UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JUAN DANIEL RIVALDI CHÁVEZ

**Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado
da produção de biodiesel para a obtenção de
biomassa e ribonucleotídeos**

Lorena
2008

JUAN DANIEL RIVALDI CHÁVEZ

**Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado
da produção de biodiesel para a obtenção de
biomassa e ribonucleotídeos**

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de Concentração: Microbiologia
Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Lorena
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Rivaldi Chávez, Juan Daniel

Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos / Juan Daniel Rivaldi Chávez; orientador Silvio Silvério da Silva. – Lorena: 2008.

125 pág.: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada e Bioprocessos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Glicerol 2. Leveduras 3. *Hansenula anomala* 4. *Kluyveromyces marxianus var lactis* 5. Ribonucleotídeos 6. Agitação (Química). I. Título

663.1 - CDU

Dedico esta dissertação aos meus pais, Isabel e Luis, exemplos de carinho e trabalho, e a meus irmãos, Ana e César, pelo apoio e presença constante.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Fundação André Tosello e UFMG, pelos microrganismos fornecidos

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, pela confiança, aprendizado, estímulo constante e pela amizade.

Ao Dr. Ismael Mancilha e Dra. Graça, pelo carinho e exemplo constante.

A la Profa. Dra. Hortensia Ayala, amiga incondicional que siempre ofreció cariño e inspiró en mi confianza y fuerzas para la concreción de todos mis emprendimientos.

A la Profa. Dra. Edelira Velázquez, por la amistad y enseñanzas

A Pablina, por su ayuda y amistad sincera.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, por el apoyo constante.

A Ovidio, por el apoyo durante todos estos años.

A Rosa Nuñez, por el cariño e ejemplo dados desde mi niñez.

Aos amigos Naftali de Souza, Mirian Maretti e Alexandre Morey, pela força, pelos ensinamentos e bons momentos.

À amiga Taís, pela força, carinho e vontade em ajudar em todo momento, pelos dias de alegria e tristeza que passamos durante este tempo.

Ao amigo Mário, pela presença constante, apoio sincero e amizade.

Ao amigo Boutros, amigo e confidente dos dias difíceis e não tão difíceis, pelas discussões intermináveis tentando chegar lá, pelas terças e quintas culturais e pelo apoio constante.

Ao amigo Flávio, pela amizade e por formar parte das noites culturais.

À amiga Priscila, pelo sorriso de cada manhã antes do trabalho.

Ao Ricardo, João Paulo, Dani Cortez e Nicanor, pela amizade e pelas inumeráveis respostas a meus questionamentos técnicos.

À Sandra, Ana e Cida, pela alegria e pelo apoio de sempre.

Á Adriana e Nathalia, pelo esforço e colaboração.

À Cláudia, pela paciência, estímulo e por mudar este coração de pedra.

A todos aqueles que, embora não citados, ajudaram a alcançar este objetivo.

RESUMO

RIVALDI, J.D. **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos.** 2008. 125 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

Este trabalho teve como objetivo a utilização de glicerol, principal subproduto da produção de biodiesel, como fonte de carbono para a produção de biomassa e ribonucleotídeos de leveduras. Com este propósito, foi realizado um *screening* de leveduras para identificar aquelas cepas com maior capacidade de crescimento em glicerol. As leveduras *Hansenula anomala* CCT 2648 e *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* CCT 4086 apresentaram os maiores valores de fator de conversão ($Y_{X/S}$) e produtividade volumétrica em células (Q_X) sob condições fixas de glicerol (30 g/L), temperatura (30 °C) e pH (5,5). Foi também detectada a produção de etanol e ácidos orgânicos, por algumas das leveduras estudadas em meios contendo glicerol. Com base no potencial de produção de biomassa das cepas selecionadas na etapa anterior, foram realizados estudos para avaliar a influência da concentração de glicerol (10 – 50 g/L), extrato de levedura (1 – 3 g/L), pH(4,5 – 6,5) e temperatura (28 – 40°C) no crescimento destas linhagens, utilizando planejamento experimental 2⁴. De acordo com os resultados, a levedura *Hansenula anomala* CCT 2648 foi selecionada para a produção de biomassa e ribonucleotídeos em experimentos conduzidos em bioreator por apresentar maior concentração de biomassa (4,59 g/L) quando comparada com a levedura *Kluyveromyces marxianus* var *lactis* CCT 4086 (3,37 g/L). Nesta fase, foi avaliada a influência da agitação (300 – 700 rpm), aeração (0,5 – 2 vvm) e concentração de glicerol (10 – 50 g/L) com o objetivo de estabelecer as melhores condições de processo, por meio de planejamento 2³. Os maiores valores de $Y_{X/S}$ (0,57- 0,60 g/g) foram obtidos nos ensaios conduzidos sob a menor concentração de glicerol (10 g/L), entretanto, o maiores valores de Q_X (0,44 – 0,62) foram obtidos em cultivos quando se utilizou valores de agitação superiores a 500 rpm. A análise estatística confirmou a significância das variáveis, concentração de glicerol e agitação, e permitiu estabelecer os modelos matemáticos representativos da influência destas variáveis na produção de biomassa e ribonucleotídeos por *Hansenula anomala* CCT 2648. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o potencial de utilização do glicerol derivado da fabricação de biodiesel como fonte de carbono de baixo custo para a produção de biomassa e biomoléculas, como por exemplo os ribonucleotídeos.

Palavras-chave: Glicerol. Leveduras. *Hansenula anomala*. *Kluyveromyces marxianus* var *lactis*. Ribonucleotídeos. Agitação.

ABSTRACT

RIVALDI, J.D. **Biotechnological utilization of glycerol derived from biodiesel production for obtaining biomass and ribonucleotides.** 2008. 125 p. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

Glycerol is considered to be the principle sub-product derived from biodiesel production process. In this work, glycerol was used as the only carbon source for biomass accumulation and ribonucleotides production. For this purpose screening of different strains was achieved, where the yeasts defined as *Hansenula anomala* CCT 2648 and *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* CCT 4086 showed high biomass yield ($Y_{x/s}$) and productivity (Q_x) as well as better ribonucleotides production, using an initial concentration of glycerol of 30 g/L, temperature of 30°C and pH of 5,5. In addition, ethanol and organic acids were detected during glycerol assimilation by these two studied yeasts. Since these two selected yeast showed a promising potential in biomass and ribonucleotides production, a 2^4 complete factorial design was employed in order to study the influence of different parameters: glycerol initial concentration (10 - 50 g/L), yeast extract initial concentration (1-3 g/L), pH (4,5 – 6,5) and temperature (28 – 40°C) on the fermentation yield and productivity. According to the obtained results, the yeast *Hansenula anomala* CCT 2648 achieved higher biomass production (4,59 g/L) when compared to *Kluyveromyces marxianus* var *lactis* CCT 4086 (3,37 g/L). Such fact lead to the selection of *Hansenula anomala* CCT 2648 for a scale-up production of ribonucleotides using a stirred tank bioreactor, where the influence of the following fermentation parameters were studied: agitation (300 – 500 rpm), air input (0,5 – 2 vvm) and glycerol initial concentration (10 – 50 g/L) using a 2^3 full factorial design. High values of $Y_{x/s}$ (0,57 - 0,6 g/g) were observed when the experiments were carried out at lower glycerol concentration (10 g/L), while high values of Q_x (0,44 – 0,62 g/L.h) were observed at high agitation rates of 500 rpm and above. Mathematical models were also created to confirm this influence of glycerol initial concentration and bioreactor stirring on biomass and ribonucleotides production by *Hansenula anomala* CCT 2648. Obtained results in this work demonstrated the feasibility of using glycerol derived from biodiesel production as a promising low-value carbon source for biomass and ribonucleotides accumulation.

Keywords: Glycerol. Yeasts. *Hansenula anomala*. *Kluyveromyces marxianus* var *lactis*. Ribonucleotides. Stirring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Projeção da produção de biodiesel no Brasil (MME, 2006).....	22
Figura 2	a) Reação global e (b) Reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos. R_1 , R_2 , R_3 e R representam grupos alquilas	23
Figura 3	Fluxograma de produção de biodiesel e tratamento de purificação do glicerol.....	24
Figura 4	Tipos de transporte para a assimilação de glicerol pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , onde, FPS1 e YFLO54c são proteínas de transporte, GUT1 e GUT2 são genes para expressão de enzimas de assimilação de glicerol (baseado em NEVES; LAGES; LUCAS, 2004; NEVES, 2006).....	32
Figura 5	Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos e seus possíveis produtos (Adaptado de: GANCEDO; GANCEDO, 1968; HAUGE; KING; CHELDELIN, 1955; XIU et al., 2007).....	34
Figura 6	Estrutura de: a. 5'-Adenina monofosfato; b. bases nitrogenadas componentes dos diferentes nucleotídeos.....	39
Figura 7	Aspecto do glicerol após tratamento com diferentes ácidos concentrados.....	61
Figura 8	Valores de Y_{XS} e Q_X obtidos durante o cultivo de leveduras em glicerol.....	63
Figura 9	Efeito da concentração de extrato de farelo de arroz (EFA) na concentração de células, concentração de glicerol e pH do meio para a levedura <i>Hansenula anomala</i> CCT 2648 cultivada em meio contendo glicerol; EFA: 1 % (v/v) ($\diamond$), 8 % (v/v) ($\square$) e 15 % (v/v).....	69
Figura 10	Efeito da concentração de extrato de farelo de arroz (EFA) na concentração de células, concentração de glicerol e pH do meio para a levedura <i>Kluyveromyces marxianus var lactis</i> CCT 4086 cultivada em meio contendo glicerol; EFA: 1 % (v/v) ($\diamond$), 8 % (v/v) ($\square$) e 15 % (v/v).....	70
Figura 11	Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) representada em forma de gráfico de Pareto da variável resposta biomassa após 24h de cultivo para a levedura <i>H.anomala</i> CCT 2648	75
Figura 12	Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) pelo gráfico de Pareto da variável resposta biomassa após 24h de cultivo para <i>K.marxianus var. lactis</i> CCT 4086.....	79
Figura 13	Curvas de crescimento celular de <i>H.anomala</i> CCT 2648 ($\circ$), concentração de glicerol ($\square$) e produção específica de (RT) ribonucleotídeos totais ($\blacktriangle$) dos ensaios do planejamento fatorial 2^3	83

Figura 14	Fatores de conversão de glicerol em células (a) e produtividade volumétrica em células (b) dos diferentes ensaios do planejamento fatorial 2^3 . Q_x calculado para 10 h de cultivo (tempo de esgotamento de substrato para um dos ensaios com concentração no nível inferior (-1)).....	85
Figura 15	Velocidades específicas de crescimento ($\circ$) e consumo de glicerol ($\triangle$) durante o cultivo de <i>Hansenula anomala</i> CCT 2648 (10 g/L glicerol; 0,5 vvm e 700 rpm).....	86
Figura 16	Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) pelo gráfico de Pareto da variável resposta fator de conversão ($Y_{x/s}$) para o cultivo de <i>H.anomala</i> CCT 2648 em glicerol.....	90
Figura 17	Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) pelo gráfico de Pareto da variável resposta produtividade em célula (Q_x) para o cultivo de <i>H.anomala</i> CCT 2648 em glicerol.....	91
Figura 18	Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) pelo gráfico de Pareto da variável resposta concentração de ribonucleotídeos para o cultivo de <i>H.anomala</i> CCT 2648 em glicerol.....	92
Figura 19	Superfície de resposta para a conversão de glicerol ($Y_{x/s}$) por <i>H. anomala</i> CCT 2648 em função das variáveis codificadas (Aeração fixada em 1,25 vvm).....	95
Figura 20	Superfície de resposta para a produtividade em células de <i>H. anomala</i> CCT 2648 em função das variáveis codificadas (Aeração fixada em 1,25 vvm.).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades físico-químicas do glicerol (OECD SIDS, 2002).....	20
Tabela 2	Aplicações do glicerol no setor industrial (OECD SIDS, 2002).....	21
Tabela 3	Composição do glicerol bruto obtido durante a produção de biodiesel em função de diferentes matérias primas (THOMPSON; HE, 2006).....	26
Tabela 4	Aplicações do RNA e nucleotídeos na área médica (SASAKI et al.,2005)..	42
Tabela 5	Resultados de trabalhos recentemente encontrados para a obtenção de ribonucleotídeos.....	47
Tabela 6	Níveis das variáveis do planejamento fatorial fracionado 2^4 para a identificação das variáveis mais importantes do cultivo em glicerol.....	53
Tabela 7	Matriz do planejamento experimental 2^4 para a avaliação das variáveis de importância no crescimento celular das leveduras pré-selecionadas	54
Tabela 8	Níveis das variáveis de planejamento fatorial completo 2^3 para a otimização do processo de produção de biomassa e ribonucleotídeos.....	55
Tabela 9	Matriz de planejamento fatorial 2^3 para a otimização do processo de produção de biomassa e ribonucleotídeos	56
Tabela 10	Características do glicerol bruto utilizado	59
Tabela 11	Volumes de ácidos concentrados utilizados e características do glicerol após tratamento para a separação de impurezas.....	60
Tabela 12	Produção de biomassa para as diferentes leveduras após 24 h cultivo em meio semi-sintético contendo glicerol	62
Tabela 13	Ribonucleotídeos totais obtidos após 24h de cultivo de diferentes cepas de leveduras em meio contendo glicerol.....	65
Tabela 14	Produção de etanol e ácidos orgânicos após 72 h de fermentação de glicerol pelas leveduras estudadas.....	67
Tabela 15	Fator de conversão de glicerol e produtividade volumétrica em células sob diferentes concentrações de extrato de farelo de arroz (EFA) para <i>H. anomala</i> CCT 2648 e <i>K. marxianus var. lactis</i> CCT 4086	72
Tabela 16	Concentração de biomassa da levedura <i>H. anomala</i> CCT 2648 cultivada nas condições descritas no planejamento fatorial completo 2^4	74
Tabela 17	Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produção de biomassa para a levedura <i>H. anomala</i> CCT 2648.....	76
Tabela 18	Concentração de biomassa da levedura <i>K. marxianus var lactis</i> CCT 4086 cultivada nas condições descritas no planejamento fatorial completo 2^4	78

Tabela 19	Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produção de biomassa para a levedura <i>K. marxianus var lactis</i> CCT 4086.....	79
Tabela 20	Valores resultantes do planejamento fatorial 2^3 aplicado para avaliar a influência da concentração de glicerol, agitação e aeração durante o cultivo de <i>H.anomala</i> CCT 2648 em meio contendo glicerol de biodiesel	82
Tabela 21	Concentração de ribonucleotídeos totais obtidos nos diferentes ensaios do planejamento 2^3 durante o cultivo de <i>H. anomala</i> CCT 2648.....	87
Tabela 22	Velocidades específicas máximas de crescimento e rendimentos máximos de ribonucleotídeos totais nos diferentes ensaios do planejamento 2^3	88
Tabela 23	Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre o fator de conversão ($Y_{x/s}$) durante o cultivo da levedura <i>H. anomala</i> CCT 2648 em meio contendo glicerol de biodiesel.....	90
Tabela 24	Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produtividade volumétrica em células (Q_x) durante o cultivo da levedura <i>H. anomala</i> CCT 2648 em meio contendo glicerol de biodiesel....	91
Tabela 25	Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a concentração de ribonucleotídeos durante o cultivo da levedura <i>H. anomala</i> CCT 2648 em meio contendo glicerol de biodiesel.....	92
Tabela 26	Análise de variância da regressão para os modelos que representam o fator de conversão de glicerol em células, produtividade volumétrica em células e concentração de ribonucleotídeos por <i>H.anomala</i> CCT 2648.....	93

NOMENCLATURA

AMP	Adenosina 5' – monofosfato
CCT	Coleção de Cultura Tropical
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
GMP	Guanosina 5' – monofosfato
IMP	Inosina 5' – monofosfato
RNA	Ácido Ribonucléico
XMP	Xantosina 5' - monofosfato
RT	Ribonucleotídeos totais
$Y_{x/s}$	Fator de conversão de glicerol em células
Q_x	Produtividade volumétrica em células
μ_x	Velocidade específica de crescimento
μ_s	Velocidade específica de consumo de
vvm	glicerol Volume de ar por volume de meio
RPM	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Glicerol.....	19
2.1.1 Características e propriedades	19
2.1.2 Processo para obtenção e tratamento do glicerol bruto	21
2.1.3 Aspectos econômicos.....	27
2.1.4 Assimilação, metabolismo e conversão microbiológica do glicerol.....	29
2.1.5 Principais fatores que influenciam o crescimento de celular de leveduras.....	36
2.2 Ribonucleotídeos	39
2.2.1 Estrutura e função.....	39
2.2.2 Aspectos da produção biotecnológica de ribonucleotídeos.....	44
3 OBJETIVOS.....	48
3.1 Gerais.....	48
3.2 Específicos	48
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Obtenção e tratamento do substrato.....	49
4.1.1 Glicerol.....	49
4.1.2 Tratamento do glicerol bruto.....	49
4.2 Microrganismos.....	49
4.3 Inóculo.....	50
4.4 <i>Screening</i> de levedura com destacada capacidade de crescimento celular, produção de ribonucleotídeos e produção de biomoléculas a partir de glicerol.....	50
4.4.1 Avaliação do crescimento celular e produção de biomassa.....	50
4.4.2 Avaliação da produção de ribonucleotídeos sob diferentes métodos de extração...	51

4.4.2.1 Autólise celular.....	51
4.4.2.2 Ruptura celular mecânica	51
4.4.3 Avaliação de produção de etanol e ácidos orgânicos	52
4.5 Influência da concentração de extrato de farelo de arroz no crescimento celular das leveduras pré-selecionadas em glicerol.....	52
4.6 Avaliação das variáveis de importância para o cultivo de leveduras em glicerol.....	53
4.7 Otimização do processo de produção de biomassa e ribonucleotídeos	54
4.8 Métodos analíticos.....	56
4.8.1 Determinação da concentração celular.....	56
4.8.2 Dosagem de glicerol, ácidos orgânicos e etanol.....	56
4.8.3 Dosagem de ribonucleotídeos.....	57
4.9 Determinação de parâmetros fermentativos e análise de resultados.....	57
5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	59
5.1 Tratamento do glicerol bruto.....	59
5.2 <i>Screening</i> de leveduras com destacada capacidade de crescimento celular, produção de ribonucleotídeos e produção de biomoléculas a partir de glicerol.....	62
5.2.1 Avaliação do crescimento celular e produção de biomassa.....	62
5.2.2 Avaliação da produção de ribonucleotídeos sob diferentes métodos de extração...	64
5.2.3 Avaliação de produção de etanol e ácidos orgânicos	66
5.3 Influência da concentração de extrato de farelo de arroz no crescimento celular das leveduras pré-selecionadas.....	68
5.4 Avaliação das variáveis de importância para o cultivo de leveduras em glicerol.....	73
5.4.1 Avaliação das variáveis de importância para o cultivo da levedura <i>Hansenula anomala</i> CCT 2648 em glicerol	73
5.4.2 Avaliação das variáveis de importância para o cultivo da levedura <i>Kluyveromyces marxianus var lactis</i> CCT 4086 em glicerol.....	77
5.5 Otimização do processo de produção de biomassa e ribonucleotídeos.....	80
6 CONCLUSÕES.....	96
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	98
REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICES.....	109

1 INTRODUÇÃO

A utilização de fontes alternativas de energia é umas das grandes prioridades atuais, que vem contribuir significativamente para contornar os graves problemas ocasionados pelo desenvolvimento tecnológico. Neste sentido, a intensiva busca por combustíveis alternativos ao petróleo e seus derivados surge como uma importante prioridade mundial, uma vez que este combustível fóssil é de natureza não renovável, alto custo e exerce uma influência significativa sobre muitos processos produtivos, transporte e produção de alimentos.

