diferença significativa em relação às demais linhagens avaliadas, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Posteriormente foi realizada a comparação de dois meios de cultivos e dois métodos de extração de lipídeos de cultura de *C. laurentii*. Os experimentos foram realizados com planejamento fatorial completo 2², com dois fatores e dois níveis. Os lipídeos foram extraídos em dois diferentes métodos: Bligh e Dyer e Folch et al.; as leveduras cultivadas em dois meios de cultivo: soro de queijo e YEPG líquido. Obteve-se conteúdo lipídico final superior em soro de queijo nas condições avaliadas, já o método de extração de Bligh e Dyer não apresentou diferenças estatísticas em comparação ao de Folch et al., contudo apresentou maiores médias, sendo adotado como método de extração dos experimentos seguintes. Realizou-se um estudo para otimização da produção de biomassa e lipídeos totais de *C. laurentii*, em meio de cultivo de soro de queijo suplementado com melaço de cana de açúcar. A primeira etapa consistiu no estudo do efeito do pH, tempo de fermentação e concentração de melaço. A segunda etapa consistiu no efeito da suplementação por extrato de levedura e sais inorgânicos (KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, FeCl₃·6H₂O e ZnSO₄·H₂O). A condição ótima de cultivo para linhagem de *C. laurentii* em meio de soro de queijo foi definida com os seguintes fatores: 360 h de fermentação, pH do meio de cultivo de 6,5 e suplementação (g L⁻¹): 50 melaço, 0,5 extrato de levedura, 4 K₂PO₄, 1 Na₂PO₄, 0,75 MgSO₄·7H₂O e 0,002 ZnSO₄·H₂O. Os lipídeos totais produzidos na condição de cultivo alcançaram 2,96 g L⁻¹, que representa um aumento de 133,1% na produção de lipídeos totais por *C. laurentii* em relação ao meio com soro de queijo sem suplementação. Ocorrendo predomínio de lipídeos neutros 85,76%, com alto teor de ácidos graxos saturados e monossaturados, de cadeia longa com 16 e 18 átomos de carbono, o que possibilita sua aplicabilidade como fonte de triglicerídeos para biodiesel.

Palavras-chave: *Cryptococcus laurentii*; Lipídeos microbianos; Soro de queijo; Melaço; Leveduras; Biodiesel

ABSTRACT

Use of cheese whey for the production of lipids by oleaginous yeast

The exploitation of agro-industrial wastes as raw materials applied in the conversion of lipids by yeasts, allows a more sustainable destination of such waste, since lipid feedstock has great commercial interest, both for food supplementation as in the synthesis of biofuels and other products for oleochemical industry. We have evaluated nine strains of yeast, previously identified as good or excellent producers of lipids in honey medium, for selecting the most suitable strain for the production of lipids in cheese whey medium. Cell growth was quantified by gravimetric determination of dry biomass at 60°C for 24 h and the extraction of total lipids was determined using the method of Bligh and Dyer. The highest yield of total lipids was 1.27 g L⁻¹ produced by the strain of *Cryptococcus laurentii*, significant difference compared to other strains assessed by Tukey test at 5% significance level. Posteriorly was carried out a comparison of two culture media and two lipid extraction methods for culture of *C. laurentii*. The experiments were performed with 2² full factorial design used two factors and two levels. Lipids were extracted by two different methods: Bligh and Dyer and Folch et al.; Yeasts grown in two culture media: cheese whey and liquid YEPG. Was achieved lipid content upper in cheese whey under the conditions evaluated, since the extraction method of Bligh and Dyer showed no statistical differences compared to that of Folch et al., but had higher average, used as a method of extraction in following experiments. Was conducted a study to optimize the production of biomass and lipid content of *C. laurentii*, in culture medium of whey supplemented with sugar cane molasses. The first step was to study the effect of pH, fermentation time and molasses concentration. The second step was the effect of supplementation by yeast extract and inorganic salts (KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, FeCl₃·6H₂O, and ZnSO₄·H₂O). The optimum condition for growing strain of *C. laurentii* in the cheese whey medium was set to the following factors: 360 h fermentation, 6,5 pH and supplementation of (g L⁻¹): 50 molasses, 0.5, yeast extract, 4 K₂PO₄, 1 Na₂PO₄, 0.75 MgSO₄·7H₂O and 0.002 ZnSO₄·H₂O. The total lipid produced in the culture condition reached 2.96 g L⁻¹, which represents an increase of 133.1% total lipid in the production of *C. laurentii* in relation to the cheese whey medium without supplementation. Predominantly occurred neutral lipids 85.76%, with high content of saturated and monosaturated fatty acids, long chain with 16 and 18 carbon atoms, which makes its applicability as a source of triglycerides for biodiesel.

Keywords: *Cryptococcus laurentii*; Microbial lipids; Cheese whey; Molasses; Yeast; Biodiesel

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Fracionamento de lipídeos totais.....	39
Figura 5.1 - <i>Cryptococcus laurentii</i> 11.....	41
Figura 5.2 - Concentração de lipídeos (g L^{-1}) em função da biomassa seca (g L^{-1}) nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50-100 g L^{-1} e tempo de fermentação de 120 - 360 h.....	45
Figura 5.3 - Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de biomassa seca por <i>C. laurentii</i> nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50 - 100 g L^{-1} e tempo de fermentação de 120 - 360 h.....	46
Figura 5.4 - Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de lipídeos totais por <i>C. laurentii</i> nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50 - 100 g L^{-1} e tempo de fermentação de 120-360 h.....	46
Figura 5.5 - Curvas de contorno da produção de biomassa seca (g L^{-1}) nos experimentos com faixa de pH entre 5- 6,5, concentração de melaço de 50 -100 g L^{-1} e tempo de fermentação de 120 – 360 h: a) concentração de melaço em função do tempo, nível fixado: pH = 5,75 b) concentração de melaço em função do pH, nível fixado: tempo de fermentação = 360 h.....	50
Figura 5.6 - Curvas de contorno da produção de lipídeos totais (g L^{-1}) nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50-100 g L^{-1} e tempo de fermentação de 120 – 360 h: a) pH em função do tempo, nível fixado : melaço = 75 g L^{-1} b) concentração de melaço em função do tempo, nível fixado: pH = 6,5.....	51
Figura 5.7 - Concentração de lipídeos (g L^{-1}) em função da biomassa seca (g L^{-1}) nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 -7,5, concentração de melaço de 10-40 g L^{-1} e tempo de fermentação de 360 - 480 h.....	54
Figura 5.8 - Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de biomassa seca por <i>C. laurentii</i> nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de 10 - 40 g L^{-1} e tempo de fermentação de 360 - 480 h.....	55
Figura 5.9 - Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de lipídeos totais por <i>C. laurentii</i> nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de 10 - 40 g L^{-1} e tempo de fermentação de 360 - 480 h.....	55
Figura 5.10 - Curva de contorno da produção de biomassa seca (g L^{-1}) em função da concentração de melaço e tempo de fermentação nos experimentos com faixa de pH	

entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de 10 - 40 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 360 - 480 h.. Nível fixado: pH = 7,0.....58

Figura 5.11 - Curva de contorno da produção de lipídeos totais (g L⁻¹) em função da concentração de melaço e tempo de fermentação nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de 10 - 40 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 360 - 480 h. Nível fixado: pH = 7,0.....58

Figura 5.12 - Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de biomassa seca por *C. laurentii* nos experimentos com delineamento experimental Plackett-Burman.....62

Figura 5.13 - Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de lipídeos totais por *C. laurentii* nos experimentos com delineamento experimental Plackett-Burman.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Informações sobre as linhagens de leveduras oleaginosas utilizadas.....	31
Tabela 4.2 - Delineamento experimental para comparação de meios de cultivo e métodos de extração.....	32
Tabela 4.3 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no primeiro delineamento fatorial completo.....	34
Tabela 4.4 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no segundo delineamento fatorial completo.....	35
Tabela 4.5 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no delineamento Plackett-Burman.....	36
Tabela 5.1 - Produção de biomassa e lipídeos totais de leveduras em soro de queijo.....	41
Tabela 5.2 - ANOVA do experimento de comparação de meios de cultivo e métodos de extração.....	42
Tabela 5.3 - Produção de lipídeos totais em diferentes meios de cultivos e métodos de extração.....	43
Tabela 5.4 - Matriz do primeiro delineamento fatorial completo (valores codificados) e respostas em biomassa seca (g L^{-1}) e concentração de lipídeos (g L^{-1}) ao final do cultivo.....	44
Tabela 5.5 - ANOVA da produção de biomassa seca por <i>C. laurentii</i> nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50-100 g L^{-1} e tempo de fermentação de 120 - 360 h.....	48
Tabela 5.6 - ANOVA da produção de lipídeos totais por <i>C. laurentii</i> nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50 -100 g L^{-1} e tempo de fermentação de 120 - 360 h.....	48
Tabela 5.7 - Matriz do segundo delineamento fatorial completo (valores codificados) e respostas em biomassa seca (g L^{-1}) e concentração de lipídeos (g L^{-1}) ao final do cultivo.....	53
Tabela 5.8 - ANOVA da produção de biomassa seca por <i>C. laurentii</i> nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 -7,5, concentração de melaço de 10-40 g L^{-1} e tempo de fermentação de 360 – 480 h.....	56

Tabela 5.9 - ANOVA da produção de lipídeos totais por *C. laurentii* nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de 10 - 40 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 360 - 480 h.....57

Tabela 5.10 - Matriz do delineamento Plackett-Burman (valores codificados) e respostas em biomassa seca (g L⁻¹) e concentração de lipídeos (g L⁻¹) ao final do cultivo.....61

Tabela 5.11 - Distribuição das frações lipídicas em lipídeos neutros (LN), glicolipídeos + esfingolipídeos (G + E) e fosfolipídeos (F) e perfil de ácidos graxos dos lipídeos totais (LT) e das frações lipídicas (%) obtidos na condição ótima de cultivo determinada pelos experimentos com delineamento fatorial completo.....65

Tabela 5.12 - Distribuição das frações lipídicas em lipídeos neutros (LN), glicolipídeos + esfingolipídeos (G + E) e fosfolipídeos (F) e perfil de ácidos graxos dos lipídeos totais (LT) e das frações lipídicas (%) obtidos na condição ótima de cultivo determinada pelos experimentos com delineamento experimental Plackett-Burman.....66

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento das tecnologias sustentáveis tem ganhado espaço na política ambiental de diversos países bem como dos diferentes setores industriais, dentro do segmento de energia os biocombustíveis vêm se consolidando como alternativa à utilização de combustíveis fósseis.

Avanços tecnológicos significativos ainda devem ser alcançados na busca pelo recurso natural mais adequado e disponível em larga escala para transformar o biodiesel em um produto realmente sustentável e economicamente competitivo.

Os triglicerídeos a partir de óleos de plantas oleaginosas, lenhosas ou gordura animal são obtidos atualmente para suprir as demandas de abastecimento de alimentos e a demanda por combustíveis renováveis.

A procura por fontes mais eficientes e baratas de processos de produção não tradicional de triglicerídeos, especialmente aquelas que podem ser operados de forma contínua e sem qualquer condição de extensas terras aráveis, é essencial, para uma indústria de biodiesel sustentável. A este respeito, os triglicerídeos microbianos podem ser uma matéria-prima alternativa em potencial.

Estudos de acúmulo de lipídeos estão atualmente focados na maximização da produção de óleos em organismos, como leveduras ou algas, e em plantas, para produção de biocombustíveis, incluindo biodiesel (BEOPOULOS et al., 2009).

Os custos de produção de lipídeos microbianos são atualmente mais elevados do que os de óleo vegetal, mas existem muitos métodos para melhorar a tecnologia e conseqüente economia nos processos microbianos de produção de combustíveis. Em particular, a exploração de resíduos agroindústrias e subprodutos como matérias-primas podem reduzir muito os custos, além de possibilitar um novo destino mais sustentável a estes resíduos.

Entre os subprodutos mais abundantes pode ser citado o soro de queijo, que pode ser empregado para o desenvolvimento de vários produtos de valor agregado obtido a partir do soro, que incluem proteína de célula única, etanol, ácidos orgânicos, biopolímeros e plásticos biodegradáveis (KOUSHKI; JAFARI; AZIZI, 2011). Além disso, há um crescente interesse por novas fontes de ácidos graxos essenciais e muita atenção tem sido voltada para os micro-organismos denominados oleaginosos, que representam fontes de óleos e gorduras (RUPCIC; BLAGOVIC; MARIC, 1996; DYAL; NARINE, 2005).

Assim, este projeto tem como objetivo o estudo do crescimento de leveduras oleaginosas em soro de queijo, seleção da estirpe mais adequada para a produção de lipídeos e otimização das condições e componentes do meio de cultivo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

O objetivo deste estudo é a utilização do soro de queijo para crescimento de leveduras oleaginosas e produção de óleos passíveis de serem utilizados como bioprodutos de interesse industrial.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o desenvolvimento de leveduras previamente selecionadas como armazenadoras de lipídeos, em meio contendo soro de queijo;
- Selecionar a linhagem com maior eficiência para produção de lipídeos em meio de soro de queijo;
- Comparar os dois métodos de extração mais utilizados para extração de lipídeos totais para a linhagem previamente selecionada;
- Otimização das condições e dos suplementos adicionados ao meio de cultivo para maior produtividade dos lipídeos;
- Identificar a proporção das diferentes classes dos lipídeos produzidos na condição ótima de cultivo;
- Avaliar a composição dos ésteres de ácidos graxos produzidos nos lipídeos totais e nas diferentes frações na condição ótima de cultivo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Utilização de resíduos agroindustriais

A busca por fontes de energia alternativa é a questão-chave para pesquisa de energia atual. Nos últimos anos, muitos pesquisadores estão se dedicando às pesquisas de energias renováveis para resolver os problemas do aquecimento global associado com o uso de combustíveis fósseis (CHANG et al., 2011).

No século 21, será dada prioridade ao uso racional das fontes de matérias-primas de origem animal e vegetal e recursos materiais para o processamento e utilização segura de recursos de fonte de matérias-primas secundárias, incluindo vários resíduos de plantas de processamento agroindustriais. Alguns destes subprodutos são formados na produção de compotas de fruta, conservas, geléias, purês e sucos, consistindo de cascas, caules e resíduos de celulose (DADASHEV; STEPANOV, 2001).

Várias sementes são também matérias-primas promissoras tais como: uva, ameixa, cereja, damasco, pêssago, cereja, sementes de tomate, etc. Produção de óleos a partir de fontes secundárias das unidades de processamento agroindustriais deve ser considerada muito promissora no sentido da produção de diferentes óleos. Tomate e uva são mais promissores para a fabricação de alimentos e óleo vegetal, sementes de tomate contêm 17 a 29% de óleo e sementes de uva variam de 10 a 24% em função da variedade de uva, grau de maturidade, solo, clima e condições ambientais de crescimento (DADASHEV; STEPANOV, 2001).

Indústrias de processamento de matérias-primas agrícolas, tais como frutas, legumes, carne, leite entre outras, geram milhões de toneladas de efluentes e grandes quantidades de subprodutos, que são inexplorados e em alguns casos levam perigo ao ambiente (DAREIOTI et al., 2009).

Diversos co-produtos e matérias-primas da indústria de alimentos e da agroindústria têm sido empregados para obtenção de produtos biotecnológicos, pela alta disponibilidade e por representarem fonte alternativa de baixo valor comercial (ERNANDES; BOSCOLO; CRUZ, 2010; SILVA et al., 2009).

Em países com uma forte agricultura de base, como o Brasil, a geração de resíduos sólidos é muito alta (GODOY et al., 2010). O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para finalidades biotecnológicas impede à queima de resíduos agrícolas no campo e evita a emissão de certos gases tais como o CO₂, CH₄, N₂O e

que são lançados para atmosfera, absorvendo a radiação infravermelha que traz à tona o efeito estufa (MOLDES et al., 2007).

A indústria açucareira brasileira gera cerca de 18 milhões de toneladas de melaço anualmente, utilizado na produção de álcool e vinagre, como alimento animal e para a adubação do solo (ANDRADE; COSTA, 2008). Melaço da cana de açúcar é um subproduto da fabricação de açúcar, é um material barato e abundante. Os carboidratos (glicose, sacarose e frutose), presente no melaço sugerem que ele pode ser uma excelente fonte de carbono (HE et al., 2007).

Há vários trabalhos relatando a utilização de resíduos agroindustriais em fermentações líquidas para produção de bioprodutos, como Nitschke, Ferraz e Pastore (2004) que estudaram a utilização de melaço, soro de leite e manipueira como substratos para produção de biossurfactantes; a produção de celulose utilizando caldo de cana de açúcar e suco das cascas de abacaxi como meio de cultivo foi avaliado por Castro et al. (2011), e a co-digestão de água residuária da indústria de azeite de oliva, esterco de vaca líquido e soro de queijo foram estudadas por Dareioti et al. (2009), visando a produção de biogás. Aguiar et al. (2010) utilizaram vinhaça e bagaço de cana de açúcar para produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos do gênero *Pleurotus*.

A fermentação em estado sólido é uma tecnologia que permite a transformação de resíduos agroindustriais em valiosos bioprodutos (RODRÍGUEZ et al., 2010). Moldes et al. (2007) avaliaram a utilização de farelo de cevada, sarmentos de videiras, espigas de milho, e cavacos de eucalipto para produção simultânea de ácido lático e biossurfactante, John, Nampoothiri e Pandey (2006) avaliaram o bagaço de mandioca e cana de açúcar como substrato para produção de ácido lático, Chang et al. (2011) utilizaram a palha de arroz como matéria-prima para geração de açúcares reduzidos utilizados na fermentação anaeróbia visando a produção de biohidrogênio, e Rodríguez et al. (2010) estudaram bagaço de uva e de beterraba doce como fonte de carbono para produção de bioetanol.

O uso de resíduos agroindustriais em fermentações em estado sólido é uma alternativa muito interessante para obtenção de enzimas a baixos custos (GODOY et al., 2010). Domínguez et al. (2003) estudaram a produção de lipase em cultura em estado sólido, usando resíduos de farelo de cevada e castanha triturada, Godoy et al. (2010) avaliaram a produção de lipase em resíduo de mamona utilizada para

produção de biodiesel, e Botella et al. (2005) utilizaram o bagaço de uva como substrato para produção de enzimas hidrolíticas (celulases, xilanases e pectinases).

3.2 Soro de queijo

A indústria de laticínios gera significantes quantidades de resíduos líquidos, dos quais, o soro de queijo é o mais abundante e tem sido tradicionalmente um efluente a ser descartado, representando cerca de 80 a 90% do volume total de leite que entra no processo. Com o início da fabricação de queijos em larga escala, o descarte desse resíduo tornou-se um grande problema, uma vez que vinha sendo descartado sem que fossem consideradas as conseqüências ambientais (MAGANHA, 2006).

Soro de queijo é o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína do leite durante o processo de fabricação do queijo (SISO, 1996), sua composição varia de acordo com a composição do leite, do queijo fabricado e processo de fabricação utilizado (KOUSHKI; JAFARI; AZIZI, 2011). O soro de queijo contém aproximadamente 7% de sólidos contendo 10-12% proteínas, o restante sendo lactose (74%), minerais (8%) e gorduras (3%) (MORR, 1989).

Do ponto de vista ambiental o soro de queijo é usualmente considerado como uma importante água residuária devido a sua alta demanda química de oxigênio (DQO) e os valores de DBO que alcançam 30.000-60.000 mg L⁻¹, dependendo do processamento específico utilizado na fabricação de queijos e do conteúdo de lactose (BRANDÃO, 1994; GASEMI et al., 2009; KOUSHKI; JAFARI; AZIZI, 2011; MORESI, 1994).

Aos poucos esse resíduo passou a ser tratado como subproduto e a ser utilizado para produção de lactose e principalmente na alimentação de animais, e atualmente já pode ser considerado pelo seu valor nutricional, o que faz com que seu beneficiamento ou utilização adequada tenham grande importância econômica (MAGANHA, 2006).

Após um salto de dezoito por cento nas exportações de queijo em 2010, estima-se que as exportações da UE para 2011 e 2012 continuem a crescer, o mesmo para os EUA cuja produção de queijo é projetada para expandir em 2011 de 4,8 milhões de toneladas e um aumento de três por cento, para um recorde de 4,9 milhões de toneladas, em 2012. No Brasil a produção de queijo alcançou 648.000 toneladas em 2010, e dados preliminares indicam um aumento para 675.000

toneladas em 2011 e projeção de 700.000 toneladas para 2012 (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2011).

O crescimento contínuo da indústria do queijo, a necessidade de redução de poluentes no efluente e a de maximizar retornos sobre matéria-prima tem incentivado os produtores a criar maneiras novas de disseminar o uso do soro de queijo (LEE et al., 2003). Uma das alternativas consiste no uso deste resíduo como meio para fermentações, visto que aproximadamente 55% dos nutrientes do leite (proteína, lactose e sais minerais) são mantidos em sua composição após o processamento do queijo (SILVA et al., 2009).

O soro de queijo tem sido explorado como meio de cultivo para diversos micro-organismos, seja para produção de biomassa como do cogumelo medicinal, *Phellinus linteus*, realizado por Lee et al. (2010), cultivo do agente de controle biológico *Lecanicillium lecanii* estudado por Machado et al. (2009) ou visando à obtenção de produtos biotecnológicos como sua bioconversão em etanol (DRAGONE et al., 2011; KOUSHKI; JAFARI; AZIZI, 2011), ésteres metílicos de ácidos graxos (TAKAKUWA; SAITO, 2010), biopolímero poli (3-hidroxibutirato) (NIKEL et al., 2005) biossurfactantes (RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006), goma xantana (SILVA et al., 2009), bacteriocinas (CLADERA-OLIVERA; CARON; BRANDELLI, 2004), ácido láctico (GHASEMI et al., 2009), ácido cítrico (EL-SAMRAGY et al., 1996), ácido glucônico (CHATURVEDI; SUBRAMANI; MADAMWAR, 1999), α -amilase (FERREYRA; LORDA; BALATTI, 1988), β -galactosidase (MANERA et al., 2011; SANTIAGO et al., 2004) e manganês peroxidase (FEIJOO et al., 1999).

3.3 Produção de lipídeos por micro-organismos

Os fungos são utilizados em muitos processos industriais, tais como a produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, poliálcoois, pigmentos, lipídeos e glicolipídeos. Alguns destes produtos são produzidos comercialmente, enquanto outros são potencialmente valiosos em biotecnologia (ADRIO; DEMAINE, 2003).

A produção de biocombustíveis baseada na biomassa surgiu como uma abordagem importante para permitir a independência energética, reduzindo emissões de gases do efeito estufa, revitalizando comunidades rurais e melhorando o desenvolvimento econômico sustentável (XIA et al., 2011).

Biodiesel, produzido a partir de óleos vegetais e gorduras animais, é uma alternativa atraente por ser biodegradável e atóxico apresentando características

renováveis, bem como propriedades semelhantes ao diesel convencional. O alto custo do biodiesel tornou-se um dos maiores obstáculos para seu desenvolvimento e aplicação em larga escala, além disso, os óleos vegetais utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel poderiam competir com óleos comestíveis (ZHU; ZONG; WU, 2008).

Recentemente, muita atenção tem sido dada para o desenvolvimento de óleos de micro-organismos, e tem sido encontrado que muitos micro-organismos, como microalgas, fungos e bactérias, têm a capacidade de acumular óleos sob algumas condições de cultivo especial. Em comparação com outros óleos vegetais, óleos microbianos têm muitas vantagens, tais como ciclo de vida curto, menos trabalho requerido, são menos afetados pelo local, estação e clima, e de crescimento mais rápido. Com a rápida expansão do biodiesel, óleos microbianos podem se tornar uma das matérias-primas lipídicas com potencial para produção de biodiesel no futuro, embora muitos trabalhos associados com micro-organismos produzindo óleos necessitam ainda serem realizados (LI; DU; LIU, 2008).

O alto custo do biodiesel de micro-organismos oleaginosos deve-se principalmente ao alto custo da glicose, o qual é estimado em aproximadamente 80% do custo total do meio. Assim, consideráveis esforços têm sido direcionados para minimizar os custos da fonte de carbono e encontrar novas fontes alternativas (TSIGIE et al., 2011).

Para reduzir os custos do óleo microbiano têm sido exploradas outras fontes de carbono ao invés de glicose, especialmente para óleos utilizados na produção de biodiesel. Foram relatados que xilose, arabinose, manose, glicerol e outros resíduos agrícolas e industriais podem ser usados como fonte de carbono para o acúmulo de óleo em leveduras (LI; DU; LIU, 2008).

Microalgas autotróficas podem utilizar dióxido de carbono como fonte de carbono e a luz do sol como energia para o acúmulo de óleo sob algumas condições especiais, as microalgas heterotróficas também podem acumular lipídeos com carbono orgânico como fonte de carbono (LI; DU; LIU, 2008).

Além das microalgas e leveduras, fungos filamentosos também podem acumular lipídeos sob condição especiais de cultivo, sendo explorados principalmente quanto à produção de alguns lipídeos especiais, como ácido docosahexaenóico (DHA), ácido gama-linolênico (GLA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido araquidônico (ARA). Assim como os fungos, alguns tipos de bactérias também podem acumular

óleo sob alguma condição ambiental especial. Mas, geralmente, os lipídeos produzidos pelas bactérias apresentam composição muito diferente de outros óleos microbianos (LI; DU; LIU, 2008).

3.4 Leveduras oleaginosas

O papel de lipídeos, de seus precursores, e seus derivados em células eucarióticas está sendo cada vez mais reconhecido. Os avanços tecnológicos na análise de lipídeos e na engenharia genética estão atraindo cada vez mais interesse para o estudo do metabolismo lipídico em vários organismos. Entre os micro-organismos, leveduras, sendo unicelulares, desprovidas de endotoxinas, passíveis de melhoramento genético e apropriadas para fermentações em grande-escala, são particularmente atraentes para o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

As leveduras têm sido estudadas como micro-organismos produtores de lipídeos devido à sua capacidade de acumular alta quantidade de lipídeos intracelulares, sua alta taxa de crescimento e à semelhança dos seus triacilgliceróis com as frações de óleos vegetais (RATLEDGE, 1988).

As leveduras oleaginosas mais conhecidas incluem os gêneros de *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Trichosporon* e *Yarrowia*. Em média, estas leveduras acumulam lipídeos para um nível correspondente a 40% de sua biomassa, entretanto, em condições de limitação de nutrientes, elas podem acumular lipídeos para níveis que excedem 70% de sua biomassa. No entanto o conteúdo lipídico e o perfil diferem entre as espécies (BEOPOULOS et al., 2009).

A maioria dos lipídeos são triacilgliceróis (TAG) que contém ácidos graxos de cadeia longa e são comparáveis aos óleos vegetais convencionais (RATTRAY, 1989). Algumas dessas espécies oleaginosas mostram a capacidade de metabolizar pentoses, demonstrando o potencial de produzir TAG a partir de biomassa lignocelulósica e outros materiais abundantes e de baixo custo (MEESTERS; HUIJBERTS; EGGINK, 1996; PAPANIKOLAOU et al., 2002; ZHAO, 2005).

A produção de lipídeos por leveduras tem sido estudada utilizando-se diferentes substratos. Gill, Hall e Ratledge (1977) avaliaram o acúmulo de lipídeos por *Candida* sp. 107 crescendo em glicose, o mesmo substrato foi utilizado para *Yarrowia lipolytica* (AGGELIS; KOMAITS, 1999). Evans e Ratledge (1983) pesquisaram o crescimento de *Candida curvata* em glicose, sucrose, lactose, etanol e xilose.

Diferentes condições de cultivo também têm sido avaliadas. Hassan et al. (1996) avaliaram a produção de lipídeos por *Cryptococcus curvatus* sob condições limitantes de N e Fe. Konno et al. (2009) estudaram a influência da radiação U.V. na acumulação de triglicerídeos em *Lipomyces lipofer*.

Uma alternativa para destino e valorização de subprodutos e resíduos industriais é a conversão destes substratos em óleos de célula única (SCO). Bialy, Gomaa e Azab (2011) utilizaram resíduo de óleo de fritura de produtos cárneos e vegetais para crescimento de leveduras e produção de ácidos graxos, Huang et al. (2009) utilizaram o hidrolisado da palha de arroz para produção de lipídeos por *Trichosporon fermentans*, Angerbauer et al. (2008) pesquisaram o potencial de acumulação de lipídeos por *Lipomyces starkeyi* crescendo em lodo de esgoto em diferentes condições, Papanikolaou e Aggelis (2002) estudaram o crescimento e produção de material graxo por *Yarrowia lipolytica* em glicerol industrial, Ykema et al. (1988) avaliaram o crescimento e produção de óleo de célula única de *Apiotrichum curvatum* em permeado de soro do leite.

Leveduras do gênero *Lipomyces* são conhecidas como leveduras oleaginosas, por armazenar grande quantidade de lipídeos, dentre eles os triglicerídeos são os mais produzidos por *Lipomyces*, os quais podem ser usados como alimento e fonte de energia (KONNO et al., 2009). Leveduras oleaginosas podem acumular até 60-70% de estoque de lipídeos em peso seco. (RATLEDGE, 1985; STARKEY, 1946).