O biodiesel é um combustível produzido por fontes renováveis de energia de grande importância principalmente para os países emergentes. Sua produção e utilização reduzem os impactos ambientais mediante a redução dos gases responsáveis pelo aquecimento global, além de contribuir para o desenvolvimento social desejado mediante a geração de novos empregos (OLIVEIRA et al., 2008).

As projeções de produção de biodiesel pelos países europeus indicam que o volume deste biocombustível será de 15 bilhões de litros para o ano 2012, e para os Estados Unidos e a China, este volume atingirá os 5 bilhões de litros. (LIMA; SOGABE; CALARGE, 2008).

No Brasil, a produção e comercialização de biodiesel possuem importantes vantagens devido à grande disponibilidade de matéria-prima para sua obtenção e ao crescimento contínuo da indústria de óleos vegetais e etanol (SSEB, 2005; OLIVEIRA et al., 2008). Este fato, associado à obrigatoriedade da adição de biodiesel ao combustível de petróleo, estipulado pela lei 11097/2005 do governo federal, vem estimulando o crescimento acelerado da indústria de biodiesel no Brasil. Esta legislação determina que, para o ano 2013 a quantidade de biodiesel a

ser adicionado deverá alcançar 5 % do volume total de diesel utilizado (ANP, 2006; PNPB, 2006).

O glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10 % do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol (DASARI et al., 2005). O volume de glicerol estimado para o ano 2008, no Brasil, deverá alcançar os 105 milhões de litros como consequência da produção de 1 bilhão de litros de biodiesel, necessário para cumprir a legislação de adição de 2 % de biodiesel ao combustível diesel (OLIVEIRA, 2008).

Outra projeção aponta ainda, que com o aumento do volume de biodiesel, o glicerol co-produzido aumentará sistematicamente de 83 para 330 milhões L/ano até o ano 2010 (MNE, 2006). Entretanto, a demanda comercial de glicerol no Brasil é de apenas 40 mil toneladas por ano, ocasionando assim um crescimento significativo no volume de glicerol acumulado, com perdas de potencial e prejuízos (OLIVEIRA, 2008).

Visando evitar futuros problemas derivados do acúmulo de glicerol e para tornar a produção de biodiesel com maior viabilidade econômica, torna-se necessário a busca de alternativas para o uso do glicerol bruto gerado nesta produção. Este subproduto apresenta um valor comercial e possui inúmeras possibilidades de aplicações industriais, entretanto o glicerol obtido da produção de biodiesel apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que o conferem um baixo valor de comercialização (OOI et al., 2004). Dessa forma, existe um grande interesse na sua purificação e no seu reaproveitamento, o que o proporcionará um maior valor agregado, permitindo que a produção de biodiesel se torne mais competitiva no crescente mercado de biocombustíveis. Os processos para sua purificação incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de

íons para a remoção principalmente de K^+ e Na^+ utilizados como catalisadores (YONG et al., 2001). No entanto, os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol é descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando conseqüentemente os problemas e riscos ambientais.

A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado como biomassa e moléculas bioativas, é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (PAPANIKOLAU et al., 2002; ITO et al., 2005; ZHAO; CHEN; YAO, 2006). As leveduras tradicionalmente apresentam um sistema metabólico capaz de permitir a utilização do glicerol como fonte de carbono e energia em processos de cultivo microbiano. Neste sentido, a biotecnologia moderna, com todo seu avanço trará grandes contribuições e permitirá a obtenção de biomoléculas com importantes propriedades.

Entre as moléculas bioativas, os ribonucleotídeos receberam maior atenção nas últimas décadas devido às suas propriedades funcionais e a seu valor de mercado, de aproximadamente 27 US\$/g (OGRODOWSKI, 2006). Os ribonucleotídeos, componentes principais do ácido ribonucléico de microrganismos, são moléculas funcionais, nutracêuticas e com reconhecidas propriedades potenciadoras de sabor amplamente utilizadas na indústria de alimentos. Possuem ainda importantes propriedades terapêuticas e efeitos imunoestimuladores de ampla utilização na indústria farmacêutica para a formulação de novos fármacos com propriedades antivirais e anti-tumorais (SHALLER, 2006).

Considerando a capacidade de algumas linhagens de leveduras de utilizarem o glicerol como fonte de carbono e energia, o potencial de aplicabilidade dos ribonucleotídeos e a grande disponibilidade de glicerol, este trabalho permitiu estabelecer uma nova estratégia de utilização e valorização do glicerol originado da produção de biodiesel, para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos.

Ressalta-se que, este projeto apresenta um caráter tecnológico e inovador, uma vez que na literatura consultada, não foi encontrado nenhum estudo sobre o aproveitamento do glicerol resultante da produção de biodiesel para a obtenção biomassa e ribonucleotídeos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GLICEROL

2.1.1 Características e propriedades

Glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva. Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano (OECD-SIDS, 2002)

Na natureza, o glicerol existe em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê) e animais em formas combinadas de glicerina com ácidos graxos (THOMPSON; HE, 2006). O glicerol é também um composto considerado fundamental dentro do sistema metabólico de microrganismos; onde atua como precursor de numerosos compostos, e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (BRISSON et al. 2001; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Em microrganismos eucarióticos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos (BRISSON et al., 2001; WANG et al., 2001)

Em humanos, o glicerol participa na termo-regulação do corpo, resistência a altas temperaturas, na resistência dos músculos em atividades físicas (WAGNER, 1999) e na resposta neural da variação da glicemia (YANG et al., 1999). Também, o glicerol encontra-se relacionado com diagnóstico de enfermidades, como ser as desordens no metabolismo de carboidratos, e em tratamentos terapêuticos, incluindo tratamento de edemas, controle da pressão intra-cranial e ocular e como agente purgativo (OHNISHI et al., 1999).

O glicerol na sua forma pura apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e em clorofórmio. Algumas de suas características físico-químicas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do glicerol (OECD SIDS, 2002)

Propriedade	Valor/Expressão
Forma física	Líquido
Pureza*	95 – 99,5 %
Densidade (20 °C)	1,26 kg/m ³
Viscosidade (20 °C)	1410 mPa
Ponto de fusão	18 °C
Ponto de ebulição (1013 hPa)	290 °C
Ponto de inflamação	160 °C
Calor específico (25 °C)	2,435 J/g
Calor de evaporação 55 °C	88,12 J/mol
Condutividade térmica	0,28 W/(m.K)
Calor de formação	667,8 KJ/mol
Tensão superficial (20 °C)	63,4 mN/m
pH (solução)	Neutra

*água como impurezas com pequenas traças

Devido às suas características físicas e químicas e ao fato de ser inócuo, o glicerol apresenta diferentes aplicações. Dependendo do setor industrial, as aplicações tecnológicas do glicerol são variadas. Em laboratórios, o glicerol é utilizado como agente crioprotetor de espermatozoides, tecidos, microrganismos, enzimas e ácidos nucleicos (TSURUTA et al., 1992; BRISSON et al, 2001; HUBÁLEK, 2003). É utilizado na elaboração de xaropes, ungüentos e emolientes. A Tabela 2 apresenta algumas das aplicações de glicerol por alguns setores industriais. Apesar de o glicerol apresentar estas aplicações, a sua produção está aumentando significativamente, em função do excedente gerado principalmente na obtenção de

biodiesel, o que está sendo bastante estimulado nos últimos anos (YONG et al., 2001; THOMPSON; HE, 2006)

Tabela 2. Aplicações do glicerol no setor industrial (OECD SIDS, 2002)

Uso final	Consumo (%)	Aplicações específicas
Cosmético/Detergentes/Farmacêutico	28	Excipientes e formulação
Poligliceróis	12	Intermediário e monômero
Ésteres	13	Intermediário
Alimentares e bebidas	8	Aditivos
Tabaco	3	Umectante
Resinas	7	Intermediário
Filmes de celulose	5	Intermediário
Revenda	14	
Outros	10	

Atualmente, as pesquisas mais importantes na utilização biotecnológica do glicerol gerado da produção de biodiesel descrevem sobre a produção de intermediários de plásticos como o 1,2-propanodiol e 1,3-propanodiol, por processos fermentativos. Novas alternativas biotecnológicas estão sendo estimuladas para contribuir na redução do acúmulo de glicerol (ITO et al., 2005; GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2006; ZHAO; CHEN; YAO, 2006; CHENG et al., 2007)

2.1.2 Processo para obtenção e tratamento do glicerol bruto

A preocupação atual pela redução da poluição local e global e a crise energética têm estimulado o mercado mundial de biocombustíveis. A economia global mantém-se em crescimento e a demanda por energia limpa e recursos renováveis encontra-se em contínuo aumento (BILGEN et al., 2006). Dentro deste contexto, o glicerol constitui o maior resíduo gerado no processo de produção do biodiesel via esterificação de ácidos graxos vegetais com álcool.

No Brasil, a produção de biodiesel está aumentando consideravelmente e a quantidade de glicerol bruto gerado encontra-se em crescimento exponencial, representando um possível problema brasileiro, onde a busca de novas soluções para sua utilização será de fundamental importância (FRIEDRICH, 2004; PNPB, 2006; MME, 2007; BIODIESELBRASIL, 2007). A Figura 1 apresenta a projeção da produção de biodiesel no Brasil até o ano 2010, período onde deverá ser obrigatória a incorporação de 5% v/v de biodiesel ao diesel comum (MME, 2006).

Figura 1- Projeção da produção de biodiesel no Brasil (MME, 2006)

Segundo os dados, a estimativa da produção de glicerol bruto ao final do ano 2010 é de aproximadamente 330 milhões de litros, representando uma quantidade extremamente significativa.

O glicerol pode ser obtido mediante reação de saponificação de ácidos graxos (óleos, azeites ou sebo) com hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio para a obtenção de sabões, como co-produto da fabricação de biodiesel e em menor proporção, mediante síntese microbiana (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Dentro deste contexto, o glicerol constitui o maior resíduo gerado no processo de produção do biodiesel via esterificação de ácidos graxos vegetais ou gordura animal com

álcool (metanol ou etanol) para produzir ésteres e glicerol na presença de catalisadores (KOH ou NaOH). A equação global de transesterificação é apresentada na Figura 2, onde são necessários três moles de álcool por cada mol de triglicerídeo utilizado.

Figura 2 - (a) Reação global e (b) Reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos. R₁, R₂, R₃ e R representam grupos alquilas.

Devido à reversibilidade das reações, um excesso de álcool aumenta o rendimento de ésteres por deslocamento da reação para a formação dos produtos, ao mesmo tempo, permitindo a separação do glicerol formado.

Conforme a Figura 3, o processo industrial para a obtenção de glicerol, junto com o biodiesel, inicia-se com o pré-tratamento da matéria prima para a obtenção de óleo ou gordura animal.

Figura 3 - Fluxograma de produção de biodiesel e tratamento de purificação do glicerol.

Após a fase de transesterificação com etanol ou metanol, obtém-se uma massa reacional final que é constituída por duas fases que são separáveis por decantação ou centrifugação. A fase mais “pesada” é composta de glicerina bruta, impregnada dos excessos utilizados de álcool, de água, e de impurezas inerentes à matéria prima e catalisador (OOI et al., 2004). A purificação dos ésteres ocorre pelo processo de centrifugação e desumidificação resultando no produto conhecido como biodiesel.

O valor do glicerol bruto obtido deste processo encontra-se entre 0,2 a 0,4 R\$/kg¹. Este baixo valor é atribuído ao conteúdo de aproximadamente 30 % (p/p) de impurezas (OOI et al., 2004).

O glicerol bruto apresenta-se na forma de líquido viscoso pardo escuro, que contém quantidades variáveis de sabão, álcool (metanol ou etanol), monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros e água (YONG et al., 2001). A porcentagem de glicerol na mistura varia entre 40 a 70 % (p/p), sendo a maior parte das impurezas o sabão formado pela reação dos ácidos graxos livres com excesso de catalisador (saponificação). Dessa forma, o aspecto do glicerol bruto encontra-se estreitamente relacionado ao conteúdo de sabão e dos sais precipitados durante o processo de tratamento, que proporciona aparência de viscoso e escuro. Para reduzir o sabão gerado, recomenda-se conduzir a reação de transesterificação com matérias primas (triglicerídeos) com baixo conteúdo em ácidos graxos livres e água, ao mesmo tempo de reduzir a quantidade de catalisador (YONG et al., 2001).

Independentemente do método utilizado para a produção de biodiesel, a mistura residual resultante é submetido ao processo de acidulação com ácido concentrado (HCl, H₂SO₄, ou H₃PO₄) para a separação de glicerol e ácidos graxos do sabão (Figura 3). No entanto, a maior parte dos processos de tratamento de glicerol é conduzida utilizando HCl , H₂SO₄, ou H₃PO₄ . Durante a acidulação, forma-se certa quantidade de sal (reação do ácido inorgânico com íon do sabão) que se deposita na fase inferior de um líquido de três fases, estando à fase superior constituída pelos ácidos graxos livres, e a fase intermédia composta por glicerol e álcool.

¹ Informação fornecida por Eng. Rodolfo Fiorilo. Daffer Química Ltda. (Guarulhos), dez. 2007

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel (THOMPSON; HE, 2006). No entanto, a procura pela glicerina purificada é muito maior, devida ao seu valor econômico. A aplicação do glicerol na indústria está condicionada ao grau de pureza, que deve ser igual ou superior a 95% (OECD-SIDS, 2002).

A utilização de glicerol proveniente da fabricação de biodiesel em processos microbianos é uma alternativa de grande importância, entretanto, o principal problema para sua utilização em processos fermentativos está relacionado à alta concentração de sais de cloreto presentes (10-15 % p/p), sendo um fator limitante para o crescimento de alguns microrganismos (LAGES; SILVA-GRAÇA; LAGES, 1999; ITO et al., 2005; THOMPSON; HE, 2006).

Tabela 3- Composição do glicerol bruto obtido durante a produção de biodiesel em função de diferentes matérias primas (THOMPSON; HE, 2006)

		Matéria-prima					
Composição		Mostarda*	Mostarda**	Canola	Soja	Crambe	ROV
Ppm	Ca	11,7	23,0	19,7	11,0	163,3	ND
	K	ND	ND	ND	ND	216,7	ND
	Mg	3,9	6,6	5,4	6,8	126,7	0,4
	P	25,3	48,0	58,7	53,0	136,7	12,0
	S	21,0	16,0	14,0	ND	128,0	19,0
	Na	1,17	1,23	1,07	1,2	1,10	1,4
% (p/p)	C	24,0	24,3	26,3	26,0	24,0	37,7
	N	0,04	0,04	0,05	0,04	0,06	0,12

* Ida Gold, ** Pac Gold, ROV: resíduos de óleo vegetal(óleo usado), ND: não detectado

Por outro lado, de acordo com a Tabela 3, o glicerol bruto contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, e que são factíveis de serem utilizados por microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos.

2.1.3 Aspectos econômicos

O excesso de glicerol proveniente da produção de biodiesel associado à baixa demanda mundial (0,5 bilhões t/ano) e baixo custo, projetam um desequilíbrio econômico nas indústrias oleoquímicas e de refino de glicerol, ao tempo de pôr em risco a sustentabilidade econômica de usinas de biodiesel no mundo (YAZDANI; GONZÁLEZ, 2007; HGCA, 2007). No Brasil, a maioria das plantas industriais de biodiesel não valoriza efetivamente o glicerol. A projeção do volume de glicerol no país para o ano 2010 é de 330 milhões e as perspectivas, nesse sentido, não são auspiciosas, devido a que poucas apresentam planos futuros para sua conversão em produtos de maior valor agregado (MME, 2006; OLIVEIRA, 2008).

O uso intensivo deste co-produto é essencial para a sustentabilidade econômica da indústria de biodiesel no país. A queda brusca do preço do glicerol no cenário internacional nos últimos 5 anos tem obrigado à paralisação da produção da glicerina sintética a partir de propileno (YAZDANI; GONZÁLEZ, 2007). O excesso de volume de glicerol, o alto preço do propileno e as vantagens de produzir compostos derivados da indústria petroquímica de maior valor, conspiraram para o severo declínio das indústrias de glicerina sintética (HGCA, 2007).

Nos Estados Unidos, o valor do glicerol diminuiu de 1048 R\$/t em 2004 para aproximadamente 125 R\$/t no ano 2006 (YAZDANI; GONZÁLEZ, 2007). No Brasil, atualmente o preço FOB (Free on Board) do glicerol bruto varia de 200 a 400 R\$/t,

sendo o valor do glicerol loiro² (parcialmente tratado para remoção de impurezas) de 600 a 800 R\$/t. Estima-se que na próxima década, sempre que se mantenha a tendência favorável para o biodiesel, o preço de glicerol bruto será próximo de R\$ 0 por tonelada (BIODIESELBRASIL, 2007).

Considerando a situação e a projeção para os próximos anos, a utilização do glicerol como substrato para fermentação poderá torna-se vantajoso em relação ao preço de outros resíduos tradicionalmente utilizados como fonte de carbono para a obtenção de bioprodutos (BIODIESELBRASIL, 2007; PCB, 2006). Por exemplo, o preço do melaço de cana de açúcar no mercado internacional varia entre os 120 – 170 R\$/t, outro exemplo corresponde ao valor do bagaço de cana que oscila 9,5 e 24 R\$/t. Neste último caso, o bagaço deve ser submetido a tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos para disponibilizar a glicose, o que elevaria o preço final do substrato (SARROUH et al., 2007). A produção industrial de biomoléculas por fermentação de glicerol economizaria custos de processos tradicionais que requerem etapas de elevado consumo energético para extração e acondicionamento do substrato (sacarose de cana de açúcar ou glicose de amido de milho).

O grande desafio no Brasil será incentivar as pesquisas biotecnológicas que, timidamente, vem sendo desenvolvidas no país. Além disso, facilitar a imediata transferência tecnológica dessas descobertas na própria usina de biodiesel, permitindo reduzir custos de transporte para converter o biodiesel em um biocombustível economicamente viável (MNE, 2006; OLIVEIRA, 2006; BIODIESELBRASIL, 2007).