O acúmulo de lipídeos por *Lipomyces starkeyi* foi avaliado em meio contendo lodo de esgoto, o qual sob pré-tratamento com ultra-som acumulou valores maiores que 1 g.L^{-1} , concluindo com base no conteúdo de ácidos graxos livres e fósforo, que os lipídeos acumulados de lodo de esgoto podem servir como substrato para a produção de biodiesel (ANGERBAUER et al., 2008).

A levedura *Yarrowia lipolytica* é freqüentemente encontrada em ambientes ricos em substratos hidrofóbicos, tendo desenvolvido mecanismos sofisticados para o uso eficiente de substratos hidrofóbicos como única fonte de carbono, sendo capaz de acumular lipídeos em níveis superiores a 50% do peso seco de células (BARTH; GAILLARDIN, 1996; FICKERS et al., 2005; RATLEDGE, 2005).

Linhagens de *Y. lipolytica* são consideradas como agentes promissores para o tratamento da poluição de óleo mineral e resíduo de óleos vegetais (BEOPOULOS et al., 2009). Papanikolaou et al. (2002) investigou a influência das condições de cultivo, sobre o crescimento e a produção de lipídeos, por *Yarrowia lipolytica* usando

como substrato um derivado da gordura animal industrial, composto por ácidos graxos saturados livres. Esta levedura exibiu expressivo crescimento e produção de reservas de lipídeos, na presença de gorduras saturadas, contendo principalmente triacilglicerol (55% em massa seca de lipídeos totais), e considerável quantidade de ácidos graxos livres (35% em massa seca de lipídios totais).

Cryptococcus spp. são leveduras capsuladas que se disseminam amplamente e são mundialmente reconhecidas como importantes patógenos fúngicos oportunistas. O gênero *Cryptococcus* é constituído por mais de 30 espécies, porém somente duas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii*, são causadoras de manifestações clínicas mais graves de criptococose (CHUCK; SANDE, 1989, KWON-CHUNG et al., 2002).

Algumas linhagens de *Cryptococcus* já são reconhecidas como boas produtoras de lipídeos, destacando-se *C. curvatus* que vem sendo amplamente estudada em fermentações utilizando diferentes substratos, como hidrolisado de bagaço de sorgo (LIANG et al., 2012), hidrolisado de palha de trigo (YU et al., 2011), glicose (ZHANG et al., 2011), ácidos graxos voláteis derivados da produção de hidrogênio por bactérias (CHI et al., 2011), glicerol bruto (THIRU; SANKH; RANGASWAMY, 2011). *C. albidus* também foi avaliada quanto ao acúmulo de lipídeos utilizando ácidos graxos voláteis como fonte de carbono (FEI et al., 2011).

3.5 Síntese de lipídeos de leveduras

Óleos e gorduras são as mais importantes matérias-primas renováveis da indústria química. Elas tornam disponíveis ácidos graxos em tal pureza que podem ser usados para conversões químicas e para a síntese de compostos quimicamente puros. Os oleoquímicos básicos são quimicamente convertidos para uma grande variedade de moléculas, que são utilizados para a produção de cosméticos, lubrificantes, revestimentos, surfactantes, e muitos outros produtos úteis (METZGER; BORNSCHEUER, 2006).

Lipídeos microbianos podem contribuir para suprir a demanda por óleos e gorduras, em geral, sua estrutura e composição são similares às aquelas de óleos vegetais comuns (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002).

O metabolismo de carbono de micro-organismos é estimado para ser baseado principalmente em carboidratos, a presença de lipases permite que muitos micro-organismos passem a utilizar fontes de carbono "não convencionais", tais como triglicerídeos e outros lipídeos com ligações ésteres (NAJJAR et al., 2011).

O acúmulo de lipídeos depende primeiramente da fisiologia do micro-organismo, limitação de nutrientes e condições ambientais, assim como temperatura e pH. Também pode ser afetada pela produção de metabólitos secundários, bem como citrato e etanol (BEOPOULOS et al., 2009).

A formação de lipídeos começa durante a fase exponencial tardia e continua durante a fase estacionária (RASCHKE; KNORR, 2009). Sob condições limitantes e na presença de uma fonte de carbono em excesso os organismos iniciam o armazenamento de lipídeos, assim uma alta taxa de C/N, em torno de 100, é um requisito básico para o acúmulo de lipídeos (MULDER et al., 1962). Micro-organismos que podem acumular lipídeos em mais do que 20% de sua biomassa são definidos como espécies oleaginosas (RATLEDGE; WYNN, 2002).

Leveduras sob limitação de nutrientes passam por três fases de crescimento: o primeiro é a proliferação celular (fase exponencial de crescimento), então o crescimento é reduzido quando nutrientes tornam-se limitantes e as células começam a acumular lipídeos, e, finalmente, células entram na fase estacionária onde o acúmulo de lipídeos continua. Entretanto nessa fase a β -oxidação também se inicia em um esforço para remobilizar o carbono armazenado, até que as células não podem mais produzir metabólitos essenciais e interrompem a maioria das atividades metabólicas (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Durante o processo de crescimento microbiano/acúmulo de reservas lipídicas, o fenômeno dominante que define a composição do lipídeo intracelular é, em primeiro passo, o processo específico de incorporação de ácido graxo dentro das células microbianas e, em segundo, as mudanças endocelulares dos ácidos graxos, definida pela capacidade enzimática do micro-organismo. Os ácidos graxos também serão degradados por necessidade de crescimento ou como substrato dos processos de bio-transformações endocelulares, levando à mudança de concentração e produção de “novos” ácidos graxos, os quais não existiam previamente no substrato (AGGELIS et al., 1995).

O acúmulo de lipídeos pode ocorrer em duas vias metabólicas diferentes: (1) sínteses de lipídeos ‘*de novo*’ envolvendo a produção, em condições definidas, de ácidos graxos precursores, como acetil e malonil-CoA e sua integração dentro da via biossintética de estoque de lipídeos onde o graxo acil-CoA, se reúnem para formar triacilgliceróis (TAG) e esteril ésteres (EE). Os lipídeos neutros são, então, armazenados dentro dos corpos lipídicos (CL) para servir como reservas de energia.

(2) síntese de lipídeos '*ex novo*' via metabólica envolvendo a quebra de ácidos graxos, óleos e triglicerídeos a partir de meio de cultura e seu acúmulo em uma forma não alterada ou modificada dentro da célula. Esta via requer hidrólise de substrato hidrofóbico e incorporação/transporte de ácidos graxos na forma de tioésteres-CoA dentro da célula, os quais alimentam as vias de estoque de lipídeos dentro de corpos lipídicos (CL), para gerar acúmulo de lipídeos neutros (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011; BEOPOULOS et al., 2009).

Os ácidos graxos produzidos pela primeira via metabólica ou pela segunda são esterificados utilizando moléculas de glicerol ou em uma molécula de esteroi para formar os TAGs e EE, respectivamente. O processo completo é conhecido como a via lipídica de armazenamento, e os seus produtos finais formam a fração lipídica neutra da célula, empacotada no interior dos CL (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Os lipídeos neutros armazenados nos CL podem ser mobilizados para atender às necessidades celulares de esteróis e ácidos graxos. A hidrólise dos TAG por lípases fornece diacilglicerol e ácidos graxos livres para biossíntese da membrana lipídica e da complementação das necessidades de energia da célula. Ácidos graxos, uma vez hidrolisados são direcionados à síntese de fosfolípidos ou para o peroxissomo onde ocorre a degradação através de β -oxidação (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

4 METODOLOGIA

4.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Foram utilizadas nove linhagens de leveduras, identificadas anteriormente como boas ou ótimas produtoras de lipídeos em meio mel, em estudo realizado por Vitorelli (2008). Todas as linhagens foram doadas pelo Departamento de Microbiologia e Bioquímica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro - SP e estão listadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Informações sobre as linhagens de leveduras oleaginosas utilizadas

Linhagem	Código	Coletor	Origem	Estado
<i>Cryptococcus laurentii</i>	11	F. Marson	Formigas <i>Acromyrmex</i>	RS
<i>Cryptococcus sp.nov3</i>	52	F. Marson	Formigas <i>Acromyrmex</i>	RS
<i>Lipomyces starkeyi</i>	JAL 425		Mel de abelha jataí	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	JAL 572		Mel de abelha jataí	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	JAL 576		Fazenda Manuel de Abreu	TO
<i>Lipomyces starkeyi</i>	JAL 581		Mosquito Faz. M. Abreu	TO
<i>Rhodotorula graminis</i>	CBS 2826		CBS 2826	
<i>Tricosporon sp.nov.1</i>	27b1	F. Marson	Formigas <i>Acromyrmex</i>	RS
<i>Yarrowia lipolytica</i>	24 ^a	C. C. Lambio	UFT	TO

Fonte: Vitorelli (2008)

Os micro-organismos foram mantidos em meio sólido YEPG (yeast extract peptone glucose) composto de: extrato de levedura 10 g L⁻¹; peptona 20 g L⁻¹; glicose 20 g L⁻¹; ágar 20 g L⁻¹. São replicados sempre que necessário para manutenção dos cultivos e preparo de inóculo. As linhagens foram inoculadas em placas de Petri e incubadas a temperatura de 28°C (± 2°C), durante 5 a 7 dias, e então mantidas sob refrigeração a 4°C, ou utilizadas para inocular novos meios de cultivo.

4.2 Preparo do meio de soro de queijo

O meio de cultivo utilizado foi o soro de queijo, gentilmente fornecido pela empresa Jamava Laticínios (Santa Cruz da Conceição, SP). O soro de queijo foi estocado a 4°C até seu uso. Para sua utilização como meio de cultivo o soro foi

autoclavado a 121°C por 15 minutos para coagulação de suas proteínas. Os precipitados foram removidos por centrifugação a 12000 rpm e o sobrenadante coletado.

4.3 Seleção da linhagem com maior eficiência para produção de lipídeos em meio de soro de queijo

Em frascos Erlenmeyers com capacidade de 125 mL, foram adicionados 50 mL do soro de queijo previamente processado conforme descrito no item anterior (4.2.). Este foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C, e 1 atm. Posteriormente, o resíduo foi inoculado com três discos da cultura com três dias de crescimento em meio YEPG. Os frascos foram incubados pelo período de 10 dias sob temperatura e agitação controladas (28°C/180 rpm). O crescimento celular foi quantificado pela determinação gravimétrica da biomassa seca coletada de amostras de cultura após a incubação (item 4.6.1), e a extração dos lipídeos totais foi realizada utilizando a metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959) (item 4.6.2).

Os ensaios foram realizados em triplicata, para tratamento dos dados foi realizado análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 95% de confiança ($p \leq 0,05$), a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as leveduras estudadas, selecionando desta forma a mais promissora para a produção de lipídeos.

4.4 Comparação de meios de cultivo e métodos de extração na produção de lipídeos por *C. laurentii*

Os experimentos foram realizados com delineamento experimental inteiramente casualizado e tratamentos com delineamento fatorial completo 2^2 , com dois fatores e dois níveis, Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Delineamento experimental para comparação de meios de cultivo e métodos de extração

Tratamentos	Método de Extração	Meio de Cultivo
BDSQ	Bligh e Dyer	Soro de queijo
BDYEPG	Bligh e Dyer	YEPG
FSQ	Folch et al.	Soro de queijo
FYEPG	Folch et al.	YEPG

Os lipídeos foram extraídos em dois diferentes sistemas de solventes: clorofórmio e metanol (2:1) descrito por Folch et al. (1957) (item 4.6.3), clorofórmio, metanol e água (1:4:8) descrito por Bligh e Dyer (1959) (item 4.6.2); as leveduras cultivadas em dois meios de cultivo: soro de queijo previamente processado conforme descrito no item anterior (4.2.) e YEPG líquido composto de: extrato de levedura 5 g L⁻¹; peptona 20 g L⁻¹; glicose 20 g L⁻¹.

Em frascos Erlenmeyers de 125 mL, foram adicionados 50 mL do meio de cultivo e autoclavados por 15 minutos a 121°C e 1 atm, posteriormente, foi inoculado com três discos da cultura com três dias de crescimento em meio YEPG. Os frascos foram incubados pelo período de 10 dias sob temperatura e agitação controladas (28°C/180 rpm). Os ensaios foram realizados em triplicata, para tratamento dos dados por análise de variância (ANOVA), a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os meios de cultivos e métodos de extração utilizados, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

4.5 Estratégia de delineamento experimental para produção de lipídeos por *C. laurentii*

Realizou-se um estudo para a otimização da produção de biomassa e lipídeos totais de *C. laurentii*, em meio de cultivo de soro de queijo suplementado com melaço de cana de açúcar.

A primeira etapa consistiu no estudo do efeito do pH, tempo de fermentação e concentração de melaço. A segunda etapa consistiu no efeito da suplementação por extrato de levedura e sais inorgânicos (KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, FeCl₃·6H₂O e ZnSO₄·H₂O).

4.5.1 Estudo do efeito do pH, tempo de fermentação e concentração de melaço na produção de biomassa e lipídeos totais

4.5.1.1 Primeiro delineamento fatorial completo

Para a maximização da produção de biomassa e lipídeos totais, inicialmente foi realizado experimentos com delineamento inteiramente casualizado com tratamentos em delineamento fatorial completo 2³ (8 tratamentos + 1 ponto central, total de 9 ensaios), para a avaliação do efeito de 3 variáveis sobre a concentração

de biomassa seca e lipídeos totais, a citar: pH, tempo de fermentação e concentração de melaço. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no primeiro delineamento fatorial completo estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no primeiro delineamento fatorial completo

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Melaço (g. L ⁻¹)*	50	75	100
pH	5,0	5,75	6,5
Tempo de fermentação (h)	120	240	360

* A concentração de açúcares redutores totais no lote de melaço utilizado foi de 57%.

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyers de 125 mL, com 50 mL do meio YEPG líquido (item 4.4) autoclavados por 15 minutos a 121°C, e 1 atm, posteriormente, foi inoculado com três discos da cultura com três dias de crescimento, cultivados a 28°C em agitadores orbitais termostatizados, sob agitação de 180 rpm por 24 h.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de soro de queijo previamente processado conforme descrito no item anterior (4.2.), suplementando com melaço de acordo com o delineamento experimental realizado. Posteriormente este foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1 atm, e adicionou-se 4% (v/v) de inóculo. O cultivo aeróbio foi realizado a 28°C em agitadores orbitais termostatizados, sob agitação de 180 rpm.

A realização do primeiro delineamento fatorial completo permitiu verificar que as três variáveis estudadas apresentavam efeitos significativos sobre a produção de biomassa, o aumento do pH e tempo de fermentação apresentou efeito positivo, já o aumento da concentração de melaço apresentou efeito negativo. Para a produção de lipídeos o aumento do pH e tempo de fermentação mostrou efeito positivo e a concentração de melaço não mostrou efeito significativo.

Neste contexto optou-se pela realização de um segundo planejamento fatorial completo utilizando níveis com menores concentrações de melaço, maiores tempos de fermentações e maiores valores de pH.

4.5.1.2 Segundo delineamento fatorial completo

Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no segundo delineamento fatorial completo estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no segundo delineamento fatorial completo

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Melaço (g.L ⁻¹)*	10	25	40
pH	6,5	7,0	7,5
Tempo de fermentação (h)	360	420	480

* A concentração de açúcares redutores totais no lote de melaço utilizado foi de 57%.

Os ensaios do segundo delineamento fatorial completo seguiram as mesmas condições realizadas para meio de cultivo, inóculo e parâmetros fermentativos dos ensaios do primeiro delineamento fatorial completo.

Todos os ensaios dos dois delineamentos fatoriais completos foram realizados aleatoriamente e os resultados foram tratados com o programa STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA) para a obtenção de regressões da produção de biomassa e lipídeos em função das variáveis: pH, tempo de fermentação e concentração de melaço, dentro das faixas estudadas e obtenção das curvas de contorno.

4.5.2 Estudo do efeito da suplementação do meio de cultivo com extrato de levedura e sais inorgânicos na produção de biomassa e lipídeos totais

Para avaliar os efeitos da suplementação com extrato de leveduras e sais inorgânicos na produção biomassa e lipídeos foi realizado um delineamento Plackett- Burman (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Para a seleção das variáveis significativas foram estudadas sete variáveis independentes: extrato de levedura, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O, FeCl₃·6H₂O e ZnSO₄·H₂O, sendo testadas em diferentes níveis através de um delineamento experimental Plackett-Burman com doze ensaios mais cinco repetições no ponto central. As variáveis independentes estudadas estão apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no delineamento de Plackett-Burman

Variáveis (g L ⁻¹)	Níveis		
	-1	0	1
Extrato de levedura	0,5	1	1,5
KH ₂ PO ₄	4	7	10
Na ₂ HPO ₄	1	2	3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75	1,5	2,25
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0	0,1	0,2
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0	0,01	0,02
ZnSO ₄ ·H ₂ O	0	0,001	0,002

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyers de 125 mL, com 50 mL do meio YEPG líquido (item 4.4) autoclavados por 15 minutos a 121°C, e 1 atm, posteriormente, foi inoculado com três discos da cultura com três dias de crescimento, cultivados a 28°C em agitadores orbitais termostatizados, sob agitação de 180 rpm por 24h.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de soro de queijo previamente processado conforme descrito no item (4.2.), suplementado com as sete variáveis avaliadas de acordo com o delineamento experimental realizado mais a adição de melaço. Posteriormente este foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1 atm, e adicionou-se 4% (v/v) de inóculo. O cultivo aeróbio foi realizado a 28°C em agitadores orbitais termostatizados, sob agitação de 180 rpm

Nestes ensaios, a suplementação do meio com melaço, pH inicial e tempo de fermentação corresponderam aos valores otimizados para produção de lipídeos totais por *C. laurentii* nos experimentos com delineamento fatorial completo realizados anteriormente.

Os resultados foram tratados com o programa STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA) para estimar os efeitos principais de cada variável na concentração de lipídeos e concentração de biomassa, através do Diagrama de Pareto.

4.6 Metodologia analítica

4.6.1 Determinação gravimétrica da biomassa seca

O crescimento celular foi quantificado pela determinação gravimétrica da biomassa seca coletada de amostras de cultura após a incubação, centrifugação a 12000 rpm, lavagem das células por duas vezes com água destilada e posterior secagem até peso constante a 60°C.

4.6.2 Extração dos lipídeos totais pelo método de Bligh e Dyer (1959)

Esta extração de lipídeos foi realizada através do método Bligh e Dyer (1959) com modificações. A biomassa seca foi primeiramente tratada com solução de HCl 2M para rompimento da parede celular, posteriormente foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos e descartado o sobrenadante. A biomassa (média de 150 a 750 mg) foi misturada com 4 mL de água, 10 mL de metanol e 5 mL de clorofórmio em tubos com capacidade de 30 mL. A mistura foi agitada em agitador rotativo durante duas horas a 220 rpm, e uma nova diluição foi feita com 5 mL de clorofórmio e 5 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%. Após a separação das duas camadas por centrifugação a 1000 rpm por 2 minutos a camada aquosa superior contendo metanol, água e compostos não lipídicos foi descartada, e a camada clorofórmica inferior filtrada em papel de filtro contendo 1 g de sulfato de sódio anidro e recolhida em frascos de vidro previamente pesados. Este procedimento foi repetido para a extração dos lipídeos remanescentes na amostra. A quantidade de lipídeos presentes na biomassa foi determinada por método gravimétrico, evaporando-se o solvente em atmosfera de nitrogênio e posteriormente em estufa à vácuo até peso constante. Os frascos foram pesados em balança analítica após resfriamento em dessecador sob vácuo.

As respostas para a produção de lipídeos foram calculadas em termos de concentração de lipídeos (g L^{-1}) e ou lipídeos totais (%) eq. (1).

$$\text{Lipídeos Totais (\%)} = \frac{\text{massa de lipídeos (g)}}{\text{biomassa seca (g)}} \times 100 \quad (1)$$

4.6.3 Extração dos lipídeos totais pelo método de Folch et al (1957)

Esta extração de lipídeos foi realizada através do método Folch et al. (1957) com modificações. Foram realizadas três lavagens com 20, 10 e 10 mL da mistura de clorofórmio e metanol (2:1). Adicionou-se a biomassa seca (média de 150 a 750 mg) 10 mL da mistura de clorofórmio e metanol (2:1), triturando e misturando a biomassa em almofariz com o auxílio de um pistilo, posteriormente a mistura foi transferida para tubos com capacidade de 30 mL. Para lavagem do almofariz foi adicionado mais 10 mL da mistura de solventes, transferindo todo conteúdo do almofariz aos tubos. Os tubos foram levados ao ultrasonicador (Branson) por 10 min. a 60 Hz, para favorecer o rompimento da membrana celular. A separação da mistura de solventes contendo os extratos lipídicos da biomassa foi realizada por centrifugação a 1000 rpm por 2 minutos, sendo o sobrenadante desta primeira lavagem removido e armazenado em frascos Erlenmeyer de 50 mL. Este procedimento foi repetido para a extração dos lipídeos remanescentes na amostra com adição de 10 mL da mistura de solventes para segunda e terceira lavagem, sendo as frações obtidas em cada estágio agrupadas no mesmo frasco.

O conteúdo de cada frasco Erlenmeyer foi transferido para funil de separação com capacidade de 125 mL, adicionou-se 10 mL (1/4 do volume total das frações agrupadas) de uma solução de KCl 0,85%, realizando agitação vigorosa para separação das fases.

Após a separação das camadas, a fase aquosa superior contendo água, metanol e compostos não lipídicos foi descartada, e a fase inferior (clorofórmica) filtrada em papel de filtro contendo 1 g de sulfato de sódio anidro e recolhida em frascos de vidro previamente pesados. A quantidade de lipídeos presentes na biomassa foi determinada por método gravimétrico, evaporando-se o solvente em atmosfera de nitrogênio e posteriormente em estufa à vácuo até peso constante. Os frascos foram pesados em balança analítica após resfriamento em dessecador sob vácuo.

As respostas para a produção de lipídeos foram calculadas em termos de concentração de lipídeos (g L^{-1}) e ou lipídeos totais (%) conforme eq. (1) do item 4.6.2.

4.6.4 Fracionamento dos lipídeos totais

O fracionamento de lipídeos foi realizado de acordo com o método de Makri et al. (2010). Foram dissolvidos 100 mg dos lipídeos totais em 1 mL de clorofórmio e fracionados usando uma coluna de vidro (15mm x 100mm) com 1 g de sílica gel 60 ativada por aquecimento overnight a 100°C e eluída em diclorometano. Sucessivas aplicações de 100 mL de diclorometano, 100 mL de acetona e 50 mL de metanol resultaram nas frações contendo Lipídeos Neutros (LN), Glicolipídeos mais Esfingolipídeos (G+E) e Fosfolipídeos (F), respectivamente (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Fracionamento de lipídeos totais

4.6.5 Composição em ácidos graxos

As análises de composição dos ácidos graxos dos lipídeos totais e das três frações lipídicas obtidas foram enviadas para análises no Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), baseado nos métodos: Firestone (2009), Food Standards Agency (2002), Hartman e Lago (1973) e Horwitz (2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção da linhagem com maior eficiência para produção de lipídeos em meio de soro de queijo

A produção de biomassa nas condições de ensaio não apresentou diferenças significativas entre as diferentes linhagens, de acordo com Análise de Variância (ANOVA) ($p = 0,1713$), sendo a maior biomassa de $15,03 \text{ g L}^{-1}$ obtida por *Lipomyces starkeyi* JAL 572. Contudo para produção de lipídeos totais há diferenças significativas ao nível de 0,1% de significância ($p = 4.815 \times 10^{-5}$)

A maior produção de lipídeos totais foi de $1,27 \text{ g L}^{-1}$ obtida pela linhagem de *Cryptococcus laurentii* 11 (Figura 5.1), apresentando diferença significativa em relação às demais linhagens avaliadas, pelo teste de Tukey a 5% de significância (Tabela 5.1).

Figura 5.1 - *Cryptococcus laurentii* 11

Tabela 5.1 - Produção de biomassa e lipídeos totais de leveduras em soro de queijo

Linhagem	Biomassa seca (g L^{-1})*	Lipídeos Totais (g L^{-1})*	Lipídeos Totais (%)
<i>Cryptococcus laurentii</i> 11	$4,57 \pm 0,80^a$	$1,27 \pm 0,28^a$	13,09
<i>Rhodotorula graminis</i> CBS 2826	$9,71 \pm 1,93^a$	$0,09 \pm 0,02^b$	1,79
<i>Yarrowia lipolytica</i>	$3,76 \pm 0,31^a$	$0,09 \pm 0,03^b$	2,41
<i>Cryptococcus</i> sp. nov3 52	$4,87 \pm 2,26^a$	$0,16 \pm 0,12^b$	3,56
<i>Tricosporon</i> sp. Nov. 1 27b1	$9,19 \pm 2,83^a$	$0,13 \pm 0,18^b$	1,46
<i>Lipomyces starkeyi</i> JAL 425	$5,26 \pm 1,62^a$	$0,12 \pm 0,01^b$	2,30
<i>Lipomyces starkeyi</i> JAL 572	$15,03 \pm 14,39^a$	$0,12 \pm 0,02^b$	0,79
<i>Lipomyces starkeyi</i> JAL 576	$4,66 \pm 0,46^a$	$0,13 \pm 0,01^b$	2,81
<i>Lipomyces starkeyi</i> JAL 581	$4,26 \pm 0,07^a$	$0,14 \pm 0,55^b$	3,27

*Valores de média $\pm$ desvio padrão de triplicatas

Médias da mesma coluna com diferentes letras são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

No presente trabalho a linhagem de *C. laurentii* apresentou conteúdo lipídico final maior que 13% da biomassa seca e rendimento de 1,27 g L⁻¹ nas condições avaliadas, sendo promissora para produção de lipídeos, podendo ser utilizada para ensaios de otimização das condições de cultivo em soro de queijo, proporcionando maior produtividade.

5.2 Comparação de meios de cultivo e métodos de extração na produção de lipídeos por *C. laurentii*

No quadro da análise da variância (Tabela 5.2), pode ser observado que a interação destes dois fatores não foi significativa ($p = 0,143982$). A produção de lipídeos totais nos dois métodos de extração nas condições de ensaio não apresentou diferenças significativas, sendo obtida concentração média de 0,74 e 0,57 g L⁻¹ pelo sistema de dois e de três solventes, respectivamente.

Tabela 5.2 - ANOVA do experimento de comparação de meios de cultivo e métodos de extração

Fonte de variação	GL ^a	SQ ^b	QM ^c	Fcalculado	p-valor
Meio	1	2,6133	2,6133	116,580	0,000005
Métodos de extração	1	0,0800	0,0800	3,570	0,095497
Meio x Métodos de extração	1	0,0588	0,0588	2,623	0,143982
Resíduo	8	0,1793	0,0224		
Total	11	2,9315			

a = graus de liberdade; b = soma de quadrados; c = quadrados médios

Entre os meios de cultivo houve diferença significativa a nível de 0,1% de probabilidade ($p = 0,000005$), e pelo teste de Tukey a 1% de significância, os meios testados foram diferentes para produção de lipídeos, sendo o meio de soro de queijo com maior concentração média de 1,12 g L⁻¹ em relação ao meio YEPG, no qual foi produzido em média 0,19 g L⁻¹.

Tabela 5.3 - Produção de lipídeos totais em diferentes meios de cultivos e métodos de extração

Tratamentos	Lipídeos Totais (g L ⁻¹)*	Lipídeos Totais (%)
BDSQ	1,27±0,28	13,09
BDYEPG	0,84±0,56	8,84
FSQ	0,58±0,64	6,41
FYEPG	0,20±0,03	2,35

*Valores de média ± desvio padrão de triplicatas

BDSQ = método Bligh & Dyer e meio de soro de queijo; BDYEPG = método Bligh & Dyer e meio YEPG; FSQ = método Folch et al. e meio de soro de queijo; FYEPG = método Folch et al. e meio YEPG

A linhagem de *C. laurentii* apresentou conteúdo lipídico final superior em soro de queijo nas condições avaliadas, indicando o soro de queijo como um ótimo meio de crescimento de *C. laurentii*, podendo ser utilizado para produção de lipídeos.

Vicente et al. (2009) compararam diferentes métodos de extração de lipídeos totais obtidos da biomassa fúngica de *Mucor circinelloides*. Os lipídeos foram extraídos por três misturas de solventes: clorofórmio: metanol (C: M), clorofórmio: metanol: água (C: M: A) e n-hexano. Ambas as misturas com clorofórmio e metanol (C: M e C:M:A) levaram a maior quantidade de lipídeos extraídos (19,9% e 19% em massa seca, respectivamente). Assim como no presente trabalho, o método de extração utilizando três solventes não apresentou diferenças estatísticas em comparação à extração com sistema de dois solventes, contudo apresentou maiores médias, devendo ser levado em consideração na escolha do método.