² Informação fornecida Eng. Rodolfo Fiorilo. Daffer Química Ltda. (Guarulhos), março 2008

2.1.4 Assimilação, metabolismo e conversão microbiológica do glicerol

O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas (GANCEDO; GANCEDO, 1968; DILLIS et al., 1980; TANI; YAMADA, 1987) para a obtenção de energia metabólica (NEVOIGT, 1997; LAGES; SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999), como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (ANSELL et al., 1997).

Vários estudos foram desenvolvidos visando à utilização de glicerol como fonte de carbono por microrganismos, especialmente por bactérias. Muitos destes apontam principalmente a mecanismos de assimilação de glicerol por estes microrganismos para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (PAPANIKOLAU et al., 2002; ITO et al., 2005; ZHAO; CHEN; YAO, 2006; RYMOWICZ 2006; CHENG et al., 2007). Por outro lado, na literatura consultada, muito pouco ainda foi encontrado sobre a utilização de glicerol por leveduras.

O transporte do glicerol através da membrana celular constitui a primeira etapa para o seu metabolismo por microrganismos. Gancedo e Gancedo (1968) estudaram o metabolismo do glicerol em *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* sob condições aeróbicas e observaram que a levedura *C.utilis* apresentou maior velocidade de crescimento nestas condições. Este fato foi atribuído à maior facilidade de difusão do glicerol através da membrana plasmática nesta levedura.

Por muitos anos, o glicerol foi considerado uma molécula lipossolúvel capaz de atravessar a membrana plasmática somente por simples difusão em certas cepas de microrganismos (HEREDIA et al., 1968; GANCEDO; GANCEDO, 1968). No entanto, esses estudos foram inconsistentes com o fato de que leveduras retêm e

acumulam glicerol dentro da célula (BLOMBERG; ADLER, 1989). Para explicar esta retenção, alguns autores atribuíram este fato a uma redução da permeabilidade da membrana devido a variações na composição de lipídeos, quando as leveduras cresciam sob condições de baixa atividade de água, ou simplesmente pela fosforilação do glicerol que dificulta seu passo através da membrana (GANCEDO, GANCEDO, 1968; WATANABE; TAKAKUWA, 1987). Outros, por sua vez, defenderam a teoria da existência de mecanismos de transporte ativo para a excreção de glicerol, onde proteínas específicas que controlam a excreção ou retenção, por exemplo, a FPS1p, dependem das condições osmóticas ou hiperosmóticas nas quais estejam expostas as leveduras. (LUCAS et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2003).

De uma forma geral, a assimilação de glicerol por parte dos microrganismos envolve o transporte passivo (GANCEDO; GANCEDO, 1968; DILLIS et al., 1980; VOEGELE; SWEET; BOOS., 1993; LAGES; SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999) e transporte ativo (SILVA-GRAÇA; LUCAS, 1999; NEVES; LAGES; LUCAS, 2004) através da membrana plasmática.

O transporte passivo inclui a difusão simples (permeação não específica) e a difusão facilitada mediada por proteínas localizadas nas camadas mais internas da membrana plasmática (MIP), as permeases. A difusão simples, sendo ATP não dependente, requer um gradiente de concentração para o transporte do substrato através da membrana. Conseqüentemente, a concentração do substrato no interior da célula não supera aquela encontrada no meio de cultura (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estudos desenvolvidos por Luyten et al. (1995), assinalaram a existência de permeases FPS1, específicas para transporte de glicerol. LAGES, SILVA-GRAÇA e LUCAS (1999) por sua vez,

confirmaram a presença da FPS1 e descreveram a permease YFL054c que atua somente sobre estresse osmótico de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

O glicerol é um dos poucos substratos que atravessa a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas. Em bactérias como *Escherichia coli*, a proteína do tipo poro-canal-G1pF atua por sensibilidade mecânica sem gasto energético na presença de glicerol. Este facilitador permite a assimilação, além de glicerol, de pequenas moléculas de polihidroxi álcoois, uréia e glicina, mas exclui moléculas carregadas como gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Recentemente, foram descritos três genes responsáveis pela assimilação e regulação do conteúdo intercelular de glicerol em *Saccharomyces cerevisiae*, o GUP1 e GUP2 (HOLST et al., 2000) e FPS1 (LUYTEN et al., 1995), associados diretamente com o transporte facilitado e que são expresso conforme estímulos provocados nas células, como o estresse osmótico.

Por outro lado, mecanismos de transporte ativo simporte glicerol/H⁺ e simporte glicerol/Na⁺ (dependentes de ATP) foram descritos em numerosas espécies de leveduras, entre elas *Debaryomyces hansenii*, *Pichia sorbitophila*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces rouxii* (LAGES; LUCAS, 1995; LUCAS et al., 1999; NEVES et al. 2004). Tanto as acumulações de glicerol por estresse, como a existência de mecanismos ativos, são comuns em grande variedade de leveduras (LAGES et al., 1997).

Neves et al. (2004), exploraram a semelhança existente entre o mecanismo de transporte e metabolismo de glicerol em *Saccharomyces cerevisiae* e outras espécies de leveduras de importância biomédica e industrial, como *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia angusta*,

Candida sorbitophila e *Candida albicans*. A Figura 4 resume os principais mecanismos de transporte encontrados na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

FIGURA 4 - Tipos de transporte para a assimilação de glicerol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde, FPS1 e YFL054c são proteínas de transporte, GUT1 e GUT2 são genes para expressão de enzimas de assimilação de glicerol (baseado em NEVES; LAGES; LUCAS, 2004; NEVES, 2006).

Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática pelos possíveis mecanismos, o glicerol pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas independentes, apresentado na Figura 5. Uma das rotas, provavelmente a principal para a assimilação de glicerol por leveduras, consiste na fosforilação do glicerol pela enzima glicerol-quinase para formar glicerol-3-fosfato, que é reduzido a dihidroxiacetona fosfato pela enzima mitocondrial glicerol fosfo-ubiquinona oxidoreductase (FAD dependente) (GANCEDO et al., 1968; GANCEDO; SERRANO, 1989). Várias espécies de leveduras do gênero *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Turolopsis* assimilam glicerol através da enzima glicerol-quinase na via fosforilativa (TANI; YAMADA, 1987) Estudos demonstraram que, os genes que controlam a

síntese das enzimas glicerol-quinase e fosfo-ubiquinona oxidoredutase são GUT1 e GUT2, respectivamente (SPRAGUE; CRONAN, 1977; SUTHERLAND et al., 1997; LAGES; LUCAS, 1997; GRAUSLUND et al., 1999; NEVES et al., 2004). A expressão dessas enzimas é reprimida durante o crescimento celular em substratos fermentescíveis como glicose, mas desregulado quando glicerol ou etanol é utilizado como a principal fonte de carbono (GRAUSLUND; RONNOW, 2000).

O crescimento de microrganismos em fontes de carbono alternativas aos carboidratos, como L-malato, acetato, ou glicerol, requer a capacidade de sintetizar hexoses (gluconeogênese) necessárias para a produção de mucopeptídeos da parede celular, armazenagem de glicogênio, e outros compostos derivados de hexoses, como as pentoses, envolvidos na bio-síntese de ácidos nucleicos (WALKER, 1998; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

De acordo com Walker (1998), o fluxo líquido de carbono para a formação de hexoses requer elevado gasto energético (processos aeróbicos). Algumas das reações dessa via não são irreversíveis e necessitam de enzimas diferentes daquelas da via glicolítica, como por exemplo, a frutose-1,6-difosfato 1-fosfohidrolase que catalisa a defosforilação da frutose-1,6-difosfato a frutose-6-fosfato e fósforo inorgânico. A segunda reação de importância implica a defosforilação da glicose-6-fosfato mediante a glicose-6-fosfatase para obter D-glicose livre (WALKER, 1998; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Outra possível via catabólica corresponde à oxidação de glicerol e conseqüente formação de dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase. Após, a dihidroxiacetona é fosforilada a dihidroxiacetona fosfato pela enzima dihidroxiacetona quinase dependente de Adenosina Trifosfato (ATP). Gancedo e Gancedo (1968) reportaram que leveduras como *Schizosaccharomyces pombe*,

oxidam glicerol mediante essa via sob condições de “stress” osmótico. Por outro lado algumas espécies do gênero *Hansenula*, por exemplo *Hansenula polymorpha*, assimilam glicerol pela via fosforilativa e oxidativa (TANI; YAMADA, 1987).

Figura 5 - Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos e seus possíveis produtos (Adaptado de: GANCEDO; GANCEDO, 1968; HAUGE; KING; CHELDELIN, 1955; XIU et al., 2007)

A dihidroxiacetona fosfato é considerada uma importante molécula intermediária para a gliconeogênese, assim como para a obtenção de vários compostos através das vias oxidativas, incluindo, ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, etanol e outros compostos de interesse comercial (BARBIRATO et al., 1995). Também, Hauge, King e Cheldelin (1955), fazem referência sobre a capacidade de algumas bactérias, entre elas *Acetobacter suboxydans*, de oxidar a molécula de dihidroxiacetona fosfato pela via pentose-fosfato, incrementando o número de bioprodutos possíveis de serem obtidos por via biotecnológica a partir de glicerol.

Em espécies de leveduras do gênero *Yarrowia sp.*, e em bactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* and *Bacillus welchii* (DABROCK et al., 1992; BARBIRATO et al., 1997; NAKAMURA et al., 2000; GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2006; ZHAO; CHEN; YAO, 2006; CHENG et al., 2007), observa-se que sob condições de anaerobiose, o glicerol sofre desidratação pela enzima glicerol desidratase para produzir 3-dihidroxi propionaldeído. Posteriormente, este intermediário é transformado pela enzima NADH dependente 1,3-propanodiol oxido-reductase para gerar 1,3-propanodiol, principal intermediário para produção de polímeros, resinas e aditivos de importantes aplicações industriais (GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2005b; ZHAO; CHEN; YAO, 2006).

Uma vez que o glicerol é assimilado no interior da célula, numerosos compostos são produzidos como consequência do seu metabolismo. Entre os metabólitos que cumprem funções primordiais no crescimento e reprodução das células microbianas destacam-se os ribonucleotídeos.

2.1.5 Principais fatores que influenciam o crescimento celular de leveduras

A definição da composição do meio, disponibilidade de oxigênio, pH e temperatura, dentre outros fatores, são fundamentais para a obtenção econômica de células e biomoléculas em escala de laboratório, e importantes na viabilização de processos biotecnológicos a escala industrial (SERIO et al., 2003).

Em leveduras, fatores de crescimento como vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos, micronutrientes, nucleosídeos e nucleotídeos são requeridos em pequenas quantidades para reações metabólicas e síntese de compostos estruturais das células. Estes compostos podem ser de requerimento absoluto para o crescimento celular em algumas leveduras ou atuarem como fatores estimulantes que proporcionam uma maior velocidade de crescimento celular (WALTER, 1998).

O extrato de levedura e extrato de farelo de arroz são substâncias complexas, relativamente de baixo custo, que fornecem proteínas, aminoácidos livres, vitaminas do complexo B e E e minerais para a obtenção de células e produção de biomoléculas em processos biotecnológicos (CANETTIERI; SILVA E ALMEIDA; FELIPE, 2002; SILVA et al, 2004; PARRADO et al., 2006).

Leveduras do gênero *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida* e *Hansenula* apresentam variados requerimentos de fatores de crescimento celular. Entretanto, entre tanto, a levedura *H. anomala* não requer vitaminas pré-formadas para o crescimento celular, sendo este fator utilizado como parâmetro para diferenciação de espécies neste gênero (WALKER, 1998).

O pH é um fator que influencia a síntese enzimática, transporte, assimilação de diferentes substratos e formação de moléculas no interior das células de microrganismos. As permeases, proteínas localizadas na membrana plasmática, requerem do gradiente de potencial elétrico da trans-membrana e do gradiente de

prótons entre o meio e o interior da célula, criada pela ATP transferase, para o transporte de certos nutrientes (STAMBUK, 2000). O controle e ajuste do pH em processos biotecnológicos são fundamentais para estabelecer um balanço de oxido-redução necessário para o crescimento celular de microrganismos (MOAT; FOSTER; SPECTOR; 2002).

A temperatura é um dos mais importantes parâmetros físicos que influenciam o crescimento de leveduras. A faixa de temperatura ótima de crescimento para a maior parte das leveduras encontra-se entre os 20 e 30 °C, entretanto, algumas leveduras, como por exemplo, *Candida utilis*, *Candida batistae*, *Candida tropicales* e *Hansenula anomala*, a temperatura de crescimento limite encontra-se próximo a 40 °C., por outro lado em algumas leveduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Wickerhamiella cacticola* esse valor é superior a 40 °C (BELEM; LEE, 1999; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002; NCYC, 2007). Condições adversas de temperatura afetam a expressão de genes que codificam a síntese das enzimas responsáveis pelo catabolismo de fontes de carbono, por exemplo, o glicerol (BARBIRATO; SOUCAILLE; BORIES, 1996). Huang et al. (1997), em estudos *in vitro* com a enzima glicerol-quinase, principal responsável pelo catabolismo oxidativo do glicerol em bactérias e leveduras, demonstraram uma redução de 50 % na atividade enzimática na temperatura de 45 °C ,sendo completamente inativa a 60 °C.

Dentre os fatores que influenciam a conversão de glicerol em biomassa, o fornecimento de oxigênio ao meio de cultivo é provavelmente o de maior importância, uma vez que a presença de elevadas concentrações de oxigênio dissolvido permite a sobre-expressão dos genes responsáveis pela produção das enzimas glicerol desidrogenase e glicerol-quinase, envolvidas no catabolismo do glicerol em leveduras (GANCEDO; GANCEDO, 1968). Por outro lado, a presença

de oxigênio tem relação com a produção de energia na forma de ATP durante a fosforilação oxidativa e com a re-oxidação da coenzima NADH_2 (WALKER, 1998). Também, uma elevada transferência oxigênio favorece a formação de hexoses, pentoses e ácidos graxos poli-insaturados a partir do metabolismo do glicerol. Estas moléculas são requeridas para a síntese de lipídeos que são compostos constituintes da parede celular, da membrana citoplasmática e mitocondrial, e também para a síntese de esterol e ácidos nucléicos (GANCEDO; SERRANO, 1989; WALKER, 1998). O suprimento limitado de oxigênio durante a fermentação do glicerol favorece a produção de bioprodutos, como por exemplo, 1,3-propanodiol, etanol e ácido acético (GONZÁLEZ-PAJUELO et al., 2005b; ZHAO; CHEN; YAO, 2006; XIU et al., 2007). Condições experimentais que proporcionam uma maior disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo são fundamentais para evitar desvios do metabolismo respiratório do glicerol e conseqüentemente, a conversão de substrato e produtividade em células (GANCEDO; GANCEDO, 1998).

O conhecimento destes fatores e o estudo dos efeitos combinados sobre a produção de células e biomoléculas são fundamentais para estabelecer condições ótimas de operação de diferentes processos biotecnológicos que visam à obtenção destes produtos (WALKER, 1998).

2.2 RIBONUCLEOTÍDEOS

2.2.1 Estrutura e função

No mercado mundial de aditivos, numerosos compostos naturais são utilizados como componentes alimentícios, agentes nutracêuticos, precursores para produtos farmacêuticos e componentes nutricionais de ração animal. Entre as moléculas bioativas, os ribonucleotídeos receberam maior atenção nas últimas décadas devido às suas propriedades funcionais e a sua elevada participação no comércio mundial, com vendas que superam os 1,2 bilhões de dólares por ano (REVILLION; BRANDELLI; AYUB, 2000).

Os nucleotídeos são ésteres fosfóricos dos nucleosídeos, presentes na molécula de RNA (Figura 6), como adenosina, guanosina, citidina e uridina.

FIGURA 6- Estrutura de: **a.** 5'-Adenina monofosfato; **b.** bases nitrogenadas componentes dos diferentes nucleotídeos.

A estrutura dos nucleotídeos é dividida em três principais grupos: bases nitrogenadas (purina ou pirimidina), ribose (α -D-ribofuranose) e o grupo fosfato. As bases nitrogenadas exercem uma função importante e determinam as propriedades biológicas da molécula (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

A formação destas moléculas bioativas inicia-se no citoplasma com o precursor 5'-fosforibosil-1-pirofosfato, seguida por numerosas reações intermédias até a obtenção de Guanosina monofosfato, Adenosina monofosfato e Xantosina monofosfato, que por sua vez, podem interconverter-se em outros nucleotídeos ou núcleosídeos (KUKINAWA, 1996).

Os nucleotídeos possuem numerosas funções metabólicas, uma vez que são componentes principais do ácido ribonucléico (RNA) e ácido desoxirribonucléico (DNA), participam na mediação da energia metabólica, na transdução do sinal codificado dos genes e na regulação geral do crescimento (KUNINAKA, 1996).

Estas biomoléculas apresentam também importantes efeitos terapêuticos e imunoestimuladores contra infecções bacterianas e virais (SCHALLER et al., 2004). Podem ser extraídas de microrganismos após autólise da membrana plasmática e hidrólise parcial da molécula de RNA (DEMAIN; BURG; HENDLIN, 1965; CRUEGUER; CRUEGUER, 1990; KUNINAKA, 1996).

Extratos de leveduras, ricos em ribonucleotídeos, em especial 5'-inosina monofosfato (IMP), 5'-guanosina monofosfato (GMP) e glutamato monossódico (GMS), são tradicionalmente conhecidos por realçar sabores e produzir efeitos de suavidade em sopas, molhos, ervas aromáticas e certos tipos de alimentos, assim como da eliminação de algumas características poucos desejáveis como, o gosto metálico de alimentos enlatados (YAMAGUCHI; NINOMIYA, 2000; KUNINAKA, 1996; NORDAM et al., 2006).

A prazerosa sensação ao ingerir certos alimentos é promovida por glutamato e 5'-ribonucleotídeos naturalmente presentes em queijos, frutos secos, peixe, carnes e legumes. Esta característica foi denominada no Japão como "Unami" e descrito por Kikunae Ikeda em 1908 como "um sabor" que complementa o doce, salgado,

amargo e ácido (YAMAGUCHI; NINOMIYA, 2000; CHANDRASHEKAR et al., 2006).

Recentemente, estudos moleculares confirmaram a existência do sabor Unami e mostraram que, contrário à crença popular, não existe um “mapa” da língua com sítios específicos de estímulo para cada sabor. Os 5 sabores estão presentes em toda a área da língua (YAMAGUCHI; NINOMIYA, 2000). Unami, assim como os outros sabores, estimulam células específicas do bulbo receptor, conectadas a uma fibra do nervo ligada ao cérebro (CHANDRASHEKAR et al., 2006)

Existem três substâncias potenciadoras de aromas produzidas industrialmente e disponíveis atualmente no mercado mundial, entre elas, o glutamato monossódico (MSG), sal dissódico de inosina monofosfato (IMP) e sal dissódico de guanosina monofosfato (GMP). Os sais dissódicos de IMP e GMP em combinação com MSG alcançaram reconhecimento mundial como novos e excelentes potenciadores de aromas (KUNINAKA, 1996).