5.3 Estratégia de delineamento experimental para produção de lipídeos por *C. laurentii*

5.3.1 Estudo do efeito do pH, tempo de fermentação e concentração de melaço na produção de biomassa e lipídeos totais

5.3.1.1 Primeiro delineamento fatorial completo

A matriz com os valores codificados das variáveis independentes e os resultados dos ensaios do primeiro delineamento fatorial completo para as respostas biomassa seca (g L^{-1}) e concentração de lipídeos (g L^{-1}) estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Matriz do primeiro delineamento fatorial completo (valores codificados) e respostas em biomassa seca (g L^{-1}) e concentração de lipídeos (g L^{-1}) ao final do cultivo

Variáveis independentes				Respostas	
Ensaio	pH	Tempo de fermentação	Concentração de melaço (g L^{-1})	Biomassa seca (g L^{-1})*	Lipídeos Totais (g L^{-1})*
1	+1	+1	+1	$13,23 \pm 0,64$	$1,25 \pm 0,18$
2	-1	+1	+1	$12,54 \pm 0$	$1,16 \pm 0,06$
3	+1	-1	+1	$7,22 \pm 0,30$	$0,75 \pm 0,03$
4	-1	-1	+1	$6,73 \pm 0,73$	$0,70 \pm 0,04$
5	+1	+1	-1	$16,58 \pm 1,47$	$1,53 \pm 0,12$
6	-1	+1	-1	$14,75 \pm 2,23$	$1,05 \pm 0,08$
7	+1	-1	-1	$8,64 \pm 0,77$	$0,55 \pm 0,13$
8	-1	-1	-1	$6,69 \pm 0,34$	$0,52 \pm 0,04$
9	0	0	0	$10,66 \pm 0,33$	$0,79 \pm 0,013$

*os resultados são expressos como médias de triplicatas $\pm$ desvio padrão

Comparando-se as respostas dos experimentos com o primeiro delineamento fatorial completo com os resultados obtidos para o cultivo em meio de soro de queijo sem suplementação e ajuste de pH, realizado no experimento de seleção da linhagem com maior eficiência para produção de lipídeos, verifica-se que houve um aumento considerável na concentração de biomassa seca da levedura em estudo em todos os ensaios realizados, com a suplementação por melaço e ajuste de pH.

Para os lipídeos totais o ensaio 5 apresentou valores maiores da concentração de lipídeos em relação ao meio de soro de queijo sem suplementação e ajuste de pH.

O menor valor observado entre as respostas do primeiro delineamento fatorial completo foi de $6,69 \pm 0,34 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca e $0,52 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ de lipídeos totais, no ensaio 8, e o maior valor foi de $16,58 \pm 1,47 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca e $1,53 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$ de lipídeos totais, no ensaio 5. Isto representa um acréscimo de 20,5 % na produção de lipídeos totais e 263 % na produção de biomassa em relação ao meio sem suplementação e ajuste de pH.

O gráfico da concentração de lipídeos (g L^{-1}) em função da biomassa seca (g L^{-1}) do primeiro experimento com delineamento fatorial completo está apresentado na Figura 5.2. O coeficiente de correlação linear de Pearson calculado apresentou uma alta correlação entre as duas respostas estudadas ($p = 0,91$), resultado esperado visto que a produção de lipídeos é intracelular, assim quanto maior a concentração de células (biomassa) maior a concentração de lipídeos.

Figura 5.2 - Concentração de lipídeos (g L^{-1}) em função da biomassa seca (g L^{-1}) nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melão de 50 - 100 g L^{-1} e tempo de fermentação de 120 - 360 h.

Analisando os resultados da Tabela 5.4 foi possível calcular o efeito das três variáveis estudadas, para a produção de biomassa e lipídeos totais, os quais estão apresentados nos diagramas de Pareto nas Figuras 5.3 e 5.4, respectivamente.

Figura 5.3 – Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de biomassa seca por *C. laurentii* nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50 - 100 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 120 – 360 h.

Figura 5.4 - Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de lipídeos totais por *C. laurentii* nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50 - 100 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 120 – 360 h.

Pode-se verificar na Figura 5.3 que, as três variáveis apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) sobre a produção de biomassa seca, já para a produção de lipídeos totais apenas tempo de fermentação e pH apresentaram efeitos significativos (Figura 5.4). Para ambas as respostas a interação tempo de fermentação X concentração de melaço apresentaram efeito negativo.

A variável pH apresentou efeito positivo sobre as duas respostas avaliadas, provavelmente pela maior taxa de crescimento de leveduras em valores mais elevados de pH e conseqüente favorecimento na síntese de lipídeos. Neste delineamento a faixa estudada para esta variável foi de 5 – 6,5, sendo que para a realização do segundo delineamento fatorial completo redefiniu-se a faixa em pH 6,5 – 7,5 aumentando os valores para definir o pH ótimo para o crescimento e produção de lipídeos por *C. laurentii*.

O tempo de fermentação influenciou positivamente tanto a produção de biomassa como a de lipídeos, provavelmente devido à levedura *C. laurentii* atingir a faixa de estacionária do crescimento nos maiores níveis da faixa estudada para esta variável (120 – 360 h) neste delineamento. Para a realização do segundo delineamento fatorial completo redefiniu-se a faixa em 360 a 480 h, aumentando os valores para definir o tempo de fermentação ótimo para o crescimento e produção de lipídeos por *C. laurentii*.

O melaço não apresentou efeito estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) sobre a resposta de produção de lipídeos, Contudo apresentou efeito negativo sobre a resposta de biomassa seca, indicando que o maior crescimento celular ocorre a menores concentrações deste componente, dentro da faixa estudada (50 - 100 g L⁻¹), o que corresponde a aproximadamente 28,5 - 57 g L⁻¹ de ART). Este comportamento pode ser justificado pela composição do melaço, que contém alta concentração de açúcares redutores totais (57%), resultando na possível inibição do crescimento celular. Isto é esperado porque o meio melaço de cana é nutricionalmente muito rico em fatores de crescimento e íons metálicos (CRUEGER; CRUEGER, 2000).

Sendo assim, para a realização do segundo delineamento fatorial completo, a faixa de estudo para o melaço foi redefinida em 10 - 40 g L⁻¹, o que corresponde a aproximadamente 5,7 – 22,8 g L⁻¹ de ART.

Nas Tabela 5.5 e 5.6 estão o quadro da análise de variância (ANOVA) dos experimentos com primeiro delineamento fatorial completo para as respostas biomassa e produção de lipídeos, respectivamente.

Tabela 5.5 - ANOVA da produção de biomassa seca por *C. laurentii* nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50-100 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 120 – 360 h.

Fonte de variação	GL ^a	SQ ^b	QM ^c	Fcalculado	p-valor
(1) pH	1	9,223	9,223	10,248	0,00448
(2) Tempo de fermentação	1	290,301	290,301	322,585	0,00000
(3) Concentração de melaço	1	17,974	17,974	19,973	0,00023
(1) X (2)	1	0,002	0,002	0,002	0,96237
(1) X (3)	1	2,557	2,557	2,841	0,10739
(2) X (3)	1	6,516	6,516	7,241	0,01405
Resíduo	20	17,998	0,899	-	-
Total	26	344,573	-	-	-

a = graus de liberdade; b = soma de quadrados; c = quadrados médios

% variação explicada (R²) = 94,77

Tabela 5.6 - ANOVA da produção de lipídeos totais por *C. laurentii* nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50-100 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 120 - 360 h.

Fonte de variação	GL ^a	SQ ^b	QM ^c	Fcalculado	p-valor
(1) pH	1	0,156	0,156	10,911	0,00355
(2) Tempo de fermentação	1	2,260	2,260	158,067	0,00000
(3) Concentração de melaço	1	0,185	0,185	1,296	0,26832
(1) X (2)	1	0,088	0,088	6,152	0,02214
(1) X (3)	1	0,053	0,053	3,688	0,06917
(2) X (3)	1	0,116	0,116	8,137	0,00984
Resíduo	20	0,286	0,014	-	-
Total	26	2,978	-	-	-

= graus de liberdade; b = soma de quadrados; c = quadrados médios

% variação explicada (R²) = 90,40

Considerando-se os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$) obteve-se a eq. (2) e eq. (3), que representam as regressões da biomassa seca e lipídeos totais em função das variáveis estudadas para a levedura *C. laurentii*. Como o percentual de variação explicada pelas regressões de biomassa seca e lipídeos totais foi adequado ($R^2 \approx 95\%$ e 90% , respectivamente), podemos concluir que a regressão ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir as curvas de contorno (Figuras 5.5 e 5.6.).

$$X \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 10,78 + 3,478A - 0,865B + 0,620C - 0,521AB \quad (2)$$

Onde: X é a concentração de biomassa e A, B e C são fatores codificados para tempo de fermentação, concentração de melaço e pH, respectivamente.

$$LT \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0,922 + 0,307A + 0,0605B + 0,0806C - 0,0696AB + 0,0605AC \quad (3)$$

Onde: LT é a concentração lipídeos totais e A, B e C são fatores codificados para tempo de fermentação, concentração de melaço e pH, respectivamente.

Figura 5.5 - Curvas de contorno da produção de biomassa seca (g L⁻¹) nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50-100 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 120 - 360 h: a) concentração de melaço em função do tempo, nível fixado: pH = 5,75 b) concentração de melaço em função do pH, nível fixado: tempo de fermentação = 360 h

a)

b)

Figura 5.6 - Curvas de contorno da produção de lipídeos totais (g L^{-1}) nos experimentos com faixa de pH entre 5 - 6,5, concentração de melaço de 50-100 g L^{-1} e tempo de fermentação de 120 - 360 h: a) pH em função do tempo, nível fixado : melaço = 75 g L^{-1} b) concentração de melaço em função do tempo, nível fixado: pH = 6,5

Pode-se observar através da análise da superfície de resposta (Figura 5.5) que há uma região ótima para a maior produção de biomassa na faixa de combinações de concentração de melaço igual a 50 - 75 g L⁻¹, tempo de fermentação de 315 - 360h e pH 5,8 - 6,5. Para a produção de lipídeos totais a região ótima para maior produção é estabelecida na faixa de combinações de concentração de melaço igual a 50 - 90 g L⁻¹ e a mesma faixa de pH e tempo de fermentação encontrada para produção de biomassa (Figura 5.6). Esta faixa maior observada na concentração de melaço para produção de lipídeos é devido a esta variável não apresentar efeito significativo na produção de lipídeos, conforme demonstrado no Diagrama de Pareto (Figura 5.4), o que permite sua utilização em qualquer uma das concentrações avaliadas.

A indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que estabelecer apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas concentrações dos fatores estudados ao redor dos valores ótimos, alcançando um bom rendimento do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

5.3.1.2 Segundo delineamento fatorial completo

A matriz com os valores codificados das variáveis independentes e os resultados dos ensaios do segundo delineamento fatorial completo para as respostas biomassa seca (g L⁻¹) e concentração de lipídeos (g L⁻¹) estão apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Matriz do segundo delineamento fatorial completo (valores codificados) e respostas em biomassa seca (g L^{-1}) e concentração de lipídeos (g L^{-1}) ao final do cultivo

Variáveis independentes				Respostas	
Ensaio	pH	Tempo de fermentação	Concentração de melaço (g L^{-1})	Biomassa seca (g L^{-1})*	Lipídeos Totais (g L^{-1})*
1	+1	+1	+1	$13,48 \pm 0,24$	$0,81 \pm 0,17$
2	-1	+1	+1	$13,70 \pm 0,36$	$0,77 \pm 0,03$
3	+1	-1	+1	$18,66 \pm 0,27$	$1,09 \pm 0,09$
4	-1	-1	+1	$19,37 \pm 1,89$	$1,14 \pm 0,06$
5	+1	+1	-1	$9,88 \pm 0,47$	$0,60 \pm 0,09$
6	-1	+1	-1	$9,96 \pm 0,30$	$0,67 \pm 0,1$
7	+1	-1	-1	$17,55 \pm 1,61$	$0,59 \pm 0,06$
8	-1	-1	-1	$17,60 \pm 1,30$	$1,05 \pm 0,13$
9	0	0	0	$17,88 \pm 0,47$	$1,16 \pm 0,17$

*os resultados são expressos como médias de triplicatas $\pm$ desvio padrão

Os menores valores observados entre as respostas do segundo delineamento fatorial completo foi de $9,88 \pm 0,47 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca, no ensaio 5, e de $0,59 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ de lipídeos totais, no ensaio 7; o maior valor foi de $19,37 \pm 1,89 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa seca, no ensaio 4, e $1,16 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$ de lipídeos totais, no ponto central, o que representa uma redução de 21 % na produção de lipídeos totais e um aumento de 16,8 % na produção de biomassa em relação a maior produção de biomassa e lipídeos totais encontrada nos ensaios do primeiro delineamento fatorial completo.

A Figura 5.7 mostra a concentração de lipídeos (g L^{-1}) em função da biomassa seca (g L^{-1}) do segundo experimento com delineamento fatorial completo. O coeficiente de correlação linear de Pearson calculado apresentou uma boa correlação entre as duas respostas estudadas ($p = 0,74$), resultado esperado, visto que a produção de lipídeos é intracelular, assim quanto maior a concentração de células (biomassa) maior a concentração de lipídeos.

Figura 5.7 - Concentração de lipídeos (g L⁻¹) em função da biomassa seca (g L⁻¹) nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de 10 - 40 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 360 - 480 h.

Analisando os resultados da Tabela 5.7 foi possível calcular o efeito das três variáveis estudadas, para a produção de biomassa e lipídeos totais, os quais estão apresentados nos diagramas de Pareto nas Figuras 5.8 e 5.9, respectivamente.

Figura 5.8 - Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de biomassa seca por *C. laurentii* nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de 10 - 40 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 360 - 480 h.

Figura 5.9 – Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de lipídeos totais por *C. laurentii* nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de 10 - 40 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 360 - 480 h.

Pode-se verificar nos dois diagramas de Pareto (Figuras 5.8 e 5.9) que, apenas a concentração de melaço e tempo de fermentação apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) sobre a produção de biomassa seca e lipídeos totais.

A variável pH não apresentou efeito positivo sobre as duas respostas avaliadas, neste delineamento a faixa estudada para esta variável foi de 6,5 – 7,5.

O tempo de fermentação influenciou negativamente tanto a produção de biomassa como a de lipídeos, provavelmente devido à levedura *C. laurentii* atingir a faixa estacionária do crescimento nos menores níveis da faixa estudada para esta variável (360 – 480 h) neste delineamento, tempos maiores que 360 h favorecem a entrada da levedura na fase de declínio do crescimento celular, diminuindo a viabilidade das células.

O melaço apresentou efeito positivo para as duas respostas, indicando que o maior crescimento celular ocorre nas maiores concentrações deste componente, dentro da faixa estudada ($10 - 40 \text{ g L}^{-1}$), o que corresponde a aproximadamente 5,7 - 22,8 g L^{-1} de ART).

Nas Tabela 5.8 e 5.9 estão o quadro da análise de variância (ANOVA) dos experimentos com segundo delineamento fatorial completo para as respostas biomassa e produção de lipídeos, respectivamente.