Também, a indústria farmacêutica explorou as propriedades bioativas destes compostos incorporando o RNA, ribonucleotídeos, nucleosídeos e compostos derivados dos mesmos, como parte dos seus produtos devido ao fato de apresentarem destacados efeitos terapêuticos e imunoestimuladores em humanos (Tabela 4). A grande vantagem da aplicação dos nucleotídeos na indústria farmacêutica se deve basicamente aos baixos efeitos colaterais observados em relação aos medicamentos tradicionais (SCHALLER et al., 2006)

Vários estudos comprovam a efetividade dos ribonucleotídeos e nucleosídeos como potentes agentes antivirais (SLOBODIANIK, 2003; SCHALLER et al., 2006). Uma vez dentro da célula, o vírus replica seu ácido nucléico utilizando enzimas específicas ou enzimas do próprio hospedeiro. Pelo fato da replicação do ácido nucléico viral ser promovida por enzimas específicas e ser essencial para a

propagação do vírus, grande parte da quimioterapia antiviral baseia-se na inibição das enzimas de replicação (SIMONI, 2003).

TABELA 4. Aplicações do RNA e nucleotídeos na área médica (SASAKI et al.,2005)

Administração oral	Crescimento e maturação do trato digestivo em crianças Proteção contra infecção e contra complicações (reduz período hospitalar) Aumento da resposta do sistema imune.
Administração intravenosa	Melhora o metabolismo de proteínas Aumento da capacidade metabólica das células do fígado. Proteção da membrana mucosa intestinal Melhoramento da função imune (proteção contra infecção, supressão ou rejeição após trasplante de órgãos)
Efeitos <i>in vitro</i> (aplicação <i>in vitro</i> para pesquisas experimentais básicas em medicina)	Cultivo de células de fígado Cultivo de células tumorais Crescimento de macrófagos

Um importante exemplo é a nova classe de medicamentos anti-retrovirais presentes no coquetel anti-aids, pertencente à classe de análogos de nucleosídeos naturais. Estes compostos inibem a replicação do ácido nucléico através da inibição das enzimas das vias metabólicas das purinas ou pirimidinas ou inibição das polimerases utilizadas na replicação do ácido nucléico viral. Além disso, alguns análogos podem ser incorporados ao ácido nucléico e bloquear sua síntese ou alterar sua função. Novos antivirais, análogos aos nucleosídeos, são capazes de inibir especificamente as enzimas codificadas pelos vírus, com inibição mínima das enzimas análogas das células hospedeiras (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1995; SIMONI, 2003).

Os ribonucleotídeos, estruturalmente similares aos ribonucleosídeos, uma vez consumidos ou introduzidos na corrente sanguínea, provavelmente são

interconvertidos em nucleosídeos e exercendo seus destacados efeitos terapêuticos (SHALLER et al., 2006). Baseados nestas propriedades, novas moléculas bioativas são atualmente mais indicadas na proteção contra infecções bacterianas e virais como *Herpes simplex* e *Herpes zoster* em humanos (CRUEGER; CRUEGER, 1990) e na elaboração de medicamentos contra doenças circulatórias, reumatismo, neuralgias e recuperação funcional (SLOBODIANIK, 2003; SCHALLER et al., 2006).

Este interesse tem sido fortemente estimulado pelas indústrias farmacêuticas para a procura de novos tratamentos utilizando estas biomoléculas. Atualmente, não se conhece com exatidão o mecanismo de aumento da resposta imune a diferentes antígenos. Entretanto, estudos com pacientes recém nascidos demonstraram que, por exemplo, a suplementação de leite animal com 72 mg/L de ribonucleotídeos (concentração similar encontrada no leite materno) potencializa a resposta imune a diferentes antígenos (difteria, vírus da poliomielite, *Haemophilus influenzae* tipo b e tóxico de tétanos) (SCHALLER et al., 2004), aumentando consideravelmente, o número de linfócitos T (produtores de anticorpos) (BUCK et al., 2004).

Outras propriedades destas moléculas incluem a participação do metabolismo de lipoproteínas e na síntese de apolipoproteína (em crianças), maturação do trato intestinal e recuperação da parede após de uma infecção, aumento da população de bifidobacterias (probióticos) e a redução de espécies da família *Enterobacteriaceae* (SHALLER, 2006).

Os ribonucleotídeos também mostram ser moduladores da resposta celular e humoral em animais, aumentando a capacidade modular a sub-população de linfócitos, citocinas e imunoglobulinas intestinais (SCHALLER et al., 2006).

Devido a estas propriedades e ao interesse comercial das mesmas, novas alternativas para a produção biotecnológica de ribonucleotídeos vem sendo estimuladas e avaliadas (BELEM; LEE,1999, LEE et al. 2002).

2.2.2 Aspectos da produção biotecnológica de ribonucleotídeos

Os ribonucleotídeos são componentes básicos dos organismos vivos e por sua natureza, podem ser produzidos industrialmente por processos envolvendo microrganismos. Estes processos incluem a bioconversão microbiana de matérias primas de baixo custo com um mínimo efeito sobre o meio ambiente, uma vantagem comparativa em relação a processos químicos tradicionais.

Varias espécies foram reportadas como produtoras de quantidades significativas de ribonucleotídeos e seus derivados. Entre elas destacam-se, *Candida utilis*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Streptomyces aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus glutamicus*, *Penicillium citrinum*, *Methylobacter acidophilus*, e *Escherichia coli*. (DEMAIN; BURG; HENDLIN, 1965; KUNINAKA, 1996; BELEM et al.,1997; KIM; LEE, B.; LEE, J., 2002; REVILLION et al., 2003, OGRODOWSKI, 2006).

Os ribonucleotídeos como também, polissacarídeos e oligossacarídeos, podem ser encontrados na biomassa obtida através de processos que utilizam leveduras e outros microrganismos.

Em leveduras, a fração de ácido nucléico consiste principalmente de ácido ribonucléico (RNA). O conteúdo de RNA em espécies de *Saccharomyces* pode alcançar concentrações até 8 % p/p massa seca, e em cepas mutantes, são alcançadas concentrações de até 13 % p/p massa seca (KUNINAKA, 1996).

A produção de RNA está diretamente relacionada com a produção de biomassa (BELEM; LEE, 1999). No entanto, como se trata de um produto, principalmente intracelular, é necessário o uso de técnicas de extração e liberação no meio de cultivo. Em escala laboratorial, os ribonucleotídeos podem ser extraídos por termólise (suspensão de células a 100 °C), plasmólise (exposição de células a alta concentração de sal) e autólise (50 – 80°C). O método mais utilizado para sua extração é a autólise (KIM; LEE B; LEE, J, 2002). Durante este processo, o RNA é degradado por endo-enzimas próprias do microrganismo, principalmente proteases (KUKINAWA, 1996).

Estas enzimas são liberadas mediante o aumento controlado de temperatura e choque osmótico. Condições controladas de pH (6,0-6,5), temperatura (50-55°C) e tempo de contato com a solução tampão (12-48 h) são fatores decisivos para alcançar uma máxima extração dos ribonucleotídeos por de autólise (BELEM; LEE, 1999; KIM; LEE B; LEE, J., 2002). O processo pode ser acelerado também mediante adição de sais e enzimas como protease e peptidases (BELEM; LEE, 1999). Sob condições de hidrólise enzimática controlada utilizando nuclease e fosfodiesterase, 5'-nucleotídeos de guanina, citosina, adenina e uracila são formados. O uso de 5'-ácido adenílico diesterase permite a conversão de adenina 5'-monofosfato (AMP) a IMP (YAMAGUCHI; NINOMIYA, 2000).

Os 5'-ribonucleotídeos podem ser obtidos por fermentação, seguida da extração do RNA e hidrólise química e/ou enzimática do RNA, por combinação da produção fermentativa de inosina ou guanosina e posterior fosforilação química. Também, mediante fermentação para a produção direta de IMP ou fermentação direta para a produção de xantosina-5'-monofosfato (XMP) e sua conversão enzimática para GMP (KUNINAKA, 1996).

A hidrólise química, inicialmente, possibilita a obtenção de todos os ribonucleotídeos componentes do RNA, mas sem nenhuma especificidade. Por outro lado, o tratamento enzimático produz unicamente ribonucleotídeos específicos, sendo este o método principal para a produção de ribonucleotídeos de uso alimentício e farmacêutico (KIM; LEE B; LEE, J., 2002 ; SCHALLER, 2006).

As condições de operação para a hidrólise de RNA para obtenção de ribonucleotídeos dependem da enzima utilizada e do grau de purificação requerido (BENAIGES et al., 1990).

Benaiges et. al. (1990) estudaram as condições operacionais ótimas de hidrólise enzimática de RNA para a produção de ribonucleotídeos. Neste caso, o RNA de leveduras de cervejaria foi obtido através de extração com íon amônio e hidrolisado com fosfodiesterase. Neste estudo, as melhores condições determinadas foram temperatura de a 60°C e pH 7,0, obtendo rendimento satisfatório de ribonucleotídeos em concentração inicial de RNA abaixo de 1,0 g/L e tempo de reação de 1 hora, sendo que, com a concentração inicial de substrato maior que 1,5 g/L ocorreu inibição da hidrolase.

A maior parte dos trabalhos recentemente publicados para a produção de ribonucleotídeos visa utilizar resíduos agroindustriais como fonte de carbono, sendo o soro de queijo o principal substrato estudado (Tabela 5). Belem e Lee (1999) estudaram a fermentação de soro de queijo (15 % p/p) como substrato para produção de biomassa de *Kluyveromyces marxianus var marxianus* ATCC 28244 por batelada alimentada com uma taxa de aeração de 2 vvm, obtendo uma concentração celular máxima de 28,13 g/L, rendimento de 0,58 g/g e produtividade celular de 2 g/L.h.

TABELA 5. Resultados de trabalhos recentemente encontrados para a obtenção de ribonucleotídeos

Referência	Microrganismo	Substrato	Ribonucleotídeos (mg/g)
Belem e Lee, 1999	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>marxianus</i>	Soro de queijo	6,3
Sasaki et al, 2000	<i>Rhodovulum</i> sp. PS88	Sintético	20,0
Kim; Lee, B. ; Lee, J., 2002	<i>Hansenula anomala</i> KCCM 11473	Efluente de tratamento ginseng	28,5
Revillion, Brandelli, Ayub, 2003	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	Soro de queijo	17,2
Ogrodowski e Alegre, 2006	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT4294	Soro de queijo	42,3

Por outro lado, Kim; Lee B e LEE, J (2002) fermentaram efluentes do processamento de ginseng (rico em ginsenoides, açúcares e proteínas) como meio para a produção de ribonucleotídeos obtidos por autólise de *Hansenula anomala* KCM 11473. Após 12 horas de autólise para obtenção de AMP e GMP, e 24 horas para IMP; foram encontradas concentrações de 28,6; 12,6 e 20,4 mg/g de biomassa seca, respectivamente.

Estes estudos demonstraram a potencialidade da utilização de resíduos agro-industriais como fontes de carbono para a produção de ribonucleotídeos e compostos derivados com alto valor agregado.

Na literatura consultada, não foi encontrado nenhum estudo da obtenção de ribonucleotídeos a partir do aproveitamento do glicerol de biodiesel, o que confere ao presente trabalho um caráter inovador. Espera-se que os resultados deste estudo venham a contribuir para a geração de novos conhecimentos e estabelecimentos de processos tecnológicos que visam à utilização de glicerol por leveduras.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais:

- Avaliar o aproveitamento do glicerol proveniente da produção industrial de biodiesel para a obtenção biotecnológica de biomassa e ribonucleotídeos.
- Valorizar a utilização do glicerol como fonte de carbono em processos microbianos visando a sua utilização na obtenção de ingredientes funcionais importantes na indústria de alimentos e farmacêutica.

3.2 Específicos:

- Avaliar a capacidade de crescimento de leveduras em meio contendo glicerol de biodiesel como fonte de carbono;
- Aplicar metodologias adequadas que permitam a melhor extração de ribonucleotídeos.
- Avaliar os principais parâmetros (variáveis) que influenciam o crescimento celular em meio de cultivo contendo glicerol;
- Analisar a cinética de crescimento celular e produção de ribonucleotídeos em meio contendo glicerol da levedura pré-selecionada.
- Estabelecer condições de processo que permitam obter elevados valores de produtividade celular e de ribonucleotídeos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e tratamento do substrato

4.1.1 Glicerol

O glicerol bruto foi obtido diretamente da produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de soja com metanol, e fornecido pela Bioverde Indústria e Comércio de Biocombustíveis Ltda (Taubaté – SP).

4.1.2 Tratamento do glicerol bruto

O glicerol bruto foi submetido a tratamento de acidificação para neutralização do excesso de hidróxido de sódio, utilizado como catalisador no processo de produção de biodiesel; e separação de sabão e outras impurezas contidas no glicerol. Foram determinados os volumes ótimos de três diferentes ácidos concentrados (HCl 36 %, H₂SO₄ 98% e H₃PO₄ 85 %) necessários para o tratamento do glicerol bruto. Para cada 50 mL de glicerol bruto foi adicionado, de forma progressiva, 0,1 mL de ácido concentrado sob agitação constante até a separação de uma fase contendo glicerol e outra com ácidos graxos livres. O líquido contendo ambas as fases foi colocado em funil de separação e decantado por 12 h. Após este período, o glicerol foi separado e analisado o pH e sua concentração final.

O glicerol tratado foi utilizado como substrato na etapa de pré-seleção de leveduras e nas fermentações conforme os planejamentos experimentais aplicados em cada etapa da pesquisa.

4.2 Microrganismos

Dez cepas de leveduras, disponibilizadas por diferentes instituições de pesquisa, foram avaliadas quanto a sua capacidade de crescimento e produção de biomassa a partir de glicerol: *Kluyveromyces marxianus subsp.marxianus*

ATCC 8554, *Kluyveromyces marxianus* var *lactis* CCT 4086, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* CCT 3192, *Kluyveromyces marxianus* UFMG 95270-1, *Candida utilis* CCT 3469, *Candida tropicalis*, *Candida batistae* UFMG 96Y192, *Candida guilliermondii* FTI 20037(*Candida tropicalis*), *Wickerhamiella cacticola* UFMG 96267, *Hansenula anomala* CCT 2648. As cepas foram mantidas a 4 °C e repicadas periodicamente em tubos com agar inclinado contendo: extrato de levedura (3,0 g/L), de extrato de malte (3,0 g/L), bacto peptona (5,0 g/L), dextrose (10 g/L) e agar (20 g/L).

4.3 Inóculo

As células foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio composto de glicerol (10 g/L), extrato de levedura (3 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (2 g/L); KH_2PO_4 (2 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g/L) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,021g/L). O meio inoculado com as células foi mantido sob agitação rotatória de 300 rpm a 30 °C por 24 h.

4.4 Screening de leveduras com destacada capacidade de crescimento celular, produção de ribonucleotídeos e produção de biomoléculas a partir de glicerol

4.4.1 Avaliação do crescimento celular e produção de biomassa

Inicialmente, foi avaliada a capacidade de crescimento das 10 leveduras disponíveis de forma a realizar uma pré-seleção daquelas que apresentassem uma maior capacidade de crescimento em meio contendo glicerol como principal fonte de carbono. As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio semi-sintético contendo: glicerol (30 g/L), KH_2PO_4 (2,0 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (2,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g/L) e extrato de

levedura (1 g/L). Os frascos foram inoculados a partir de uma suspensão celular de forma a obter uma concentração de células inicial de 0,01 g/L. As células foram cultivadas em incubadora com movimento rotatório a 200 rpm e 30°C. Nas primeiras 24 h de cultivo foram avaliadas as concentrações de biomassa e de ribonucleotídeos.

4.4.2 Avaliação da produção de ribonucleotídeos sob diferentes métodos de extração

Para a avaliação do teor de ribonucleotídeos, inicialmente fez-se necessário a extração de ribonucleotídeos do interior das células. Nesta fase, foram avaliados os métodos de autólise celular e de ruptura celular mecânica. Após a extração, os resíduos celulares foram separados por centrifugação (4000 rpm) e o sobrenadante utilizado para a determinação da concentração de ribonucleotídeos.

4.4.2.1 Autólise celular

Para a autólise, uma alíquota de meio de cultivo contendo a suspensão de células foi centrifugada e as células lavadas duas vezes com água destilada. Posteriormente, foram re-suspensas em tampão fosfato 0,1 M a pH 7,4 e incubadas a 55 °C sob agitação rotacional de 200 rpm por 24 h, conforme KIM; LEE, B; LEE, J, (2002).

4.4.2.2 Ruptura celular mecânica

O método de ruptura celular mecânica foi realizado mediante uma mistura na proporção 1:1 de suspensão celular, previamente lavada; e pérolas de vidro, seguida

de agitação em *vortex* por 5 ciclos de 1 min de duração cada ciclo, seguido de resfriamento em banho de gelo por 1 min entre cada ciclo.

4.4.3 Avaliação de produção de etanol e ácidos orgânicos

Foram também avaliadas a produção de biomoléculas de interesse comercial como etanol, ácido cítrico, ácido succínico e ácido acético nos meios de cultivo contendo glicerol após 72 h de fermentação.

4.5 Influência da concentração de extrato de farelo de arroz no crescimento celular das leveduras pré-selecionadas em glicerol

Fontes de nitrogênio de baixo custo são requeridas para sua aplicação no desenvolvimento de processos fermentativos a fim de contribuir para a redução de custo de produção de biomassa e biomoléculas. Por esta razão, foram realizados ensaios para determinar a influência de diferentes concentrações de extrato de farelo de arroz (EFA) no crescimento celular das leveduras pré-selecionadas na primeira etapa deste trabalho (item 4.4).

O extrato de farelo de arroz foi preparado utilizando-se uma concentração de 200 g de farelo de arroz por cada 1 litro de água destilada. Esta suspensão foi autoclavada a 0,5 atm por 15 min (CARVALHO, 2000).

Após resfriamento, o sobrenadante foi separado por centrifugação a 2000 rpm por 30 min e utilizado no meio de cultivo de composição similar ao indicado no item 4.4.1, utilizando-se EFA nas concentrações de 1, 8 e 15 % (v/v) em substituição ao extrato de levedura utilizado no meio de cultivo.

4.6 Avaliação das variáveis de importância para o cultivo de leveduras em glicerol

Após seleção das leveduras com maior capacidade de crescimento em condições fixas de concentração de substrato e temperatura, foi realizada uma avaliação de variáveis para identificar aquelas de maior importância para o cultivo celular, mediante o estudo dos efeitos sobre a resposta desejada (concentração de células).

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 125 mL de capacidade com 50 mL de meio semi-sintético contendo: KH_2PO_4 (2,0 g/L), $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ (2,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g/L).

As diferentes concentrações de glicerol, extrato de levedura, temperatura e pH, foram avaliados segundo um delineamento fatorial completo 2^4 . A Tabela 6 e 7 apresenta os valores a serem utilizados no delineamento fatorial fracionado 2^4 e a matriz do planejamento para avaliação de variáveis, respectivamente

Tabela 6. Níveis das variáveis do planejamento fatorial fracionado 2^4 para a identificação das variáveis mais importantes do cultivo em glicerol.

Variáveis	Fatores	Níveis		
		-1	0	+1
Glicerol (g/L)		10	30	50
Temperatura (°C)		28	34	40
pH		4,5	5,5	6,5
Extrato de levedura (g/L)		1	2	3

(-1) Fator relativo aos menores valores avaliados; (0) - Fator relativo aos valores avaliados no ponto central do planejamento; (+1) - Fator relativo aos maiores valores avaliados.

Tabela 7. Matriz do planejamento experimental 2⁴ para a avaliação das variáveis de importância no crescimento celular das leveduras pré-selecionadas

Ensaio	Glicerol (g/L)	Temperatura (°C)	pH	Extrato de levedura (g/L)
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

4.7 Otimização do processo de produção de biomassa e ribonucleotídeos

Após definição das melhores condições de cultivo com a levedura selecionada, procedeu-se à otimização do processo de produção de biomassa e ribonucleotídeos de forma a construir os modelos matemáticos de crescimento celular em meio contendo glicerol. Os cultivos foram realizados em reator BIOFLO III (New Brunswick Scientific Co. Inc., New Jersey, EUA), contendo 1L de meio de cultivo, utilizando glicerol como principal fonte de carbono e sais minerais

nas mesmas concentrações descritas no item 4.4. O inóculo foi preparado e adicionado de forma a obter uma concentração celular inicial de 1 g/L no reator.

Os cultivos foram realizados em modo descontínuo a pH 5,5 na temperatura de 28 °C (valores definidos na etapa anterior). O pH foi mantido constante durante todo o processo mediante adição de ácido clorídrico 1M ou hidróxido de sódio 1M, automaticamente, por meio de bomba peristáltica acoplada ao bioreator.

Nesta fase, foram estudados os parâmetros: concentração de glicerol, aeração e agitação no reator de acordo com as Tabelas 8 e 9. Amostras foram coletadas periodicamente para determinação da concentração de biomassa, glicerol e de ribonucleotídeos.

Tabela 8. Níveis das variáveis de planejamento fatorial completo 2^3 para a otimização do processo de produção de biomassa e ribonucleotídeos

Variáveis	Fatores	Níveis		
		-1	0	+1
Concentração de glicerol (g/L)		10	30	50
Aeração (vvm)		0,5	1,25	2,0
Agitação (rpm)		300	500	700

(-1) - Fator relativo aos menores valores avaliados; (0) - Fator relativo aos valores avaliados no ponto central do planejamento; (+1) - Fator relativo aos maiores valores avaliados; vvm – volume de ar por volume de meio por minuto; rpm – rotação por minuto.

Tabela 9. Matriz de planejamento fatorial 2^3 para a otimização do processo de produção de biomassa e ribonucleotídeos

Ensaio	Glicerol (g/L)	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

4.8 Métodos analíticos

4.8.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por espectrofotometria a 600 nm. A concentração de células em g/L foi calculada a partir de uma curva de calibração que correlaciona a absorbância a 600 nm e a massa seca das células obtidas em cada tempo de fermentação para cada microrganismo estudado (SILVA et al., 2004).

4.8.2 Dosagem de glicerol, ácidos orgânicos e etanol

A concentração de glicerol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, em cromatógrafo Waters (EUA) equipado com detector de índice de refração RID 6A e coluna "BIO-RAD Aminex" HP X-87H (300 x 7,8 mm) a temperatura de 35 °C e utilizando-se ácido sulfúrico 0,01 N como eluente, a um fluxo de 0,60 mL/min e um volume de injeção de 20 µL. Todas as amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro "Sep Pack" C18 (MILLIPORE, EUA).

4.8.3 Dosagem de ribonucleotídeos

A determinação de ribonucleotídeos foi realizada pelo método do Orcinol, de acordo com a metodologia descrita por HERBERT et al. (1977), cujo princípio de determinação é baseado na formação de furfural a partir da ribose, e sua posterior reação com o orcinol e oxidação com cloreto férrico, produzindo um composto de coloração verde com absorbância no comprimento de onda de 660nm.

Inicialmente, 0,5 mL da amostra foram adicionados a 1,5 mL da solução de Orcinol (0,1 % orcina e 0,1 % de cloreto férrico hexa-hidratado em ácido clorídrico concentrado). Foi elaborada uma curva de calibração utilizando um padrão de adenosina monofosfato preparado em solução aquosa nas concentrações de 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 mg/L , seguida das leituras de absorbância a 660 nm.

4.9 Determinação de parâmetros fermentativos e análise de resultados

Os resultados foram analisados considerando parâmetros como: velocidades específicas de crescimento celular (μ_x) segundo LEDUY e ZAJIC (1973), fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) e produtividade volumétrica em relação à biomassa (Q_x). Os dados foram analisados em quanto a cinética de crescimento, avaliando-se o comportamento da levedura selecionada e seu crescimento no meio contendo glicerol como fonte de carbono.

A análise estatística dos resultados obtidos nas diferentes etapas foi realizada mediante o programa DESING EXPERT versão 6.0, Statgraphics Plus utilizando-se conceitos de estatística descritiva e multivariada. Os modelos foram determinados por de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados aplicado aos resultados experimentais obtidos no planejamento fatorial completo.

Determinação dos Parâmetros Fermentativos

a) Fator de conversão de glicerol em biomassa ($Y_{X/S}$)

Foi determinado pela relação entre a quantidade de biomassa produzida e a correspondente variação de glicerol durante o tempo da fermentação.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)}$$

Onde:

$Y_{X/S}$ = fator de rendimento em biomassa (g/g); P_f = concentração final de biomassa (g/L); P_i = concentração inicial de biomassa (g/L); S_f = concentração final de glicerol (g/L); S_i = concentração inicial de glicerol (g/L).

Os valores de conversão de glicerol em biomassa ($Y_{X/S}$) foram também obtidos a partir do coeficiente angular da equação de regressão linear de ΔX em função de $(-\Delta S)$, para os ensaios onde foi estabelecida a curva de cinética de crescimento celular e consumo de substrato.

b) Produtividade volumétrica em biomassa (Q_P)

Foi determinada pela razão entre a quantidade de biomassa produzida e o intervalo do tempo correspondente.

$$Q_P = \frac{(P_f - P_i)}{\Delta t}$$

Onde:

Q_P = produtividade volumétrica em biomassa (g/L.h); P_f = concentração final de biomassa (g/L); P_i = concentração inicial de biomassa (g/L); Δt = intervalo de tempo da fermentação (h).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Tratamento do glicerol bruto

O glicerol bruto utilizado neste trabalho foi obtido por decantação na etapa final do processo de produção de biodiesel de óleo de soja em presença de hidróxido de sódio como catalisador. A Tabela 10 indica as características físico-químicas do glicerol bruto em relação ao conteúdo de glicerol, água, impurezas, pH e densidade, conforme laudo de análise fornecido pela empresa Bioverde Indústria e Comércio de Biocombustíveis Ltda.

Tabela 10. Características do glicerol bruto utilizado

	Unidade	Valor
Glicerol	(%, p/p)	70,61
Água	(%, p/p)	1,70
Voláteis	(%, p/p)	5,02
Outros (sabões, sais, álcalis)	(%, p/p)	24,37
pH (50 °C)	-	8,6
Densidade (25/4 °C)	g/cm ³	1,19
Aspecto	-	Viscoso, escuro

O glicerol bruto foi submetido a tratamento de acidificação para separação de sabão e outras impurezas. Foram determinados os volumes ideais de três diferentes ácidos concentrados para a neutralização do excesso de catalisador (NaOH) e separação por decantação de ácidos graxos livres, componentes do sabão que acompanham o glicerol bruto. A Tabela 11 apresenta os resultados desta experimentação.

Tabela 11. Volumes de ácidos concentrados utilizados e características do glicerol após tratamento para a separação de impurezas

Ácido	Pureza	Volume (mL)		Glicerol decantado		
	(%)	Ácido	Glicerol bruto	pH	*Aspecto	Conc. Final (g/L)
HCl	38	2,8	50	1,08	+++	910
H ₂ SO ₄	98	1,3	50	1,01	+	897
H₃PO₄	85	6,2	50	4,01	++	914

* +++: líquido claro; +: líquido pouco claro em relação ao glicerol bruto

A simples neutralização do excesso de base (hidróxido de sódio) contido no glicerol bruto não permitiu a separação do ácido graxo que forma o sabão, sendo necessária a adição de excesso de ácido para a decantação e separação do glicerol. De acordo com a Tabela 11, não se observa uma diferença considerável na concentração final de glicerol após o tratamento com ácidos concentrados, sendo a máxima diferença observada entre os tratamentos de 1,8 %. Entretanto, verificou-se uma redução significativa no valor do pH inicial do glicerol de 8,6 para valores próximos a pH 1,0 após tratamento com ácido forte, sendo este valor aproximadamente 3 vezes inferior ao pH final correspondente ao tratamento com ácido fraco (H₃PO₄), conforme apresentado na Tabela 11. Esta diferença no pH final obedece à natureza química dos ácidos utilizados no tratamento.

O baixo valor do pH do glicerol tratado requer maior volume de solução básica para o ajuste do pH final para sua posterior utilização em processos fermentativos.

De acordo com a Figura 7, o glicerol tratado com ácido clorídrico apresentou menor turbidez comparado com os tratamentos com ácido fosfórico e ácido sulfúrico. A maior turbidez do glicerol após do tratamento com os diferentes ácidos concentrados aparentemente encontra-se relacionado com a menor solubilidade dos

sais formados e micro-partículas de sólidos não decantados. Segundo Lages; Silva-Graça e Lucas (1999), a presença de concentrações elevadas de sais como cloreto de sódio e sulfato de sódio no glicerol, pode afetar negativamente o crescimento ou metabolismo de certos microrganismos.

Por outro lado, a presença de pequenas quantidades de vitaminas, íons (K, P, S, Mg, Ca) e ácidos graxos derivados do óleo vegetal, difundidos no glicerol durante a própria reação de formação de biodiesel e durante o tratamento para eliminação de sabão, podem contribuir positivamente na integridade da membrana celular e conseqüentemente no crescimento de leveduras (WALKER, 1998, THOMPSON; HE, 2006,).

Figura 7 - Aspecto do glicerol após tratamento com diferentes ácidos concentrados

De acordo com os resultados obtidos, o ácido fosfórico foi o escolhido como acidulante a ser utilizado para o tratamento do glicerol bruto empregado no presente trabalho, principalmente por ser aquele que forneceu a maior concentração de glicerol após tratamento, devido ao baixo requerimento de base necessária para o ajuste final do pH antes das fermentações, como também, pela formação de fosfato de sódio, sal que fornece fósforo ao processo fermentativo.

5.2 *Screening* de leveduras com destacada capacidade de crescimento celular, produção de ribonucleotídeos e produção de biomoléculas a partir de glicerol

5.2.1 Avaliação do crescimento celular e produção de biomassa

A seleção das cepas de leveduras para este estudo foi baseada na capacidade fisiológica destas leveduras de assimilar glicerol, conforme Lages; Silva - Graça; Lucas (1999); CBS (2007) e NCYC (2007).

Tabela 12. Produção de biomassa para as diferentes leveduras após 24 h cultivo em meio semi-sintético contendo glicerol

Levedura	Biomassa (g/L)
<i>Kluyveromyces marxianus subsp.marxianus</i> ATCC 8554	2,19
<i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i> CCT 4086	3,28
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 3192	1,59
<i>Kluyveromyces marxianus</i> UFMG 95279-1	2,23
<i>Candida utilis</i> CCT 3469	2,20
<i>Candida tropicalis</i>	1,83
<i>Candida batistae</i> UFMG 96Y192	2,97
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	1,61
<i>Wickerhamiella cacticola</i> UFMG 96267	1,78
<i>Hansenula anomala</i> CCT 2648	4,67

De acordo com a Tabela 12, o maior valor de concentração de biomassa (4,67 g/L) foi observado para a levedura *H. anomala* CCT 2648, seguido para as leveduras *K. marxianus var. lactis* CCT 4086 e *C. batistae* UFMG 96Y192 que alcançaram valores de concentração de biomassa igual a 3,28 e 2,97 g/L, respectivamente. As demais cepas apresentaram crescimento celular de pelo menos 53 % inferior àquela de maior crescimento, com valores de biomassa entre 1,59 e 2,23 g/L (Tabela 12).

Na Figura 8 apresentam-se os resultados relativos ao fator de conversão de glicerol em células ($Y_{X/S}$) e a produtividade volumétrica em biomassa (Q_X) dos ensaios com as cepas de leveduras.

Figura 8 - Valores de $Y_{X/S}$ e Q_X obtidos durante o cultivo de leveduras em glicerol

Observa-se que os valores de conversão de glicerol em biomassa obtidos para todas as cepas apresentam grandes variações entre si. Os maiores valores observados foram 0,30 g biomassa/g glicerol e 0,28 g biomassa/g glicerol para as cepas *Hansenula anomala* CCT 2648 e *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086

respectivamente. Entretanto, verificou-se que as demais cepas apresentaram valores de conversão de substrato em biomassa inferiores a 0,20 g/g de glicerol.

Da mesma forma, para os valores de produtividade volumétrica em biomassa se destacam as leveduras *H.anomala* CCT 2648 e *K. marxianus* CCT 4086 em relação às demais cepas estudadas, com valores de 0,19 e 0,14 g/L.h respectivamente. Na literatura consultada não foram encontrados valores de $Y_{x/s}$ e Q_x para cultivos em glicerol das leveduras estudadas.

5.2.2 Avaliação da produção de ribonucleotídeos sob diferentes métodos de extração

Nesta fase, foi avaliado o conteúdo em ribonucleotídeos totais das células produzidas previamente. Para extração dos ribonucleotídeos as células das leveduras foram submetidas aos métodos de extração por autólise celular e ruptura celular mecânica. A Tabela 13 apresenta os resultados da determinação dos ribonucleotídeos totais obtidos por esses métodos de extração.

Em relação à extração de ribonucleotídeos por autólise, observou-se variações marcantes nas concentrações obtidas para as diferentes espécies de leveduras, com uma diferença máxima de 3,94 mg/g. As leveduras *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 e *Hansenula anomala* CCT 2648 apresentaram valores 32 e 45 %, respectivamente, inferiores ao conteúdo de ribonucleotídeos em relação à levedura *Kluyveromyces marxianus* UFMG 95279-1 com maior valor observado (6,83 mg/g). Para a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 o valor de 4,67 mg/g de célula encontra-se próximo ao valor de 6,3 mg/g de células secas descrito por Belem e Lee (1999) durante a fermentação de soro de queijo pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 28244.

Tabela 13. Ribonucleotídeos totais obtidos após 24h de cultivo de diferentes cepas de leveduras em meio contendo glicerol

Levedura	Ribonucleotídeos totais (mg/g cel)	
	Autólise ^a	Ruptura ^b
<i>K. marxianus subsp.marxianus</i> ATCC 8554	3,55	3,88
<i>K. marxianus var. lactis</i> CCT 4086	4,67	5,17
<i>K.marxianus</i> CCT 3192	5,73	6,02
<i>K.marxianus</i> UFMG 95279-1	6,83	6,94
<i>C. utilis</i> CCT 3469	4,27	4,69
<i>C. tropicalis</i>	6,62	6,87
<i>C.batistae</i> UFMG 96Y192	2,89	3,30
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	4,01	4,59
<i>W. cacticola</i> UFMG 96267	6,78	6,81
<i>H. anomala</i> CCT 2648	3,72	4,34

^a Condições de autólise: Tampão fosfato pH 7,39; 200 rpm; 55°C; 24 h. ^b Ruptura com pérolas de vidro: suspensão para perolas de vidro 1:1; 5 ciclos x 1 min/ciclo.

Segundo os resultados, não se observa uma relação clara entre a produção de biomassa e a produção de ribonucleotídeos. Este fato indica que somente mediante a determinação da cinética de crescimento para as leveduras com maior produção de biomassa é possível inferir o ponto de maior produção de ribonucleotídeos pelas leveduras em estudo.

Belem e Lee (1999) examinando a produção de ribonucleotídeos por *Kluyveromyces marxianus* em soro de queijo observaram a relação existente entre a biomassa produzida e o conteúdo de ribonucleotídeos, entretanto, a maior concentração de ribonucleotídeos foi observada nas primeiras horas de fermentação correspondentes à fase de crescimento logarítmico da levedura. Da mesma forma, Kim; Lee e Lee (2002) verificaram em fermentação de efluentes do processamento

de ginseng por *Hansenula anomala* KCCM 11473, que o conteúdo de ribonucleotídeos totais aumenta com o aumento do crescimento celular, sendo a concentração máxima obtida no ponto médio da fase logarítmica de crescimento, diminuindo este valor com o tempo de cultivo.

Comparando os valores de ribonucleotídeos totais extraídos por autólise e ruptura mecânica (Tabela 13), não se observa uma diferença considerável entre os métodos de extração utilizados. Ressalta-se uma diferença máxima de 0,50 mg/g no conteúdo em ribonucleotídeos para a cepa *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 utilizando ambos métodos.

De acordo com os resultados, foi escolhido o método de ruptura celular mecânica por requerer um menor tempo para a extração dos ribonucleotídeos totais do interior das células quando comparado com o método de autólise celular.

5.2.3 Avaliação de produção de etanol e ácidos orgânicos

Nesta fase do *screening* também foi avaliada a produção de etanol e ácidos orgânicos após 72 h de fermentação.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 14, observou-se uma considerável produção de etanol com as leveduras *Candida tropicalis* e *Hansenula anomala* CCT 2648, atingido concentrações de 6,6 g/L e 3,6 g/L de etanol, respectivamente. As demais espécies de leveduras não produziram concentrações significativas de etanol, apresentando valores inferiores a 1,0 g/L.

Tabela 14. Produção de etanol e ácidos orgânicos após 72 h de fermentação de glicerol pelas leveduras estudadas

Levedura	Etanol g/L	Ácidos (g/L)		
		Cítrico	Succínico	Acético
<i>K. marxianus subsp. marxianus</i> ATCC 8554	0,6	0,7	0,6	0,2
<i>K. marxianus var. lactis</i> CCT 4086	0,3	0,8	0,7	ND
<i>K. marxianus</i> CCT 3192	ND	0,6	0,3	ND
<i>K. marxianus</i> UFMG 95279-1	ND	0,7	0,2	ND
<i>C. utilis</i> CCT 3469	0,8	ND	ND	ND
<i>C. tropicalis</i>	6,6	ND	ND	0,8
<i>C. batistae</i> UFMG 96Y192	0,6	ND	ND	1,1
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	0,7	ND	ND	0,3
<i>W. cacticola</i> UFMG 96267	ND	ND	0,4	ND
<i>H. anomala</i> CCT 2648	3,6	0,6	1,4	0,3

ND: não determinado

Verificou-se que sob as condições de experimentação utilizadas, estas leveduras produziram etanol a partir de glicerol. Sob as estas condições, as leveduras do gênero *Kluyveromyces* e *Hansenula*, produziram ácido cítrico em concentrações entre 0,6 e 0,8 g/L. Resultados estes, semelhantes àqueles obtidos por Papanikolau et al (2002) após 72 h de fermentação de glicerol comercial por *Yarrowia lipolytica*.