Tabela 5.8 – ANOVA da produção de biomassa por *C. laurentii* nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de $10 - 40 \text{ g L}^{-1}$ e tempo de fermentação de 360 - 480 h.

Fonte de variação	GL ^a	SQ ^b	QM ^c	Fcalculado	p-valor
(1) pH	1	0,424	0,424	0,217	0,64637
(2) Tempo de fermentação	1	256,734	256,734	131,222	0,00000
(3) Concentração de melaço	1	39,209	39,209	20,041	0,00023
(1) X (2)	1	0,077	0,077	0,039	0,84423
(1) X (3)	1	0,243	0,243	0,124	0,72809
(2) X (3)	1	7,401	7,401	3,783	0,06597
Resíduo	20	39,130	1,956	-	-
Total	26	343,220	-	-	-

a = graus de liberdade; b = soma de quadrados; c = quadrados médios

% variação explicada (R^2) = 88,59

Tabela 5.9 – ANOVA da produção de lipídeos totais por *C. laurentii* nos experimentos com faixa de pH entre 6,5-7,5, concentração de melaço de 10-40 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 360 - 480 h.

Fonte de variação	GL ^a	SQ ^b	QM ^c	Fcalculado	p-valor
(1) pH	1	0,013	0,013	0,311	0,58309
(2) Tempo de fermentação	1	0,702	0,702	16,718	0,00057
(3) Concentração de melaço	1	0,331	0,331	7,893	0,01083
(1) X (2)	1	0,155	0,155	3,690	0,06912
(1) X (3)	1	0,173	0,173	4,115	0,05604
(2) X (3)	1	0,080	0,080	1,912	0,18196
Resíduo	20	0,839	0,042	-	-
Total	26	2,2936	-	-	-

= graus de liberdade; b = soma de quadrados; c = quadrados médios

% variação explicada (R²) = 63,40

Considerando-se os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$) obteve-se a eq. (4) e eq. (5), que representam as regressões da biomassa seca e lipídeos totais em função das variáveis estudadas para a levedura *C. laurentii*. Como o percentual de variação explicada pelas regressões de biomassa seca e lipídeos totais foi adequado (R² $\approx$ 89% e 63%, respectivamente), podemos construir as curvas de contorno (Figuras 5.10 e 5.11).

$$X \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 15,34 - 3,21A + 1,278B \quad (4)$$

Onde: X é a concentração de biomassa, A e B são fatores codificados para tempo de fermentação e concentração de melaço, respectivamente.

$$LT \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0,8584 - 0,1710A + 0,1175B \quad (5)$$

Onde: LT é a concentração lipídeos totais, A e B são fatores codificados para tempo de fermentação e concentração de melaço, respectivamente.

Figura 5.10 - Curva de contorno da produção de biomassa seca (g L^{-1}) em função da concentração de melaço e tempo de fermentação nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de 10 - 40 g L^{-1} e tempo de fermentação de 360 - 480 h. Nível fixado: pH = 7,0

Figura 5.11 - Curva de contorno da produção de lipídeos totais (g L^{-1}) em função da concentração de melaço e tempo de fermentação nos experimentos com faixa de pH entre 6,5 - 7,5, concentração de melaço de 10 - 40 g L^{-1} e tempo de fermentação de 360 - 480 h. Nível fixado: pH = 7,0

Pode-se observar através das curvas de contorno (Figura 5.10) que há uma região ótima para a maior produção de biomassa na faixa de combinações de concentração de melaço igual a 15 - 40 g L⁻¹ e tempo de fermentação de 360 - 380h. Para lipídeos totais a região ótima para maior produção é estabelecida na faixa de combinações de concentração de melaço igual a 30 - 40 g L⁻¹ e o mesmo tempo de fermentação encontrado para produção de biomassa (Figura 5.11).

Analizando os dois experimentos com planejamento fatorial completo, conclui-se que a maior produção de biomassa ocorre nas condições do ensaio nº 4 do segundo experimento, com concentração de melaço de 40 g L⁻¹, pH 6,5 e 360 h de fermentação, já a maior produção de lipídeos totais é alcançada nas condições do ensaio nº 5 do primeiro experimento, com concentração de melaço de 50 g L⁻¹, pH 6,5 e 360 h de fermentação.

Devido ao baixo custo e por ser uma fonte rica de nutrientes o melaço tem sido amplamente utilizado como meio de cultivo ou suplemento para micro-organismos vislumbrando produção de vários bioprodutos, como fitase (VOHRA; SATYANARAYANA, 2004); manitol (SAHA, 2006); ergosterol (HE et al., 2007); etanol (ALEGRE; RIGO; JOECKES, 2003); aroma frutal (PINOTTI et al. 2006); carotenóides (LIBKIND; VAN BROOCK, 2006); biopolímero (BERWANGER et al., 2007); biosurfactante (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004); frutooligossacarídeos (DORTA et al., 2006); ácido láctico (COELHO et al., 2011); isomaltulose (KAWAGUTI; MANRICH; SATO, 2006); acetoína (XIAO et al., 2006) roboflavina (PUJARI; CHANDRA, 2000).

O melaço da cana de açúcar contém grande quantidade de açúcar, cerca de 50% (33,5% sucrose e 21,2% de açúcar invertido), além disto, é rico em outros componentes como substâncias nitrogenadas (0,4–1,5%), vitaminas, como tiamina (830 µg por 100 g peso seco), riboflavina (250 µg por 100 g peso seco), piridoxina (650 µg por 100 g peso seco), ácido fólico (3,8 µg por 100 g peso seco), biotina (120 µg por 100 g peso seco), ácido pantotênico (2140 µg per 100 g peso seco), e elementos traços (CaO 0,1–1,1%; MgO 0,03–0,1%; K₂O 2,6–5%) (CRUEGER; CRUEGER, 2000).

Angerbauer et al. (2007) utilizando glicose como fonte de carbono para *Lipomyces starkeyi*, encontrou que o maior rendimento de lipídeos foi alcançado em pH 6,5 (7,7 ± 0,2 g L⁻¹). Para *Y. lipolytica* em meio de estearina, o pH 6,0 e 6,5 favoreceu a produção de biomassa (9,5 e 8 g L⁻¹, respectivamente) e o acúmulo de

lipídeos foi favorecido em pH 6,0 ($2,7 \text{ g L}^{-1}$) (PAPANIKOLAOU et al., 2002). Valores estes de pH iguais ou semelhantes a condição ótima de cultivo definido neste estudo para *C. laurentii* em soro de queijo.

Normalmente, as leveduras oleaginosas acumulam substancial quantidade de lipídeos durante a fase estacionária de crescimento. (HASSAN et al., 1995). Assim como neste trabalho, os maiores rendimentos na produção de lipídeos por *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabellina*, utilizando como fonte de carbono tanto xilose como glicerol foram obtidos após longo tempo de fermentação, por mais de 300 h (FAKAS et al., 2009).

O tempo de fermentação prolongado está intimamente relacionado com a limitação de nitrogênio, porque sob privação de nitrogênio diminui o fluxo de carbono através das vias metabólicas (WYNN et al., 2001)

5.3.2 Estudo do efeito da suplementação do meio de cultivo com extrato de levedura e sais inorgânicos na produção de biomassa e lipídeos totais

A matriz com os valores codificados das variáveis independentes e os resultados do delineamento experimental Plackett-Burman para as respostas biomassa seca (g L^{-1}) e concentração de lipídeos (g L^{-1}) estão apresentados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Matriz do delineamento Plackett-Burman (valores codificados) e respostas em biomassa seca (g L^{-1}) e concentração de lipídeos (g L^{-1}) ao final do cultivo

Ensaio	Variáveis independentes*							Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Biomassa seca (g L^{-1})	Lipídeos Totais (g L^{-1})
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	19,67	2,31
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	20,15	2,25
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	19,23	2,16
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	19,20	2,40
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	18,92	2,96
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	19,71	2,39
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	19,59	2,39
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	20,14	2,65
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	20,23	2,35
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	19,02	2,52
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	18,39	2,70
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	18,63	2,17
13	0	0	0	0	0	0	0	18,81	2,37
14	0	0	0	0	0	0	0	18,64	2,36
15	0	0	0	0	0	0	0	18,48	2,38
16	0	0	0	0	0	0	0	18,54	2,30
17	0	0	0	0	0	0	0	18,24	2,62

*X₁ = Extrato de levedura, X₂ = KH₂PO₄, X₃ = Na₂HPO₄, X₄ = MgSO₄·7H₂O, X₅ = CaCl₂·2H₂O, X₆ = FeCl₃·6H₂O, X₇ = ZnSO₄·H₂O.

O menor valor observado entre as respostas do planejamento experimental Plackett-Burman foi de 18,24 g L^{-1} de biomassa seca, no ponto central, e 2,16 g L^{-1} de lipídeos totais, no ensaio 3; o maior valor foi de 20,23 g L^{-1} de biomassa seca, no ensaio 9, e 2,96 g L^{-1} de lipídeos totais, no ensaio 5, o que representa um aumento de 4,25 % na produção de biomassa seca e um aumento de 91,5 % na produção de lipídeos totais em relação a maior produção de biomassa e lipídeos totais encontrada nos experimentos com delineamento fatorial completo.

Analisando os resultados da Tabela 5.10 foi possível calcular o efeito das sete variáveis estudadas, para a produção de biomassa e lipídeos totais, os quais estão apresentados nos diagramas de Pareto nas Figuras 5.12 e 5.13, respectivamente.

Figura 5.12 - Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de biomassa seca por *C. laurentii* nos experimentos com delineamento experimental Plackett-Burman

Figura 5.13 - Diagrama de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a produção de lipídeos totais por *C. laurentii* nos experimentos com delineamento experimental Plackett-Burman

No diagrama de Pareto dos efeitos das sete variáveis na produção de biomassa seca (Figura 5.12), pode-se observar que nenhuma das variáveis avaliadas apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) sobre a produção de biomassa seca. Entretanto, a produção de lipídeos totais foi influenciada positivamente pela concentração de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Figura 5.13).

Li et al. (2006) relataram que a biomassa e o conteúdo de lipídeos podem aumentar significativamente pela otimização da concentração de Zn^{2+} e outros metais, contudo altas concentrações de metais pesados no meio podem causar problemas críticos durante a fermentação, tais como inibição do crescimento microbiano, alteração do pH do substrato e inativação das enzimas associadas com a biossíntese das moléculas de interesse (ROUKAS, 1998)

A linhagem de *C. curvatus* utilizada nos estudos de Hassan et al. (1995), mostrou-se insensível a Fe, mesmo em concentrações onde o Fe foi completamente eliminado. O acúmulo de lipídeos nas células requer geralmente a exaustão de nutrientes como nitrogênio, fósforo, zinco, ferro ou manganês, para permitir que o excesso de carbono seja convertido em lipídeos de reserva (HASSAN et al., 1995).

Extrato de levedura pode ser um excelente substrato para muitos micro-organismos, visto que contém aminoácidos e peptídeos, vitaminas solúveis em água e carboidratos (PEPPLER, 1982; CRUEGER; CRUEGER, 1993). Considerada sua utilização muito onerosa para um processo industrial (NOHATA; KURANE, 1997), quando aplicado em baixa concentração como estabelecido neste trabalho ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) pode indicar uma possível aplicação industrial.

Para produção de lipídeos na condição otimizada optou-se pela utilização de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ no maior nível ($0,002 \text{ g L}^{-1}$) e as demais variáveis no menor nível, visto que estas não apresentaram influências significativas, e tornam o processo mais oneroso.

Diante de todos os experimentos realizados e variáveis avaliadas, a condição de cultivo otimizada para produção de lipídeos totais por *C. laurentii* em soro de queijo consiste em 360 h de fermentação, pH do meio de cultivo de 6,5 e suplementação por: 50 g L^{-1} melaço, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ extrato de levedura, 4 g L^{-1} K_2PO_4 , 1 g L^{-1} Na_2PO_4 , $0,75 \text{ g L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $0,002 \text{ g L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Sendo estes fatores definidos visando maior produção e menores custos com insumos.

Estudos realizados com outros resíduos agroindustriais mostraram a potencial utilização destes e conseqüente redução de impactos ambientais. Xue et al. (2006)

avaliaram o crescimento de *Rhodotorula glutinis* utilizando Glutamato de Sódio como fonte de carbono, obtendo rendimento de 0,2 g L⁻¹ e conteúdo lipídico de 9%. Papanikolaou e Aggelis (2002) estudaram o crescimento de *Yarrowia lipolytica* em glicerol industrial, apresentando reservas lipídicas de 43% e rendimento acima de 3,5 g L⁻¹. O acúmulo de lipídeos por *Lipomyces starkeyi* foi avaliado sob meio contendo lodo de esgoto, o qual sob pré-tratamento com ultra-som acumulou valores maiores que 1g L⁻¹ (ANGERBAUER et al., 2008). O crescimento de *Y. lipolytica* em meio de mistura de estearina com glicerol alcançou uma produção de biomassa de 9 g L⁻¹ e 2,8 g L⁻¹ de lipídeos (PAPANIKOLAOU et al., 2002).

A produção de lipídeos por *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabellina*, utilizando como fonte de carbono o glicerol bruto, foi de 2,0 g L⁻¹ e 3,3 g L⁻¹, respectivamente (FAKAS et al., 2009). Para as linhagens fúngicas *Mucor* sp. LGAM 365, *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411, *Thamnidium elegans* CCF 1465, *Mortierella ramanniana* MUCL 9235, *Mortierella isabellina* MUCL 15102 e *Zygorhynchus moelleri* MUCL 1430 crescidas em glicerol, a produção de máxima de lipídeos (g L⁻¹) foi de: 0,96, 1,56, 2,90, 2,71, 1,86 e 1,57, respectivamente (CHATZIFRAGKOU et al., 2011)

Assim a produção de 2,96 g L⁻¹ de lipídeos alcançada por *C. laurentii* em soro de queijo pode ser considerada uma boa produção se comparado a outros micro-organismos utilizando resíduos agroindustriais como meio de cultivo.