As baixas concentrações de ácido cítrico encontradas (Tabela 14) provavelmente podem estar relacionadas com as baixas condições de aeração empregadas neste estudo, uma vez que altas taxas de oxigênio dissolvido favorecem a produção desta biomolécula, conforme indicado por PAPANIKOLAU et al. (2002).

Também, foram detectadas as produções de ácido acético e ácido succínico pelas leveduras em estudo em diferentes concentrações. As cepas *Candida batistae* UFMG 96Y192 e *Hansenula anomala* CCT 2648 produziram ácido acético nas concentrações de 1,1 e 0,4 g/L, respectivamente. Por outro lado, todas as espécies do gênero *Kluyveromyces* produziram ácido succínico em concentrações que variam de 0,2 a 0,7 g/L, sendo que a máxima concentração alcançada foi de 1,4 g/L com a cepa *H. anomala* CCT 2448. Após fermentação observou-se um significativo residual de glicerol no meio de cultivo, próximos a 40 % do total em todas as amostras analisadas. A baixa assimilação de glicerol nestas condições possivelmente se deve ao fato de que o processo de catabolismo de glicerol é dependente de altas concentrações de oxigênio no meio, conforme relatos de GANCEDO; GANCEDO (1968) e LAGES; SILVA-GRAÇA, LUCAS, (1999)

Estes valores indicam também a possibilidade da utilização de glicerol como um potencial substrato para ser utilizado na obtenção destas biomoléculas.

De acordo com os resultados obtidos nesta primeira etapa, as leveduras pré-selecionadas para dar continuidade aos estudos foram a *H.anomala* CCT 2648 e *K. marxianus var lactis* CCT 4086, devido a sua destacada capacidade de crescimento celular e produção de biomassa quando comparadas com as outras leveduras estudadas.

5.3 Influência da concentração de extrato de farelo de arroz no crescimento celular das leveduras pré-selecionadas em glicerol

Nesta etapa, foi avaliada a influência de diferentes concentrações de extrato de farelo de arroz como fonte de nitrogênio para o crescimento celular das duas leveduras pré-selecionadas na etapa do *screening* de leveduras.

Figura 9 - Efeito da concentração de extrato de farelo de arroz (EFA) na concentração de células, concentração de glicerol e pH do meio para a levedura *Hansenula anomala* CCT 2648 cultivada em meio contendo glicerol; EFA: 1 % (v/v) ($\diamond$), 8 % (v/v) ($\square$) e 15 % (v/v).

Na Figura 9 e Figura 10 observa-se as curvas de crescimento celular, consumo de glicerol e perfil de pH durante o cultivo das leveduras *Hansenula anomala* CCT 2648 e *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* CCT 4086 em meios contendo diferentes concentrações de extrato de farelo de arroz (EFA), respectivamente.

Figura 10 - Efeito da concentração de extrato de farelo de arroz (EFA) na concentração de células, concentração de glicerol e pH do meio para a levedura *Kluyveromyces marxianus var lactis* CCT 4086 cultivada em meio contendo glicerol; EFA: 1 % (v/v) ($\diamond$), 8 % (v/v) ($\square$) e 15 % (v/v).

Verifica-se que as concentrações de 8 % (v/v) e 15 % (v/v) EFA adicionadas ao meio de cultivo não resultaram em diferenças marcantes na produção de células de *Hansenula anomala* CCT 2648 durante o tempo de cultivo, sendo o valor máximo alcançado de 11,9 g/L (Figura 9). Por outro lado, para a menor concentração de EFA estudada (1 %, v/v) observou-se uma concentração de

biomassa de 8,6 g/L, valor este 28 % inferior ao observado nas concentrações superiores de EFA no meio após 96 h de cultivo.

Comportamento diferente foi observado para a levedura *K. marxianus var lactis* CCT 4086 (Figura 10), onde verificou-se uma diferença de 88 % entre a concentração da biomassa alcançada após 96 h na menor e maior concentração de EFA, com valores de 0,7 e 6,2 g/L, respectivamente

A análise comparativa da concentração celular para ambas as cepas estudadas revelou que a levedura *H. anomala* CCT 2648 apresentou valores superiores para todas as concentrações de EFA, quando comparada com as concentrações alcançadas pela levedura *K. marxianus var lactis* CCT 4086.

Na Figura 9 e Figura 10, não se observou um consumo total de glicerol nos cultivos para ambas as cepas das leveduras utilizadas. Isto se deve principalmente às condições adversas de pH alcançados, o que limitou a conversão máxima de glicerol para 75 % e 62 % do total fornecido na concentração máxima de EFA para *H. anomala* CCT 2648 e *K. marxianus var lactis* CCT 4086, respectivamente. De fato, a faixa ótima de pH para o crescimento de espécies do gênero *Pichia* (*Hansenula*) está entre os valores de 2 a 8, entretanto, o crescimento de *K. marxianus* encontra-se restrito a valores mais elevados de pH, entre 3,5 e 7,5.

Na Tabela 15 observa-se o efeito da concentração de EFA sobre os fatores conversão de substrato e produtividade volumétrica em células para as leveduras estudadas. Verifica-se que para a levedura *H. anomala* CCT 2648, os valores destes parâmetros encontram-se próximos para todas as concentrações de EFA estudadas.

Para a levedura *K. marxianus var lactis* CCT 4086, nota-se que os valores de produtividade volumétrica em células são inferiores aos observados para a primeira levedura, sendo os fatores de conversão similares para as concentrações 8 e

15 % (v/v) de EFA, exceto para a concentração 1 % (v/v) EFA, o qual resultou ser o menor valor.

Tabela 15. Fator de conversão de glicerol e produtividade volumétrica em células sob diferentes concentrações de extrato de farelo de arroz (EFA) para *H. anomala* CCT 2648 e *K. marxianus var. lactis* CCT 4086

Levedura	Extrato de Farelo de Arroz (EFA)					
	1% (v/v)		8 % (v/v)		15 % (v/v)	
	Y _{X/S}	^a Q _P	Y _{X/S}	^a Q _P	Y _{X/S}	^a Q _P
<i>H. anomala</i> CCT 2648	0,51	0,11	0,52	0,15	0,54	0,14
<i>K. marxianus var. lactis</i> CCT 4086	0,25	0,01	0,51	0,08	0,57	0,10

^a 48 h de cultivo.

O efeito positivo de concentrações entre 5-20 % (v/v) de EFA no crescimento celular durante a produção de xilitol por *Candida guilliermondii*, em meios contendo hidrolisado de material lignocelulósico, encontra-se bem documentado (CARVALHO, 2000; CANETTI, ALMEIDA E SILVA, FELIPE, 2002). Por outro lado, não é possível realizar uma comparação com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que ainda não existem estudos na literatura consultada que descreve a influência de EFA no crescimento destas leveduras utilizando glicerol de biodiesel como única fonte de carbono.

Conforme os resultados, durante o cultivo de células de *H. anomala* CCT 2648 em meio contendo 1 g/L de extrato de levedura, observou-se um valor de biomassa de 4,6 g/L (Tabela 12). Este valor é 28 % superior ao verificado quando se utilizou 15 % (v/v) de EFA sob as mesmas condições nas 24 h de cultivo. A análise destes resultados evidencia que o extrato de levedura contém elementos ou micronutrientes requeridos pela levedura para acelerar a produção de

biomassa, se comparado com o extrato de farelo de arroz. Entretanto, o extrato de farelo de arroz suporta o crescimento das leveduras estudadas em glicerol, porém, em menor grau.

De acordo com estas observações, o extrato de levedura foi selecionado como fonte orgânica de nitrogênio para dar continuidade aos estudos em reator de bancada.

5.4 Avaliação das variáveis de importância para o cultivo de leveduras em glicerol

De acordo com os ensaios realizados nas etapas anteriores, selecionou-se a levedura *Hansenula anomala* CCT 2648 e *Kluyveromyces marxianus var. lactis* CCT 4086 para a continuidade dos estudos por apresentarem maiores valores de conversão de glicerol em biomassa ($Y_{X/S}$) e produtividade volumétrica em biomassa (Q_X) (Figura 8).

Nesta segunda etapa foram avaliadas a influência das variáveis concentração de glicerol, temperatura, pH e concentração de extrato de levedura na produção de biomassa para ambas as leveduras selecionadas, de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 descrito no item 4.6.

5.4.1 Avaliação das variáveis de importância para o cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2648 em glicerol.

Os resultados da Tabela 16 revelam que, tanto para 24h como para 48h de cultivo, as concentrações de biomassa da levedura *H. anomala* CCT 2648 variaram de 0,56 g/L a 4,59 g/L, representando uma diferença de 88 % entre si.

Tabela 16. Concentração de biomassa (g/L) da levedura *Hansenula anomala* CCT 2648 cultivada nas condições descritas no planejamento fatorial completo 2⁴

Ensaio	Glicerol (g/L)	Temperatura (°C)	pH	E.L (g/L)	Biomassa (g/L)	
					24h	48 h
1	10	28	4,5	1	4,29	3,51
2	50	28	4,5	1	2,47	2,78
3	10	40	4,5	1	1,32	1,43
4	50	40	4,5	1	0,88	1,19
5	10	28	6,5	1	4,02	4,17
6	50	28	6,5	1	2,75	2,80
7	10	40	6,5	1	0,98	1,07
8	50	40	6,5	1	0,56	1,08
9	10	28	4,5	3	3,91	2,11
10	50	28	4,5	3	2,61	2,89
11	10	40	4,5	3	2,15	1,89
12	50	40	4,5	3	1,35	1,12
13	10	28	6,5	3	4,59	2,03
14	50	28	6,5	3	2,92	3,02
15	10	40	6,5	3	1,87	2,10
16	50	40	6,5	3	1,15	1,39
17	30	34	5,5	2	4,18	4,24
18	30	34	5,5	2	4,19	4,29
19	30	34	5,5	2	4,11	4,34
20	30	34	5,5	2	4,27	4,08

E.L = Extrato de levedura

Resultados semelhantes foram encontrados por Papanikolaou et al. (2002) durante a produção de ácido cítrico utilizando *Yarrowia lipolytica*. Estes autores observaram uma produção de biomassa em torno de 5,0 g/L nas 24 h de fermentação de glicerol. Recentemente, Çelik et al (2008) reportaram o crescimento de *Pichia pastoris* E17 em glicerol derivado de biodiesel para a obtenção de proteína recombinante. Neste estudo, em meio contendo 12,6 g/L de glicerol, os autores

obtiveram valores de biomassa entre 4,0 e 4,8 g/L nas primeiras 24 h de fermentação, valores estes, que se correspondem com os obtidos com a levedura do mesmo gênero no presente trabalho.

A influência das variáveis sobre a produção de biomassa foi estudada utilizando ferramentas estatísticas e apresentada em forma de gráfico de Pareto e tabela ANOVA.

Figura 11 - Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) representada em forma de gráfico de Pareto da variável resposta biomassa após 24h de cultivo para a levedura *H.anomala* CCT 2648 .

O gráfico de Pareto (Figura 11), revela a estimativa dos efeitos para a produção de biomassa da levedura *Hansenula anomala* CCT 4086 nas primeiras 24h de cultivo. Para a determinação da significância de cada variável estudada, foi considerado o efeito padronizado ou valor absoluto de $t_{\text{calculado}}$ em relação ao valor de t_{tabelado} , sendo significativa aquela variável cujo valor de $t_{\text{calculado}}$ fosse superior ao

valor de t_{tabelado} igual 2,31 para a distribuição de Student de 95 % com erro total de 8 graus de liberdade.

Segundo o gráfico de Pareto, observa-se a grande influência da variável temperatura na produção de biomassa no nível inferior (-1), correspondente à temperatura de 28 °C, sendo o valor máximo atingido sob essa condição de 4,59 g/L de células (Tabela 16). Entretanto, no gráfico de Pareto (Figura 11) observa-se que somente a variável pH não apresentou efeito significativo.

Tabela 17. Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produção de biomassa para a levedura *Hansenula anomala* CCT 2648

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P
Biomassa (g/L)	A	4,45	1	4,45	180,29	<0,0001 *
	B	18,71	1	18,71	757,50	<0,0001 *
	C	0,0012	1	0,0012	0,05	0,8293
	D	0,67	1	0,67	25,23	0,0008 *
	AA+BB+CC+DD (curvatura)	10,64	1	10,64	431,02	<0,0001 *
	AB	0,85	1	0,85	34,28	0,0004 *
	AC	0,005	1	0,005	0,20	0,6678
	AD	0,02	1	0,02	0,74	0,4153
	BC	0,29	1	0,29	11,59	0,0093 *
	BD	0,32	1	0,32	13,16	0,0067 *
	CD	0,08	1	0,08	3,41	0,1022
	Error total	0,20	8	0,02		
R ² =0,995 Total		36,24	19			

A: glicerol; B: Temperatura; C: pH; D: Extrato de levedura; SQ: soma quadratic; GL: grau de liberdade; MQ: média quadrática. * significativo ao intervalo de confiança do 95 %.

A análise de variância (Tabela 17) confirmou a significância da variável temperatura, concentração de glicerol e de extrato de levedura sobre a resposta biomassa, com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,99, o que demonstra a

relevância das variáveis estudadas. No entanto, a resposta apresentou uma curvatura significativa que o implica que um modelo linear não descreve o comportamento em função das variáveis estudadas, indicando a possibilidade de ajuste a um modelo quadrático.

A maior quantidade de biomassa para 24h de cultivo foi atingida no ensaio 13 onde se utilizou uma concentração de substrato de 10 g/L e extrato de levedura de 3 g/L, sob as condições de pH 6,5 e 28 °C.

De acordo com esta análise, ainda não se pode indicar com rigorosa precisão as condições ótimas para o cultivo de *H.anomala* CCT 2648 em glicerol de biodiesel. Os dados obtidos abrangem apenas uma pequena porção espacial do desenho experimental (ampla curvatura), o que torna necessário incluir níveis de temperatura inferiores a 28 °C (valor de maior significância).

5.4.2. Avaliação das variáveis de importância para o cultivo da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* CCT 4086 em glicerol

Os valores de biomassa de *K. marxianus* var *lactis* CCT 4086 obtidas após 24 h de cultivo em glicerol (Tabela 18) variaram de 1,21 g/L para 3,27 g/L, encontrando-se os maiores valores nos ensaios do ponto central (ensaio 17 a 20) para as 48 h de fermentação.

A significância das variáveis estudadas foi analisada estatisticamente de forma detalhada. Neste caso, no gráfico de Pareto (Figura 12) observa-se uma ordem similar de significância das variáveis glicerol e extrato de levedura ao nível superior (+ 1) na produção de biomassa de *K.marxianus* CCT 4086 (t_{tabelado} igual a 2,31; 95% de confiança, erro com 8 graus de liberdade).

Tabela 18. Concentração de biomassa (g/L) da levedura *K. marxianus var lactis* CCT 4086 cultivada nas condições descritas no planejamento fatorial completo 2⁴

Ensaio	Glicerol (g/L)	Temperatura (° C)	pH	E.L (g/L)	Biomassa (g/L)	
					24h	48 h
1	10	28	4,5	1	1,21	2,33
2	50	28	4,5	1	2,27	2,78
3	10	40	4,5	1	1,65	2,01
4	50	40	4,5	1	2,47	2,52
5	10	28	6,5	1	1,38	1,34
6	50	28	6,5	1	2,20	1,98
7	10	40	6,5	1	1,36	1,41
8	50	40	6,5	1	2,35	2,59
9	10	28	4,5	3	2,95	3,06
10	50	28	4,5	3	3,08	3,05
11	10	40	4,5	3	2,50	2,73
12	50	40	4,5	3	2,89	2,98
13	10	28	6,5	3	1,61	1,70
14	50	28	6,5	3	2,59	2,62
15	10	40	6,5	3	2,13	2,14
16	50	40	6,5	3	3,09	3,15
17	30	34	5,5	2	3,37	3,32
18	30	34	5,5	2	3,27	3,23
19	30	34	5,5	2	3,28	3,36
20	30	34	5,5	2	3,32	3,35

E.L = Extrato de levedura

O pH exerce uma influência significativa sobre o crescimento da levedura *K.marxianus var lactis* CCT 4086 (Figura 12), entretanto, em menor grau que aquela observada para glicerol e extrato de levedura. Por outro lado, a temperatura não apresentou influência significativa na produção de biomassa dentro dos níveis estudados (28°C a 40°C).

Figura 12 - Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) pelo gráfico de Pareto da variável resposta biomassa após 24h de cultivo para *K.marxianus var. lactis* CCT 4086 .

Tabela 19. Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produção de biomassa para a levedura *K.marxianus* CCT 4086

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P
Biomassa (g/L)	A: Glicerol	2,36	1	2,36	39,72	0,0002 *
	B: Temperatura	0,08	1	0,08	1,39	0,2724
	C: pH	0,33	1	0,33	5,60	0,0454 *
	D: Extrato de levedura	2,21	1	2,21	37,18	0,0003 *
	AA+BB+CC+DD (curvatura)	3,71	1	3,71	62,36	<0,0001 *
	AB	0,002	1	0,002	0,03	0,8660
	AC	0,11	1	0,11	1,91	0,2039
	AD	0,095	1	0,095	1,59	0,2430
	BC	0,08	1	0,08	1,39	0,2724
	BD	0,009	1	0,009	0,16	0,6999
	CD	0,18	1	0,18	3,00	0,1215
	Error total	0,48	8	0,48		
R ² =0,95 Total		9,66	19			

SQ: soma quadrática; GL: grau de liberdade; MQ: média quadrática. * significante ao intervalo de confiança do 95 %.

Pela análise de variância (Tabela 19) verifica-se um coeficiente de correlação de 0,95, entretanto, o modelo apresentou falta de ajuste significativa, não sendo adequado para descrever a produção de biomassa. Ainda, conforme a Tabela 19, observa-se uma curvatura significativa o que indicaria a relação com um modelo quadrático e não linear, sendo necessário estabelecer outros níveis para as variáveis estudadas.

5.5 Otimização do processo de produção de biomassa e ribonucleotídeos

De acordo com os resultados obtidos sob as condições experimentais estudadas, verificou-se que a levedura *H.anomala* CCT 2648 apresenta maior concentração celular que a levedura *K. marxianus var lactis* CCT 4086 quando cultivada em glicerol de biodiesel como única fonte de carbono.

Desta forma, foi selecionada a levedura *H.anomala* CCT 2648 com o objetivo de verificar a influência dos parâmetros aeração, agitação e concentração de substrato sobre o crescimento celular em processos conduzidos em reator de bancada, conforme condições descritas no planejamento 2^3 (item 4.7)

Neste estudo foram fixadas as melhores condições de temperatura (28 °C) e concentração de extrato de levedura (3 g/L) estabelecidas previamente. O valor de pH foi selecionado arbitrariamente no nível central do planejamento (pH 5,5), uma vez que este não apresentou influência significativa no crescimento da levedura em estudo.

Na Tabela 20 apresenta-se a concentração de glicerol, concentração celular, fator de conversão de glicerol e produtividade volumétrica em células para os 11 ensaios realizados em biorreator. Por outro lado, na Figura 13 apresentam-se as curvas de cinética de consumo de substrato, crescimento celular e formação de

produto (ribonucleotídeos) para cada ensaio do planejamento.

Verifica-se que em todos os ensaios realizados e para as condições de análise estabelecidas, não foi detectada a formação de etanol, ácido acético, ácido cítrico ou ácido succínico. Este fato, possivelmente indica o metabolismo preferencialmente respiratório da levedura *H.anomala* CCT 2648, inclusive na condição de menor aeração (0,5 vvm) e agitação (300 rpm) estudadas.

A maior concentração em células, 23,4 g/L, foi observada após 24 h de cultivo no ensaio 8, onde todas as variáveis encontravam-se no nível mais elevado (Tabela 20), o que indica uma influência positiva da máxima agitação e aeração para a assimilação de glicerol pela levedura *H.anomala* CCT 2648.

De acordo com a Figura 13, verifica-se a exaustão do glicerol nas 10 h de cultivo para os ensaios 5 e 7 submetidos à mesma condição de agitação (700 rpm). Comparando estes resultados com os ensaios de igual concentração inicial de glicerol (10 g/L), constata-se que para o mesmo tempo de cultivo, o consumo de glicerol nos ensaios 1 e 3 (300 rpm) foi de 30 % do glicerol inicial.

Por outro lado, verifica-se que para os ensaios contendo 50 g/L glicerol, o tempo mínimo de esgotamento de substrato foi observado nas 30 h de cultivo para o ensaio 8, contrariamente, para o mesmo período, o consumo de glicerol foi apenas de 11 % e 17 % sobre o valor total para os ensaios 4 e 2, respectivamente.

Nas condições experimentais utilizadas no ensaio 4, observou-se uma baixa utilização de substrato comparado com o ensaio 8 (2 vvm, 700 rpm). Este fato sugere que a combinação dos efeitos agitação e aeração no nível superior (+1) contribuem significativamente na bioconversão de glicerol em biomassa, facilitado possivelmente pelo aumento da solubilidade do oxigênio no meio.

Tabela 20. Valores resultantes do planejamento fatorial 2³ aplicado para avaliar a influência da concentração de glicerol, agitação e aeração durante o cultivo de *H.anomala* CCT 2648 em meio contendo glicerol de biodiesel

Ensaio	Níveis das variáveis			Glicerol (g/L)												Concentração Celular (g/L)												Respostas	
	A	B	C	0 h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	20h	24h	30h	0 h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	20h	24h	30h	Y _{X/S}	Q _P
1	-1	-1	-1	10,0	9,6	9,0	8,7	7,7	7,1	6,7	6,0	5,1	3,8	2,5	1,6	0,9	1,0	1,2	1,5	1,9	2,6	2,8	3,3	3,8	4,4	5,3	5,7	0,58	0,17
2	+1	-1	-1	50,5	48,9	48,1	47,7	46,4	46,2	45,5	42,1	43,6	41,9	41,1	39,6	1,0	1,3	1,7	1,8	2,4	2,5	3,1	3,5	3,6	4,5	5,0	5,5	0,38	0,15
3	-1	+1	-1	10,1	9,8	9,1	8,7	7,6	6,7	5,2	3,8	2,4	1,9	0,5	0,0	1,0	1,1	1,3	2,2	3,3	3,5	4,7	5,3	6,0	6,1	6,2	6,1	0,59	0,25
4	+1	+1	-1	50,7	50,2	48,4	46,5	44,0	45,6	43,7	40,7	38,0	36,3	35,6	33,6	1,0	1,2	1,8	2,2	3,4	3,2	4,2	5,4	6,1	7,7	8,7	9,5	0,46	0,23
5	-1	-1	+1	10,0	9,2	7,4	4,8	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	1,1	2,6	4,5	5,1	6,7	6,7	6,6	6,7	6,7	6,7	6,6	0,57	0,58
6	+1	-1	+1	49,0	48,6	42,6	38,7	34,9	35,8	33,8	26,3	16,3	5,4	3,4	1,1	1,0	1,2	1,5	2,4	3,1	4,1	6,7	9,0	14,9	16,6	20,9	21,4	0,45	0,31
7	-1	+1	+1	10,3	9,6	8,9	7,9	3,7	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,2	2,1	3,0	4,8	6,9	6,8	6,8	6,9	6,9	6,9	6,2	0,60	0,59
8	+1	+1	+1	50,9	49,1	48,0	44,7	40,7	32,7	30,7	25,6	18,3	4,4	1,6	0,0	0,9	1,3	2,1	3,4	4,9	7,2	12,6	14,0	16,6	18,9	22,6	23,4	0,45	0,62
9	0	0	0	31,6	30,9	30,5	28,1	24,6	22,2	20,6	16,8	14,6	6,9	3,8	1,8	0,9	1,0	1,4	3,1	5,1	5,9	8,2	10,4	11,1	14,2	15,0	15,7	0,54	0,50
10	0	0	0	30,5	30,0	29,2	25,1	24,6	20,8	18,3	14,8	10,1	4,6	2,9	1,0	0,9	1,0	1,4	3,1	5,3	6,3	8,1	10,3	11,1	13,7	15,5	15,4	0,51	0,53
11	0	0	0	30,3	30,1	24,4	27,4	22,6	23,0	19,2	15,0	12,6	5,3	3,0	1,0	1,0	1,0	1,4	3,1	6,1	5,4	7,5	10,6	11,1	15,0	14,2	15,2	0,53	0,44

A: glicerol; B: aeração; C: agitação. Y_{X/S} calculado até a concentração máxima de células. Q_P calculado às 10 h de fermentação (tempo de esgotamento de substrato para o ensaio 5)

Figura 13 - Curvas de crescimento celular de *H. anomala* CCT 2648 (○), concentração de glicerol (□) e produção específica de (RT) ribonucleotídeos totais (▲) dos ensaios do planejamento fatorial 2^3 .

Resultados semelhantes foram observados para os ensaios realizados nas condições do ponto central (Figura 14.a). Nestas condições, os valores de $Y_{X/S}$ observados foram de 0,51 a 0,54 g célula/g de glicerol, e da ordem de 10 a 15 % inferiores aos observados para a menor concentração de glicerol. Este fato indica a existência de uma influência negativa do aumento da concentração de glicerol na assimilação de substrato pela levedura *H.anomala* CCT 2648.

Nos ensaios com as menores concentrações de glicerol, não se observou uma alteração considerável nos valores de $Y_{X/S}$. No entanto, para os ensaios com 50 g/L de glicerol, observou-se uma tendência ao aumento no valor de $Y_{X/S}$ com o aumento da agitação e aeração.

Na Figura 14.b apresenta-se a variação dos valores de produtividade volumétrica em células durante os diferentes ensaios, considerando como tempo de referência 10 h de cultivo, correspondente ao tempo de esgotamento do substrato no ensaio número 5. Observa-se que as condições que favorecem a produtividade em células encontram-se relacionados com a variável aeração e agitação.

Assim, para os ensaios conduzidos a 300 rpm (E1,E2,E3 e E4), os valores de Q_X mostraram ser inferiores a 0,26 g/L.h, observando-se um acréscimo de 32 a 34 % quando a aeração aumentou de 0,5 para 2,0 vvm.

Verifica-se, ainda na Figura 14.b, uma pequena diminuição no valor de Q_X com o aumento da concentração de glicerol para o nível de agitação (-1). Este fato possivelmente está relacionado com a menor solubilidade de oxigênio a maiores concentrações de soluto. Ainda com relação à Figura 14.b, constata-se que, de uma forma geral, os ensaios realizados com agitação igual ou maior a 500 rpm, apresentam valores de Q_X superiores a 0,30 g/L.h, sendo que os maiores valores

Figura 14 - Fatores de conversão de glicerol em células (a) e produtividade volumétrica em células (b) dos diferentes ensaios do planejamento fatorial 2^3 . Q_x calculado para 10 h de cultivo (tempo de esgotamento de substrato para um dos ensaios com concentração no nível inferior (-1)).

(0,58 a 0,62 g/L.h) são observados nos experimentos onde se utilizou uma agitação de 700 rpm, exceto para o ensaio 6 conduzido sob a concentração de 50 g/L de glicerol e 0,5 vvm. Este fato demonstra que, altos valores de agitação e aeração proporcionam uma maior transferência de oxigênio no meio, permitindo obter valores de velocidades específicas de crescimento elevado, em razão da maior disponibilidade de oxigênio para as células (Tabela 22). Conseqüentemente, menos

tempo é requerido para atingir máxima concentração de biomassa (WALKER, 1998; PINHEIRO; MOTTA; 2000).

Em condições de altos valores de aeração e agitação verificou-se um favorecimento do crescimento celular e consumo de glicerol durante o cultivo. Assim, a variação das respostas $Y_{X/S}$ e Q_X entre os ensaios do planejamento realizados com agitação de 700 rpm e 300 rpm, demonstra a importância desta variável sobre estes parâmetros.

Por outro lado, foi avaliado o comportamento cinético durante o cultivo da levedura *H.anomala* CCT 2648 sob as condições do ensaio 5. Na Figura 15 apresentam-se os valores das velocidades específicas de crescimento (μ_X) e consumo de glicerol (μ_S) durante o tempo de cultivo. A máxima velocidade específica de crescimento e consumo de glicerol foram 0,353 (1/h) e 0,542 (1/h), respectivamente. Verifica-se, ainda na Figura 15, que os valores máximos de μ_X e μ_S foram alcançados nas primeiras horas do cultivo, nas condições de menor concentração de glicerol (10 g/L) e elevada agitação (700 rpm).

Figura 15. Velocidades específicas de crescimento (○) e consumo de glicerol (△) durante o cultivo de *Hansenula anomala* CCT 2648 (10 g/L glicerol; 0,5 vvm e 700 rpm).

A relação das velocidades específicas de crescimento máximas e as concentrações de ribonucleotídeos totais produzidos em cada ensaio estão apresentadas na Tabela 21. Verifica-se que, para todos os ensaios do planejamento experimental, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi alcançada nas primeiras horas de cultivo (Tabela 22).

A maior concentração de ribonucleotídeos (15,32 mg/g) foi observado no ensaio que apresentou maior velocidade específica de crescimento, favorecido pelo elevado valor de agitação e menor concentração de glicerol estudada.

Por outro lado, observou-se que produção de ribonucleotídeos totais (RT) foi máxima em todos os casos na fase de crescimento exponencial. Este fato demonstra que o conteúdo de RT não se encontra diretamente relacionado com a concentração celular, mas com a maior taxa de crescimento celular.

Tabela 21. Concentração de ribonucleotídeos totais obtidos nos diferentes ensaios do planejamento 2³ durante o cultivo de *H. anomala* CCT2648 tempo de fermentação

Ensaio	Ribonucleotídeos totais (mg/g célula)											
	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h	16h	20h	24h	30h
1	5,83	7,78	9,06	10,60	9,36	8,45	8,57	7,29	7,19	6,89	5,81	6,37
2	5,30	6,14	6,43	5,89	5,55	6,48	4,98	4,74	5,03	4,37	3,69	3,16
3	7,37	7,84	8,27	8,19	9,56	11,17	7,73	5,97	5,68	6,36	5,78	5,97
4	8,26	7,99	5,79	6,95	6,96	9,81	6,91	4,99	9,00	9,25	8,36	10,62
5	8,14	8,68	9,09	9,39	15,32	13,37	13,68	12,18	11,22	10,57	9,78	8,47
6	8,68	9,03	9,48	8,99	9,39	8,96	13,13	10,01	10,29	4,69	3,55	4,06
7	4,51	6,27	6,98	7,51	10,54	7,07	8,23	7,12	7,43	7,04	6,94	6,45
8	4,86	6,34	5,53	4,61	7,34	3,96	5,00	4,07	4,10	4,27	3,82	3,69
9	5,78	6,34	6,01	6,32	7,16	7,79	13,26	7,66	5,96	6,34	6,79	6,60
10	6,16	6,37	5,92	6,36	6,37	9,85	12,95	7,73	7,46	6,62	6,58	6,45
11	5,47	6,20	7,42	6,50	5,92	8,64	14,08	8,08	5,96	6,05	6,58	3,81

Tabela 22. Velocidades específicas máximas de crescimento e rendimentos máximos de ribonucleotídeos totais nos diferentes ensaios do planejamento 2³

Ensaio	Níveis das variáveis			$\mu_{\max}^a$ (1/h)	¹ Tempo (h)	t_d (h)	² Tempo (h)	RT ^b (mg/g célula)	RT (% p/p)
1	-1	-1	-1	0,140	8	2,7	6	10,60	1,06
2	+1	-1	-1	0,092	6	3,2	10	6,48	0,65
3	-1	+1	-1	0,223	6	2,2	10	11,17	1,12
4	+1	+1	-1	0,174	6	2,5	10	9,81	0,98
5	-1	-1	⁺ ₁	0,353	4	1,7	8	15,32	1,53
6	+1	-1	⁺ ₁	0,196	4	2,4	12	13,13	1,31
7	-1	+1	⁺ ₁	0,233	4	2,2	8	10,54	1,05
8	+1	+1	⁺ ₁	0,213	4	2,2	8	7,34	0,73
9	0	0	0	0,318	4	1,8	12	13,26	1,33
10	0	0	0	0,322	4	1,8	12	12,95	1,30
11	0	0	0	0,344	4	1,9	12	14,08	1,41

^a Velocidades específicas determinadas pelo método proposto por LE DUY e ZAJIC (1973)

^b Rendimentos máximos de ribonucleotídeos totais (RT) encontrados em cada ensaio

t_d : tempo de duplicação

¹ Tempo em horas onde a velocidade específica determinado pelo método de LEDUY e ZAJIC (1973) foi máxima

² Tempo em horas onde se obteve o máximo rendimento em ribonucleotídeos totais.

Resultados semelhantes foram observados por Belem e Lee (1999) trabalhando com a levedura *Kluyveromyces marxianus var marxianus* ATCC 28244 em meio contendo lactose como fonte de carbono. Da mesma forma, Kim; Lee e Lee (2002) verificaram que durante o cultivo *Hansenula anomala* KCCM 11473 em meio contendo efluentes do processamento de extração de ginseng, o conteúdo de ribonucleotídeos totais aumenta nas primeiras horas de crescimento, diminuindo com o tempo de cultivo. Estes autores observaram ainda que a máxima concentração de ribonucleotídeos foi também alcançada na fase de crescimento exponencial e quando a velocidade específica máxima de crescimento foi alcançada.

Os valores máximos de RT encontrados no presente trabalho, foram obtidos na fase de crescimento exponencial, entretanto, essas concentrações foram alcançadas entre as 4 e 8 horas após atingir o valor de $\mu_{\max}$. Observa-se ainda na Tabela 22, que os maiores valores de $\mu_{\max}$ se relacionam com as maiores concentrações de ribonucleotídeos, sendo favorecidos sob condições de maior agitação (500-700 rpm).

A influência das variáveis investigadas, seus efeitos principais bem como a existência de efeitos de interação, pode ser melhor avaliada empregando-se a análise estatística. A significância dos efeitos e de suas interações sobre o fator de conversão ($Y_{X/S}$), produtividade em células (Q_X) e produção de ribonucleotídeos (RT) é apresentada em forma de gráfico de Pareto (Figura 16 a Figura 18) e confirmada pela análise de variância (Tabelas 23 a 25).

Na Tabela 23, nota-se que o maior efeito observado para a resposta fator de conversão foi a variável glicerol, que se apresentou ao nível de 95 % de confiança. Com relação à produtividade em células (Tabela 24), foi observado o efeito significativo (ao nível de 95 % de confiança) no fator agitação, não sendo estimada nenhuma interação significativa entre as variáveis estudadas.

Na análise da estimativa dos efeitos sobre a produção de ribonucleotídeos (Tabela 25), observa-se a significância dos fatores glicerol e agitação, e da interação dos fatores aeração e agitação ao nível de confiança de 95 %.

Os coeficientes de correlação (R^2) foram superiores a 0,90 para todas as respostas estudadas (Tabelas 23 a 25), o que demonstra a relevância das variáveis na bioconversão de glicerol de biodiesel. Os resultados da análise estatística confirmam os efeitos sugeridos pela análise direta dos dados, onde a agitação e

concentração de glicerol no meio são fatores relevantes na produção de células de *H. anomala* CCT 2648.

Figura 16 - Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) pelo gráfico de Pareto da variável resposta fator de conversão ($Y_{X/S}$) para o cultivo de *H.anomala* CCT 2648 em glicerol.

Tabela 23. Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre o fator de conversão ($Y_{X/S}$) durante o cultivo da levedura *H.anomala* CCT 2648 em meio contendo glicerol de biodiesel

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P
$Y_{X/S}$ (g/g)	A: Glicerol	- 0,0422	1	- 0,0422	99.59	0,0021*
	B: Aeração	0,0024	1	0,0024	5,80	0,0951
	C: Agitação	0,0008	1	0,0008	1,89	0,2624
	AA+BB+CC (curvatura)	0,0004	1	0,0004	1,04	0,3835
	AB	0,0045	1	0,0045	1,07	0,3778
	AC	0,0008	1	0,0008	1,89	0,2624
	BC	0,0002	1	0,0002	0,47	0,5407
	Falta de ajuste	0,0008	1	0,0008	3,43	0,2053
	Error total	0,0012	3			
$R^2=0,97$	Total	0,0484	10			

SQ: soma quadrática; GL: grau de liberdade; MQ: média quadrática. * significante ao intervalo de confiança do 95 %.

Figura 17 - Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) pelo gráfico de Pareto da variável resposta produtividade em célula (Q_x) para o cultivo de *H.anomala* CCT 2648 em glicerol.