5.4 Fracionamento dos lipídeos totais e perfil de ácidos graxos

A distribuição das frações lipídicas e o perfil de ácidos graxos destas frações e dos lipídeos totais obtidos na condição ótima de cultivo determinada pelos experimentos com delineamento fatorial completo são apresentados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 - Distribuição das frações lipídicas em lipídeos neutros (LN), glicolipídeos + esfingolipídeos (G + E) e fosfolipídeos (F) e perfil de ácidos graxos dos lipídeos totais (LT) e das frações lipídicas (%) obtidos na condição ótima de cultivo determinada pelos experimentos com delineamento fatorial completo

	Lipídeos totais	Lipídeos neutros	Glicolipídeos + Esfingolipídeos	Fosfolipídeos
C16:0	27,41	26,32	30,81	33,79
C18:0	20,44	25,51	17,40	15,69
C18:1	40,56	33,68	31,80	34,41
C18:2	6,33	5,88	6,45	16,11
Outros	5,26	8,61	13,54	<0,01
N.I.**	2,50	1,36	9,60	<0,01
Saturados	57,52	51,10	51,68	49,48
Monoinsaturados	33,91	41,03	31,80	34,41
Poliinsaturados	6,07	6,51	6,92	16,11
Ômega 3	0,19	0,18	0,47	<0,01
Ômega 6	5,88	6,33	6,45	16,11
Trans-isômeros totais	0,08	0,24	<0,01	<0,01
Distribuição das frações	100	72,34	19,44	8,22

*Outros foram: C14:0, C15:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:1 trans, C18:3, C:20, C22:0, C23:0 e C24:0

** N.I.: não indentificado

Na Tabela 5.12 são apresentados a distribuição das frações lipídicas e o perfil de ácidos graxos destas frações e dos lipídeos totais obtidos na condição ótima de cultivo determinada pelos experimentos com delineamento experimental Plackett-Burman são apresentados.

Tabela 5.12 - Distribuição das frações lipídicas em lipídeos neutros (LN), glicolipídeos + esfingolipídeos (G + E) e fosfolipídeos (F) e perfil de ácidos graxos dos lipídeos totais (LT) e das frações lipídicas (%) obtidos na condição ótima de cultivo determinada pelos experimentos com delineamento experimental Plackett-Burman

	Lipídeos totais	Lipídeos neutros	Glicolipídeos + Esfingolipídeos	Fosfolipídeos
C16:0	24,66	24,42	25,25	37,81
C18:0	31,98	31,15	29,88	25,19
C18:1	32,71	33,01	31,60	24,92
C18:2	5,26	5,90	6,75	10,39
Outros	2,72	2,84	6,52	1,69
N.I.**	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Saturados	59,36	58,41	61,65	63,00
Monoinsaturados	32,71	33,01	31,60	26,61
Poliinsaturados	5,26	5,90	6,75	10,39
Ômega 3	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ômega 6	5,26	5,90	6,75	10,39
Trans-isômeros totais	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Distribuição das frações	100	85,76	9,11	5,13

*Outros foram: C:12, C14:0, C16:1, C17:0, C:20, C22:0 e C24:0

** N.I.: não indentificado

Os lipídeos totais da condição ótima de cultivo determinada pelos experimentos com delineamento fatorial completo e os obtidos na condição ótima de cultivo determinada pelos experimentos com delineamento experimental Plackett-Burman, apresentam predominância de lipídeos neutros (72,34% e 85,76%, respectivamente), seguido por glicolipídeos mais esfingolipídeos (19,44% e 9,11%, respectivamente) e em menores proporções fosfolipídeos (8,22% e 5,13%, respectivamente). Distribuição semelhante das frações lipídicas é relatada por Papanikolaou et al. (2009), na qual diferentes linhagens de *Y. lipolytica* crescendo em glicose como fonte de carbono, apresentam média de 79,25 % de lipídeos neutros, seguidos de 13,72 % de glicolipídeos mais esfingolipídeos e 7,03 % de

fosfolipídeos; Chatzifragkou et al. (2011) avaliando o crescimento de *Y. lipolytica* em glicerol encontrou nos lipídeos totais 84,4 % de lipídeos neutros, seguidos de 9,7 % de glicolipídeos mais esfingolipídeos e 5,9 % de fosfolipídeos.

Os fosfolipídeos, glicolipídeos e esfingolipídeos são classificados como lipídeos polares que são componentes estruturais de membrana, já os triglicerídeos são definidos como lipídeos neutros que constituem reservas lipídicas no citosol e servem como fonte de energia as atividades metabólicas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000). O desejável vislumbrando os lipídeos como matéria-prima energética é aumento nos lipídeos neutros, realizado pelo maior estoque de lipídeos em organelas, já o aumento em fosfolipídeos, glicolipídeos e esfingolipídeos representam um aumento na biossíntese de membranas celulares.

Pode-se verificar notório aumento na porcentagem de lipídeos neutros dos lipídeos da condição ótima de cultivo com suplementação de sais encontrada nos experimentos com delineamento Plackett-Burman (85,76%) em relação aos lipídeos obtidos na condição ótima de cultivo sem adição destes suplementos (72,34%), o que é de grande importância pela predominância de triglicerídeos (TAG). Recente demanda por biodiesel em todo o mundo tem tornado o TAG em um recurso com consumo crescente e substancial (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

Nos lipídeos totais, assim como nas frações de lipídeos neutros e glicolipídeos mais esfingolipídeos da condição ótima de cultivo com suplementação de sais foram encontrados principalmente ácidos graxos de cadeia longa com 16 e 18 átomos de carbono, com predominância do ácido oléico (C18:1), seguido por ácido esteárico (C18:0), palmítico (C16:0), e linoléico (C18:2). Estudo realizado Mackry, Fakas e Aggelis (2009) para o cultivo de *Y. lipolytica* em meio de glicerol identificaram o ácido oléico como ácido graxo celular predominante em todas as frações lipídicas.

O ácido palmítico é o ácido graxo saturado mais comumente encontrado nos óleos vegetais e atinge 22% a 28% em óleo de algodão. O ácido esteárico está presente em teores variáveis de 5% a 40% em sebo de animais ruminantes e em 30% a 35% na manteiga de cacau (GUSNTONE, 1996; GUNSTONE; NORRIS, 1983).

Dentre as frações lipídicas, tanto no meio de cultivo com suplementação de sais como o sem suplementação, o ácido palmítico (37,81 e 33,79%, respectivamente), assim como o ácido linoléico (10,39% e 16,11%) aparecem em

maiores proporções nos fosfolipídeos. Entretanto o ácido esteárico tem maiores percentuais nos lipídeos neutros (31,15% e 25,51%, respectivamente), seguido por glicolipídeos mais esfingolipídeos (29,88% e 17,40%, respectivamente) e fosfolipídeos (25,19% e 15,69% respectivamente).

Há diferenças para distribuição do ácido oléico nas frações lipídicas em relação aos dois meios de cultivo. No meio sem suplementação de sais o ácido oléico tem predominância nos fosfolipídeos (34,41%), já para o meio com suplementação de sais o ácido oléico é predominante nos lipídeos neutros (32,71%).

Os ácidos graxos saturados estão em maiores proporções nos glicolipídeos mais esfingolipídeos (51,68%) para o meio sem suplementação de sais e maiores proporções nos fosfolipídeos (63,00%) para o meio com suplementação de sais. Nos dois meios de cultivo os ácidos graxos monoinsaturados predominam nos lipídeos neutros (41,03% e 33,01%, respectivamente) e os poliinsaturados nos fosfolipídeos (16,11% e 10,39%, respectivamente), principalmente o ácido graxo essencial linoléico, ômega 6. O mesmo foi relatado por Papanikolaou et al. (2009) para *Y. lipolytica* em meio de glicose, no qual a maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados (principalmente ácido linoléico) está presente nos fosfolipídeos; Chatzifragkou et al. (2011) para o cultivo de *Thamnidium elegans* CCF 1465 e Mackry, Fakas e Aggelis (2010) para o cultivo de *Y. lipolytica* também obtiveram resultados semelhantes em meio de glicerol.

Os fosfolipídeos recuperados e purificados são utilizados nos diferentes alimentos para auxiliar na emulsificação (margarinas e maioneses) ou na instantaneização de pós, como achocolatados e leites desidratados (REGINATO-D'ARCE, 2006a).

Os lipídeos totais produzidos por *C. laurentii* na condição ótima de cultivo determinada pelos experimentos com delineamento fatorial completo e pelos experimentos com delineamento experimental Plackett-Burman, contém 40,56% e 32,71% de ácido oléico, respectivamente, semelhante ao estudo realizado por Takakuwa e Saito (2010) em que os ésteres metílicos de ácidos graxos produzidos por *Cryptococcus curvatus*, apresentavam em sua composição teores de ácido oléico de 41,2% e 43,2% em meio de melaço de beterraba e de soro de queijo, respectivamente. Também apresentam semelhanças ao estudo da composição de ácidos graxos de *Lypomyces lipofer* em meio (Levedura Malte Peptona) cujo ácido graxo majoritário foi ácido oléico (51% no cultivo no escuro e 56% sob luz) (KONNO

et al., 2009) e *Y. lipolytica* em meio de glicerol, que apresentou concentração de ácido oléico por volta de 45% (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002).

O ácido oléico é o componente da dieta alimentar mais disseminado, sendo o ácido graxo predominante na banha, no sebo e nos óleos de oliva e canola (REGINATO-D'ARCE, 2006a). Os ácidos monoinsaturados, devido à presença da dupla ligação alifática, são mais suscetíveis ao ataque químico, do que os compostos correspondentes saturados, contudo, são mais resistentes à oxidação que os poliinsaturados (CHRISTIE, 1982).

Estudo realizado por Hassan et al. (1995) evidenciaram que os lipídeos produzidos pela linhagem de *C. curvatus* aumentaram ao longo do tempo de fermentação a quantidade de ácido esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e palmítico (C16:0), em contrapartida, houve redução no conteúdo de ácidos graxos insaturados (ácido linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3), sendo observado neste trabalho que o longo tempo de fermentação favoreceu a produção de ácidos graxos saturados e monosaturados.

Tanto nos lipídeos totais como nas diferentes frações há predominância dos ácidos graxos saturados, seguidos pelos monoinsaturados e em pequenas proporções os poliinsaturados, sendo evidenciado nos lipídeos produzidos por *C. laurentii* tanto para o meio de cultivo com adição de sais como sem. Para *Yarrowia lipolytica* em meio de glicerol mais estearina, também houve predominância de ácidos graxos saturados no acúmulo de lipídeos (PAPANIKOLAOU et al., 2002). Quanto maior for o grau de insaturação do ácido graxo componente do triglicerídeo, maior será a intensidade de oxidação (REGINATO-D'ARCE, 2006b).

A limitação de nitrogênio no meio de fermentação resulta na redução da síntese de ácidos graxos poliinsaturados e conseqüente aumento no conteúdo de ácidos graxos saturados (GILL; HALL; RATLEDGE, 1977; CHOI; RYU; RHEE, 1982). Por apresentar um alto conteúdo de ácidos graxos saturados (59,36%) os lipídeos produzidos por *C. laurentii* na condição ótima de cultivo encontrada para o meio com soro de queijo podem ser utilizados para produção de biodiesel, visto que podem oferecer excelentes características de queima como alto número de cetanos dos ésteres metílicos de ácidos graxos produzidos (MITTELBACH; REMSCHMIED, 2004).

O ácido graxo essencial linoléico é um representante da família ômega 6, largamente encontrado nos óleos vegetais, especialmente nos de milho, algodão,

soja, gergelim, girassol e canola (REGINATO-D'ARCE, 2006a). Este ácido graxo essencial é um dos quatro ácidos graxos predominantes nos lipídeos totais produzidos por *C. laurentii*, outra opção de utilização destes lipídeos, consiste na suplementação alimentar para animais domésticos, visto que estes não são capazes de sintetizar ácido linoléico (SHORLAND, 1962), necessitando obter este ácido essencial de fontes alimentares. A deficiência de ácido linoléico e outros ácidos graxos essenciais são caracterizados por alterações cutâneas, que se ingerido em torno de 1% da dieta energética como ácido linoléico pode prevenir o aparecimento destes sintomas (GURR, 1984).

6 CONCLUSÕES

Das nove linhagens de leveduras previamente selecionadas para produção de lipídeos, *C. laurentii* foi a que se destacou na produção de lipídeos em meio de soro de queijo.

O meio de soro de queijo foi melhor para produção de lipídeos do que o meio YEPG, originando 1,12 e 0,19 g L⁻¹, respectivamente, para *C. laurentii*, nas mesmas condições de cultivo.

Os métodos de extração de lipídeos com dois e com três solventes, não foram significativamente diferentes, entretanto como a média foi maior em todas as repetições com o método com três solventes, este foi escolhido para o projeto todo.

Experimentos com delineamento fatorial mostraram que na condição de menor produção de biomassa seca e lipídeos, *C. laurentii* apresentou 6,7 e 0,52 g L⁻¹ respectivamente, saltando para 19,4 e 1,53 g L⁻¹ ocorrendo, portanto, um aumento de 189 % da biomassa seca e 194% na produção de lipídeos, com as alterações do pH, concentração de melaço do meio e tempo de incubação.

O delineamento de Plackett-Burman permitiu um aumento de 133% na produção de lipídeos de *C. laurentii* alcançando cerca de 3 g L⁻¹. Definindo a condição ótima de cultivo em soro de queijo para produção de lipídeos por *C. laurentii* como: 360 h de fermentação, pH 6,5 e suplementação do meio por 50 g L⁻¹ melaço, 0,5 g L⁻¹ extrato de levedura, 4 g L⁻¹ K₂PO₄, 1 g L⁻¹ Na₂PO₄, 0,75 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O e 0,002 g L⁻¹ ZnSO₄·H₂O.

Pode-se verificar notório aumento na porcentagem de lipídeos neutros nos experimentos com delineamento Plackett-Burman (85,76%) em relação aos lipídeos obtidos na condição ótima do delineamento fatorial - cultivo sem adição de sais e suplementos (72,34%), o que é de grande importância pela predominância de triglicerídeos (TAG).

Nos lipídeos totais, assim como nas frações de lipídeos neutros e glicolipídeos mais esfingolipídeos da condição ótima de cultivo com suplementação de sais foram encontrados principalmente ácidos graxos de cadeia longa com 16 e 18 átomos de carbono, com predominância do ácido oléico (C18:1), seguido por ácido esteárico (C18:0), palmítico (C16:0), e linoléico (C18:2).

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, Barcelona, v. 6, p. 191–199, 2003.
- AGGELIS, G.; KOMAITIS, M. Enhancement of single-cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing in the presence of *Teucrium polium* L. aqueous extract. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 21, p. 747-749, 1999.
- AGGELIS, G.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S.; PAPADOPOULOS, G. A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. II Study of cellular lipids of *Mucor circinelloides* during growth on a vegetable oil. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 46, p. 245-250, 1995
- AGUIAR, M.M.; FERREIRA, L.F.R.; MONTEIRO, R.T.R. Use of vinhasse and sugar cane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, p. 1245-1254, 2010
- ALEGRE, R.M.; RIGO, M.; JOECKES, I. Ethanol fermentation of a diluted molasses medium by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chrysotile. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, p. 751-757, 2003.
- ANDRADE, M.R.; COSTA, J.A.V. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 1551-1556, 2008.
- ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBAACH, M.; GUEBITZ, G.M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 99, p. 3051–3056, 2007.
- BARTH, G.; GAILLARDIN, C. *Yarrowia lipolytica*. In: WOLF, K. (Ed.). **Nonconventional yeasts in biotechnology**. Berlin; Heidelberg; New York: Springer Verlag, 1996. p. 313–388.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 90, p. 1193-1206, 2011
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J.H.; JOUVE, C.M.; NICAUD, J.M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 48, p. 375–387, 2009.
- BERWANGER, A.L.D.; SCAMPARINI, A.R.P.; DOMINGUES, N.M.; VANZO, L.T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F.F. Biopolymer production synthesized by *Sphingomonas capsulata*, using industrial media. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 177-183, 2007.

BIALY, H.E.; GOMAA, O.M.; AZAB, K.S. Conversion of oil waste to valuable fatty acids using Oleaginous yeast. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 27, p. 2791–2798, 2011.

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

BOTELLA, C.; ORYA, I.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 26, p.100–106, 2005.

BRANDÃO, S.C.C. Soro: um desafio para as fábricas de queijo. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 15, p. 13-18, 1994.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J.L.; CAROA, G.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 84, p. 96–102, 2011

CHANG, A.C.C.; TU, Y.H.; HUANG, M.H.; LAY, C.H.; LIN, C.Y. Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 36, p. 14280-14288, 2011

CHATURVEDI, M.; SUBRAMANI, S.; MADAMWAR, D. Fermentative production of gluconic acid using cheese whey. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 36, p. 361-364, 1999.

CHATZIFRAGKOU, A; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, Oxford, v. 36, p. 1097-1108, 2011.

CHI, Z.; ZHENG, Y.; MA, J.; CHEN, S. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 36, p. 9542-9550, 2011.

CHOI, S.Y.; RYU, D.D.Y.; RHEE, J.S. Production of microbial lipid: effect of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 14, p. 1165-1172, 1982.

CHRISTIE, W.W. **Lipid analysis**: isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. 207 p.

CHUCK, S.L.; SANDE, M.A. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 321, p. 794-799, 1989.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G.R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 21, p. 53–58, 2004.

COELHO, L.F.; DE LIMA, C.J.B.; RODOVALHO, C.M.; BERNARDO, M.P.; CONTIERO, J. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 28, p. 27-36, 2011.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Substratos para la fermentación industrial. In: _____. **Biotecnología**: manual de microbiología industrial. Madrid: Acribia, 1993. p. 61-65.

_____. Substrates for industrial fermentation. In: _____. (Ed.). **Biotechnology**: a textbook of industrial microbiology. New Delhi: Panima Publ. Corporation, 2000. p. 59–62.

DADASHEV, M.N.; STEPANOV, G.V. Agroindustrial wastes as feedstock for production of oils. **Chemistry and Technology of Fuels and Oils**, New York, v. 37, p. 301-304, 2001

DAREIOTI, M.A.; DOKIANAKIS, S.N.; STAMATELATOU, K.; ZAFIRI, C.; KORNAROS, M. Biogas production from anaerobic co-digestion of agroindustrial wastewaters under mesophilic conditions in a two-stage process. **Desalination**, Amsterdam, v. 248, p. 891–906, 2009.

DOMÍNGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, p. 1225–1229, 2003.

DORTA, C.; CRUZ, R.; OLIVA-NETO, P.; MOURA, D.J.C. Sugarcane molasses and yeast powder used in the Fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Houndmills, v. 33, p. 1003–1009, 2006

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; SILVA, J.B.A.; TEIXEIRA, J.A. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, p. 1977-1982, 2011.

EL-SAMRAGY, Y.A.; KHORSHID, M.A.; FODA, M.I.; SHEHATA, A.E. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, p. 411-416, 1996.

ERNANDES, F.M.P.G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C.H.G. Influência da composição do meio para a produção de *Zimomonas mobilis*. **Acta Scientiarum: Technology**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 21-26, 2010.

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

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

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

FEIJOO, G.; MOREIRA, M.T.; ROCA, E.; LEMA, J.M. Use of cheese whey as a substrate to produce manganese peroxidase by *Bjerkandera* sp BOS55. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Houndmills, v. 23, p. 86–90, 1999.

FERREYRA, R.; LORDA, G.; BALATTI, A. Production of α -amilase in acid cheese whey culture media with automatic pH control. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 259-264, 1998.

FICKERS, P.; BENETTI, P.H.; WACHE, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M.S. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, p. 527–43, 2005.

FIRESTONE, D. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 6th ed. Urbana: AOCS, 2009. p. 1-66.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 226, p. 497-509, 1957.

FOOD STANDARDS AGENCY. **The composition of foods**. 6th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. 537 p.

GHASEMI, M.; NAJAFPOUR, G.; RAHIMNEJAD, M.; BEIGI, P.A.; SEDIGHI, M.; HASHEMIYEH, B. Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, p. 81-84, 2009.

GILL, C.; HALL, M.; RATLEDGE, C. Lipid accumulation in oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose on a single stage continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 32, p. 231-239, 1977

GODOY, M.G.; GUTARRA, M.L.E.; CASTRO, A.M.; MACHADO, O.L.T.; D.M.G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Houndmills, v. 38, p. 945-953, 2010.

GUNSTONE, F.D. **Fatty acid and lipid chemistry**. London: Blackie Academic, 1996.

GUNSTONE, F.D.; NORRIS, F.A. **Lipids in foods chemistry, biochemistry and technology**. Oxford; Pergamon Prees, 1983.

GURR, M.I. **Role of fat in food and nutrition**. London: Elsevier Applied Science, 1984. 170 p.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, p.475-476, 1973.

HASSAN, M.; BLANC, P.J.; GRANGER, L.M.; PAREILLEUX, A. GOMA, G. Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. **Process Biochemistry**, London, v. 31, p. 355-361, 1996.

HE, X.; GUO, X.; LIU, N.; ZHANG, B. Ergosterol production from molasses by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 75, p. 55–60, 2007.

HORWITZ, W. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. Gaithersburg: AOAC, 2010. 20 p.

HUANG, C.; ZONG, M.H.; WU, H.; LIU, Q.P. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 100, p. 4535– 4538, 2009

JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, London, v. 41, p. 759-763, 2006.

KAWAGUTI, H.Y.; MANRICH, E.; SATO, H.H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 29, p. 270–277, 2006.

KONNO, A.; SUSUKI, Y.; OGAWA, T.; TANIUCHI, T. UV Irradiation promotes de the accumulation of triglyceride in *Lipomyces lipofer*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 73, p. 2474-2477, 2009.

KOUSHKI, M.R.; JAFARI, M.; AZIZI, M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, 2011. Disponível em:

<<http://www.springerlink.com/content/u327568j57576460/fulltext.html>>. Acesso em: 22 mar. 2012.

KWON-CHUNG, K.J.; BOEKHOUT, T.; FELL, J.W.; DIAZ, M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetiadae). **Taxon**, Utrecht, v. 51, p. 804-806, 2002.

LEE, C.; LEE, S.; CHO, K.J.; HWANG, S. Mycelial cultivation of *Phellinus linteus* using cheese-processing waste and optimization of bioconversion conditions. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 22, p. 103–110, 2010.

LEE, H.; SONG, M.; HWANG, S. Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1685–1693, 2003.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1152 p.

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

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

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

LIANG, Y.; TANG, T.; SIDDARAMUA, T.; CHOUDHARY, R.; UMAGILIYAGE, A.L. Lipid production from sweet sorghum bagasse through yeast fermentation. **Renewable Energy**, Oxford, v. 40, p. 130–136, 2012.

LIBKIND, D.; VAN BROOCK, M. Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 687–692, 2006.

MACHADO, A.C.R.; MONTEIRO, A.C.; MOCHI, D.A.; YOSHIDA, L. Resíduos e subprodutos agroindustriais e grãos como substratos para produção do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecani*. **Bragantia**, Campinas, v. 68, p. 703–714, 2009.

MAGANHA, M.F.B. **Guia técnico ambiental da indústria de produtos lácteos**. São Paulo: CETESB, 2006. 95 p. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 09 jan. 2012.

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

MANERA, A.P.; ORES, J.C.; RIBEIRO, V.A.; RODRIGUES, M.I.; KALIL, S.J.; FILHO, F.M. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT7082. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 33, p. 155–161, 2011.

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

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

METZGER, J.O.; BORNSCHEUER, U. Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 71, p. 13–22, 2006

MITTELBACH, M.; REMSCHMIED, C. **Biodiesel**. Graz: M. Mittelbach, 2004. 332 p.

MOLDES, A.B.; TORRADO, A.M.; BARRAL, M.T.; DOMIÁNGUEZ, J.M. Evaluation of biosurfactant production from various agricultural residues by *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 4481-4486, 2007

MORESI, M. Cost/benefit analysis of yeast and yeast autolysate production from cheese whey. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v. 6, p. 357-370, 1994.

MORR, C.V. Whey proteins: manufacture. In: FOX, P.F. (Ed.). **Developments in dairy chemistry-4: functional milk proteins**. New York: Elsevier Applied Science, 1989. p. 245–284.

MULDER, E.G.; DEINEMA, M.H.; VAN VEEN, W.L.; ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. Polysaccharides, lipids and poly- β -hydroxybutyrate in microorganisms. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, Leiden, v. 81, p. 797–809, 1962.

NAJJAR, A.; ROBERT, S.; GUÉRIN, C.; VIOLET-ASTHER, M.; CARRIÈRE, F. Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 89, p. 1947–1962, 2011.

NIKEL, P.I.; PETTINARI, M.J.; MÉNDEZ, B.S.; GALVAGNO, M.A. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts. **International Microbiology**, Barcelona, v. 8, p.243-250, 2005.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Seletion of microorganisms for biosurtactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 81-85, 2004.

NOHATA, Y.; KURANE, R. Complete defined medium for largescale production of polysaccharide biosorbent from *Alcaligenes latus* B-16. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Tokyo, v. 83, p. 116–117, 1997.

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

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

PAPANIKOLAOU, S.; CHATZIFRAGKOU, A.; FAKAS, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; NICAUD, J.M.; AGGELIS, G. Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Boschstr, v. 111, p. 1221-1232, 2009.

PEPPLER, H.J. Yeast extracts. In: ROSE, A.H. (Ed.). **Fermented foods**. London: Academic Press, 1982. p. 293–312.

PINOTTI, T.; CARVALHO, P.M.B.; GARCIA, K.M.G.; SILVA, T.R.; HAGLER, A.N.; LEITE, S.G.F. Media components and amino acid supplements influencing the production of fruity aroma by *Geotrichum candidum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.37, p. 494-498, 2006.

PUJARI, V.; CHANDRA, T.S. Statistical optimization of medium components for enhanced riboflavin production by a UV-mutant of *Ermothecium ashbyii*. **Process Biochemistry**, London, v. 36, p. 31-37, 2000.

RASCHKE, D.; KNORR, D. Rapid monitoring of cell size, vitality and lipid droplet development in the oleaginous yeast *Waltomyces lipofer*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 79, p. 178–183, 2009.

RATLEDGE, C. Microbial oils and fats: an overview. In: RATLEDGE, C.; DAWSON, P.; RATTRAY, J. (Ed.). **Biotechnology for the oils and fats industry**. Champaign: American Oil Chemists' Society, 1985. v. 1, p. 298.

_____. Biochemistry, stoichiometry, substrate and economics. In: MORETON, R.S. (Ed.). **Single cell oil**. London: Longman, 1988. p. 33-70.

_____. Single cell oils for the 21st century. In: COHEN, R. (Ed.). **Single cell oils**. Champaign: AOCS Press, 2005. p. 1–20.

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

RATTRAY, J.B.M. Yeasts. In: RATLEDGE, C.; WILKINSON, S.G. (Ed.). **Microbial lipids**. London; New York: Academic Press, 1989. v. 1, p. 555–697.

REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Deterioração de lipídeos - ranço In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. (Org.). **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006a. v. 1, p. 243-299.

_____. Química básica dos lipídeos. In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. (Org.). **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006b. v. 1, p. 196-242.

RODRÍGUEZ, L.A.; TORO, M.E.; VAZQUEZ, F.; CORREA-DANERI, M.L.; GOUIRIC, S.C.; VALLEJO, M.D. Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 35, p. 5914-5917, 2010

RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 32, p.135–142, 2006.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa de Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009, 325 p.

ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**, New York, v. 33, p. 805-810, 1998.

SAHA, B.C. A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 72, p. 676–680, 2006.

SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L.D.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, p. 567-572, 2004.

SHORLAND, F.B. The comparative aspects of fatty acid occurrence and distribution In: FLORKIN, M.; MASON, H.S. **Comparative biochemistry**. New York: Academic Press, 1962. v. 3, p. 1-102.

SILVA, G.A.B.; ALMEIDA, W.E.S.; CORTES, M.S.; MARTINS, E.S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 3, n. 1, p. 28-41, 2009.

SILVA, M.F.; FORNARI, R.C.G.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F.; CICHOSKI, A.J.; CANSIAN, R.L.; LUCCIO, M.D.; TREICHEL, H. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, London, v. 90, p. 119–123, 2009.

SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 57, p.1-11, 1996.

STARKEY, R.L. Lipid production by a soil yeast. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 51, p. 33–50, 1946.

TAKAKUWA, N.; SAITO, K. Conversion of beet molasses and cheese whey into fatty acid methyl esters by the yeast *Cryptococcus curvatus*. **Journal of Oil Science**, Tokyo, v. 5, p. 255-260, 2010.

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

TSIGIE, Y.A.; WANG, C.Y.; TRUONG, C.T.; JU, Y.H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, p. 9216–9222, 2011.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dairy**: world markets and trade. 2011. 27 p. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/dairy_arc.asp>. Acesso em: 10 jan. 2012.

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

VICTORELLI, R. **Seleção de leveduras produtoras de lipídeos**. 2008. 64 p. Trabalho (Conclusão de Curso de Bacharel em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2008.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. A cost-effective cane molasses medium for enhanced cell-bound phytase production by *Pichia anomala*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 471–476, 2004.

WYNN, J.; HAMID, A.; LI, Y.; RATLEDGE, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 147, p. 2857–2864, 2001.

XIA, C.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 4, p. 15, 2011

XIAO, Z.J.; LIU, P.H.; QIN, J.Y.; XU, P. Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate.. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, p. 61–68, 2006.

XUE, F.Y.; ZHANG, X.; LUO, H.; TAN, T.W. A new method for preparing raw material for biodiesel production. **Process Biochemistry**, London, v. 41, p. 1699–1702, 2006

YKEMA, A.; VERBREE, E.C.; KATER, M.M.; SMIT, H. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotricum curvatum* in wheypermeat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 29, p. 211-218, 1988.

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

ZHANG, J.; FANG, X.; ZHU, Z.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**, Oxford, v. 35, p. 1906-1911, 2011.

ZHAO, Z.B. Toward cheaper microbial oil for biodiesel. **China Biotechnology**, Beijing, v. 25, p. 8–11, 2005.

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