Tabela 24. Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produtividade volumétrica em células (Q_x) durante o cultivo da levedura *H.anomala* CCT 2648 em meio contendo glicerol de biodiesel

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P
Q_x (g/L.h)	A: Glicerol	- 0,0060	1	- 0,0060	0,89	0,4151
	B: Aeração	0,0264	1	0,0264	3,89	0,1431
	C: Agitação	0,2048	1	0,2048	30,12	0,0119*
	AA+BB+CC (curvatura)	0,0340	1	0,0340	5,01	0,1111
	AB	0,0072	1	0,0072	1,06	0,3792
	AC	0,0084	1	0,0084	1,24	0,3462
	BC	0,0040	1	0,0040	0,60	0,4965
	Falta de ajuste	0,016	1	0,016	7,71	0,1089
	Error total	0,0204	3			
$R^2=0,93$	Total	0,3114	10			

SQ: soma quadrática; GL: grau de liberdade; MQ: média quadrática. * significativa ao intervalo de confiança do 95 %.

Figura 18 - Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) pelo gráfico de Pareto da variável resposta concentração de ribonucleotídeos para o cultivo de *H.anomala* CCT 2648 em glicerol.

Tabela 25. Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a concentração de ribonucleotídeos durante o cultivo da levedura *H.anomala* CCT 2648 em meio contendo glicerol de biodiesel

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P
RT (mg/g)	A: Glicerol	30,18	1	30,18	84,1	0,0027*
	B: Aeração	3,41	1	3,41	9,49	0,0541
	C: Agitação	15,56	1	15,56	43,37	0,0071*
	AA+BB+CC (curvatura)	16,73	1	16,73	46,61	0,0064*
	AB	1,94	1	1,94	5,41	0,1026
	AC	0,92	1	0,92	2,58	0,2068
	BC	8,90	1	8,90	24,81	0,0156*
	Falta de ajuste	0,29	1	0,29	0,38	0,5996
Error total		1,07	3	0,35		
R ² =0,98	Total	78,73	10			

SQ: soma quadrática; GL: grau de liberdade; MQ: média quadrática. * significativo ao intervalo de confiança do 95 %.

Tabela 26. Análise de variância da regressão para os modelos que representam o fator de conversão de glicerol em células, produtividade volumétrica em células e concentração de ribonucleotídeos por *H.anomala* CCT 2648

Modelo	SQ	GL	MQ	F	P	R ²
Y _{X/S}	0,047	6	0,0077	18,45	0,0182*	0,92
Q _X	0,26	6	0,0430	6,30	0,0459*	0,77
RT	60,93	6	10,16	2,42	0,2062	0,78

SQ: soma quadrática; GL: grau de liberdade; MQ: média quadrática. * significante ao intervalo de confiança do 95 %.

A partir dos resultados de análise de variância foram ajustados modelos que descrevem as respostas estudadas em função das variáveis, concentração de glicerol, aeração e agitação. Os modelos foram determinados através de regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados e expressos mediante as seguintes equações:

$$Y_1 = 0,51 - 0,072 A + 0,018 B + 0,010 C \quad (\text{Equação 1})$$

$$Y_2 = 0,36 - 0,027A + 0,058B + 0,16C \quad (\text{Equação 2})$$

Onde Y₁, Y₂, correspondem às respostas fator de conversão de glicerol em biomassa (Y_{X/S}) e produtividade volumétrica em células (Q_X), e A, B e C correspondem aos valores de concentração de glicerol, aeração e agitação, respectivamente.

A validade dos modelos propostos (equações 1 e 2) foi verificada por meio da análise de variância (Tabela 26) onde se constatou que as regressões obtidas foram estatisticamente significativas (p<0,05) para fator de conversão de glicerol em biomassa (Y_{X/S}) e produtividade volumétrica em células (Q_X). Entretanto, o modelo proposto para concentração de ribonucleotídeos (RT) demonstrou ser não

significativo, o que indicaria que o modelo linear não é adequado para representar os efeitos das variáveis estudadas sobre a produção de RT, devendo ser incluído novos níveis para essas variáveis com o fim de ampliar os limites do estudo. Esta análise ainda aponta que, ao nível de confiança de 95 % os modelos para $Y_{X/S}$ e Q_X não apresentaram falta de ajuste significativo, o que possibilitou a sua representação por meio de superfícies de resposta. As Figuras 19 e Figura 20 apresentam a influência das variáveis estudadas sobre o fator de conversão e produtividade em células para a levedura *H. anomala* CCT 2648 cultivada em meio contendo glicerol de biodiesel, respectivamente.

Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos da utilização de glicerol de biodiesel como substrato para a produção de biomassa e ribonucleotídeos, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos no presente trabalho.

Figura 19 - Superfície de resposta para a conversão de glicerol ($Y_{x/s}$) por *H. anomala* CCT 2648 em função das variáveis codificadas (Aeração 1,25 vvm).

Figura 20 - Superfície de resposta para a produtividade em células de *H. anomala* CCT 2648 em função das variáveis codificadas (Aeração fixada em 1,25 vvm)

CONCLUSÕES

O ácido fosfórico utilizado como acidulante no tratamento do glicerol obtido da produção de biodiesel permitiu uma adequada separação dos ácidos graxos presentes no sabão, gerando glicerol em uma concentração superior ao 90 % (p/v) e pH próximo 4,0.

Todas as leveduras estudadas apresentaram capacidade de crescimento em glicerol derivado do biodiesel sobre as condições experimentais utilizadas. As leveduras *Hansenula anomala* CCT 2048 e *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* CCT 4086 apresentaram uma maior capacidade de crescimento em glicerol quando comparadas com as demais estudadas.

O extrato de farelo de arroz favoreceu o crescimento das leveduras *Hansenula anomala* CCT 2648 e *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* CCT 4086 em meios contendo glicerol de biodiesel, porém, em menor grau quando comparado com extrato de levedura, na formulação dos meios de cultivo.

A levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 foi a escolhida para os estudos de produção de ribonucleotídeos a partir de glicerol por apresentar a maior concentração de biomassa, maior fator de conversão ($Y_{X/S}$) e maior produtividade volumétrica em células (Q_X), em relação às outras leveduras sob as mesmas condições estudadas.

A análise estatística das variáveis mais importantes para o crescimento de *Hansenula anomala* CCT 2648 demonstrou a influência significativa da temperatura e das concentrações de glicerol e extrato de levedura na produção de biomassa a partir de glicerol de biodiesel.

As variáveis concentração de glicerol e agitação exerceram influência significativa sobre os parâmetros $Y_{X/S}$ e Q_X durante o cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2648 em cultivos realizados em bioreator.

Os métodos de extração por autólise celular e ruptura mecânica empregados não apresentaram diferença considerável na concentração de ribonucleotídeos determinado pelo método de Orcinol.

A cinética da fermentação de glicerol para a levedura *Hansenula anomala* CCT 2648 permitiu estabelecer que o tempo de cultivo para a máxima produção de ribonucleotídeos totais encontra-se na fase exponencial de crescimento. O maior valor de concentração de ribonucleotídeos (15,32 mg/g) foi observado no ensaio que apresentou maior velocidade específica de crescimento, favorecido pelo elevado valor de agitação e menor concentração de glicerol estudada.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o potencial de utilização do glicerol derivado da fabricação de biodiesel como fonte de carbono de baixo custo para a produção de biomassa e ribonucleotídeos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem estabelecer novas estratégias para continuação deste estudo, como por exemplo:

Explorar o potencial das leveduras *Kluyveromyces marxianus var lactis* CCT 4086 e *Candida batistae* UFMG 96Y192 na produção de biomassa e ribonucleotídeos a partir de meio contendo glicerol de biodiesel, estabelecendo novas condições de cultivo que permitam otimizar a produção de biomassa e ribonucleotídeos.

Avaliar o efeito de extrato de farelo de arroz no crescimento das demais leveduras estudadas em meio contendo glicerol como fonte de carbono.

Estabelecer e adequar uma metodologia analítica que permita identificar e quantificar os principais ribonucleotídeos em função às bases por procedimentos cromatográficos.

Otimizar o processo de produção de ribonucleotídeos por *Hansenula anomala* CCT 2648 a partir de glicerol.

Explorar o potencial das demais leveduras na obtenção de biomoléculas, como por exemplo, etanol e ácidos orgânicos.

REFERÊNCIAS

AHN, W.S.; PARK, S .J., LEE SY. Production of poly(3-Hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3624-3627, 2000.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis -2006. Disponível em http://www.anp.gov.br/doc/audiencia_publica/minuta_Adiencia_Publica_03_2006.pdf. Acesso: 12 de março de 2007.

ANSELL, R.; GRANATH, K.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; ADLER, L. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaption and redox regulation. **EMBO Journal**, v.16, p.2179-2187, 1997.

BARBIRATO, F.; SOUCAILLE,F.; BORIES, A. Physiologic Mechanisms Involved in Accumulation of 3-Hydroxypropionaldehyde during Fermentation of Glycerol by *Enterobacter agglomerans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4405-4409, 1996.

BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Fed-batch fermentation to oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Process Biochemistry**, v.34, p.501-509, 1999.

BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ ,K. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: A case study in Turkey. **Renew Sustainable Energy Reviews** (in press) DOI:10.1016/j.rser.2006.07.016, 2006.

BIODIESELBRASIL. Biodiesel inunda mercado no país e derruba preços. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/glicerina-biodiesel-inunda-mercado-pais-derruba-precos-02-05-07.htm>, 2007. Acesso: junho 2007.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.1087-1092, 1989.

BRISSON, D.; VOHL, M-C.; ST-PIERRE, J; HUDSON, T.J.; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes?. **BioEssays**, v.23, p.534-542, 2001.

BUCK, R.H.; THOMAS, D.L.; WINSHIP, T.R.; CORDLE, C.T.; KUCHAN, M.J.; BAGGS, G.E.; SCHALLER, J.P.; WHEELER, J.G. Effect of Dietary Ribonucleotides on Infant Immune Status. Part 2: Immune Cell Development. **Pediatric Research**, v.56, n.6, p.891-900, 2004.

CANETTIERI, E. V.; ALMEIDA E SILVA, J. B. FELIPE, M. G. A, Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.94, p.159-168, 2001.

CBS. Culture Collections.Yeast, Netherlands, 2006. <http://www.cbs.knaw.nl/Yeast/BioloMICS.aspx?Link=T&DB=0&Table=0&Descr=CBS+5914&Fields=All&ExactMatch=t>. Acesso em: 3 de outubro de 2006.

ÇELİK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; ÇALIK, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for Fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial and Engineering Chemistry research**, v.47, p. 2985-2990, 2008

CHANDRASHEKAR, J.; HOON, M.A.; RYBA, N.J.P.; ZUKER, C.S. The receptors and cells for mammalian taste. **Nature**, v.444, p.288-294,2006. DOI:10.1038/nature05404.

CHENG, K-K.; ZHANG, J-A.; LIU, D-H.; SUN, Y.; LIU, H-J.; YANG, M-D.; XU J-M. Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochemistry**, v.42, p.740-744, 2007.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Biotechnology. In: **A textbook of Industrial Microbiology**. Sunderland-USA: Science Tech.Publishers, 1990, p.175-187

DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. **Applied Environment and Microbiology**, v.58, p.1233-1239, 1992.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalist A-Gen** v.28, p.225-23, 2005.

DILLIS, S.S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, M.R.; SAIER, M.H. Carbohydrate transport in bacteria. **Microbiology Reviews**, v.44, p.385-418, 1980.

DEMAIN, A.L.; BURG, R.W.; HENDLIN, D. Excretion and Degradation of Ribonucleic Acid by *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.89, n.3, p.640-646, 1965.

FRIEDRICH, S.A. World wide review of the commercial production of biodiesel. A technological, economic and ecological investigation based on case studies. Insitute for Technology and Sustainable Product Management, Austria, 2004. Disponível em: http://itnp.wu-wien.archiv_doc/BAND41_FRIEDRICH.PDF. Acesso: 10 de abril de 2007.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, I. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, p.405-416, 2001.

GANCEDO, C; GANCEDO, J.M; SOLS, A. Glycerol Metabolism in Yeasts. **European Journal of Biochemistry**, v.6, n.2, p.165-172, 1968.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. In: Rose AH, Harrison JS (eds) **The yeasts III**. New York: Academic Press, 1989, p. 205–259.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; ANDRADE J.C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P, Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Metabolic Engineering**. v.7, p.329-336, 2005.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; SOUCAILLE, P.; VASCONCELOS, I. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol: Physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). **Applied and Environment Microbiology**, v.72, p. 96-101, 2006.

GRAUSLUND M, LOPES JM, RONNOW B (1999) Expression of GUT1, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.4391-4398., 1999.

GRAUSLUND, M.; RONNOW, B. Carbon source-dependent transcriptional regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, GUT2, from *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.1096-1100, 2000.

HAUGE, J.G.; KING, T.E.; CHELDELIN, V.H. Oxidation of dihydroxyacetone via the pentose cycle in *Acetobacter suboxydans*. **Journal of Biological Chemistry**, v.214, p.11-16, 1955.

HERBERT, D.; PHIPPS, D.J.; STRANGE, R.E.. Chemical analysis of microbial cells. In: *Methods in Microbiology*, London: Academic Press, 1971, p.209-344

HGCA. Disponível em: http://hgca.com/document.aspx?fn=load&media_id=3605&publicationId=236, 2007. Acesso:5 de julho 2007.

HOLST, B.; LUNDE, C.; LAGES, F.; OLIVEIRA, R.; LUCAS, C.; KIELLAND-BRANDT, M. *GUP1* and its close homologue *GUP2*, encoding multimembranespanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v.37, p.108-124, 2000.

HUANG, H-S.; YOSHIDA, T.; MENG, Y.; KABASHIMA, T.; ITO, Y.; NISHIYA, Y.; KAWAMURA, Y.; YOSHIMOTO, T. Purification and Characterization of Thermostable Glycerol Kinase from *Thermus flavus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 328-332, 1997.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**. v.46, p.205-29, 2003.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.3, p.260-265, 2005.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. Patogenia e controle das doenças virais. Em: **Microbiologia Médica**. Editora Guanabara Koogan S.A, 1998, p.264-266.

KIM, J.H.; LEE, B.H.; LEE, J.S. Production of Ribonucleotides by Autolysis of *Hansenula anomala* Grown on Korean Ginseng Steaming Effluent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.93, n.3, p.318-321, 2002.

KUNINAKA, A. Nucleotides and Related Compounds .Em: **Biotechnology**. (Roehr M. Editor), VCH Verlagsgesellschaft mbH & VCH Publishers Inc., 1996, v.6, p.561-612.

LAGES, F.; LUCAS, C. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry and Biophysics Acta** , v.1322, p.8-18, 1997.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, v.45, p.2577-2585, 1999.

LIMA, D.O.; SOGABE, V.P.; CALARGE, T.C. Mercado do biodiesel: um panorama mundial. **Espacios**, v.29, p.1-4, 2008.

LUYTEN, K.; ALBERTYN, J.; SKIBBE, W.F.; PRIOR, B.A.; RAMOS, J.; THEVELEIN J.M.; HOHMANN, S. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. **EMBO Journal**, v.14, p.1360-71, 1995.

MNE - **Ministério de Minas e Energia**. Apresentação do ministro Silas Rondeau sobre o PAC (Infra-Estrutura Energética) na Câmara dos Deputados – 15/03/2007. Disponível em: http://www.mme.gov.br/site/menu/select_main_menu_item.do?channelId=9771. Acesso em: 11 de março de 2007.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. Central pathways of carbohydrate metabolism. Em: **Microbial physiology**, Moat AG, Foster JW and Spector MP(eds), New York: Wiley-Liss, 2002, p.363.

NAKAMURA, C.E.; GATENBY, A.A.; HSU, A.K-H.; LA-REAU, R.D.; HAYNIE, S.L.; DIAZ-TORRES, M.; TRIMBUR, D.E.; WHITED, G.M.; NAGARAJAN. V.; PAYNE, M.S.; PICATAGGIO, S.K.; NAIR, V.R. Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant microorganisms. **US Patent 6,013,494**, 11 Jan 2000.

NCYC. Yeast Identification, Culture and Safe Deposit Services, United Kingdom. Disponível em: <http://www.ncyc.co.uk/>. Acesso: 3 de outubro 2006.

NEVES, L.; LAGES, F.; LUCAS, C. New insights on glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v.565, p.160-162, 2004.

NEVES, L. **Glycerol transport in yeast: physiological, molecular and phylogenetic approaches**. Tese de Doutorado. Escola de Ciências. Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2004.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p.231-241, 1997.

OECD SIDS. Glycerol. CAS ^oN: 56-81-5. **SIDS Initial Assessment Report**. UNEP Publications, Paris, France, 2002.

OGRODOWSKI, R. **Produção de Biomassa a partir de Soro de Queijo para Obtenção de Ribonucleotídeos**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 2006.

OHNISHI, T., OHNISHI, K., WANG, X., TAKAHASHI, A.; OKAICHI, K. Restoration of mutant *TP53* to normal *TP53* function by glycerol as a chemical chaperone. **Radiation Research**, v.151, p.498-500, 1999.

OLIVEIRA, L.B.; ARAUJO, M.S.; ROSA, L.P; BARATA, M.; LA ROVERE, E. Analysis of the sustainability of using wastes in the Brazilian power industry. **Renew Sustainable Energy Reviews**, v. 12, p. 883-890, 2008.

OLIVEIRA, M. Petroquímica Verde. **Pesquisa. FAPESP**, v.149, p.84-87, 2008

OLIVEIRA, R., LAGES, F., SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Fps1p channel is a mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*. Artefacts and re-definitions, **Biochemistry and Biophysics Acta** , v.1613, p.57-71, 2003.

OOI, K.T.; YONG, K.C.; HAZIMAH, A.H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z. Glycerol residue. A rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**, v.53, p.29-33, 2004.

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

PCB-Planta compacta de biodiesel 7500 l por dia. Dados economicos para a produção. Disponível em: <http://www.plantebiodiesel.com.br/%20CD/22%20-MANUAIS%20DO%20BIODIESEL%20%20USINA%20COMPACTA-BIODIESELBR-75000LTS.DIA.pdf>, Acesso em: Julho 2007

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J.F.; COLLANTES DE TERAN, L.; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. **Food Chemistry**, v. 98, p. 742-748, 2006.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, p.756-762, 2000.

PNPB - Programa nacional de produção e uso de biodiesel. Disponível em: http://www.biodiesel.gov.br/docs/Folder_biodiesel_portugues_paginad.pdef. Acesso em: 12 março de 2007.

REMIZE, F.; BARNAVON, L.; S. DEQUIN, S. Glycerol Export and Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase, but Not Glycerol Phosphatase, Are Rate Limiting for Glycerol Production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v.3, p. 301–312, 2001.

REVILLION, J. P.; BRANDELLI, A.; AYUB, M.A.Z. Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n., p.121-127, 2003.

REVILLION, J.P.; BRANDELLI, A. AYUB, M.A.Z.. Production of yeast extracts from whey for food use, market and technical considerations. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, p. 246-249.

RYMOWICZ, W.; RYWINSKA, A.; ZAROWSKA, B.; JUSZCZYK, P. Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. **Chemistry Papers**, v.60, p.391-394, 2006.

SARROUH, B.F.; SILVA, S.S.; SANTOS, D.T.; CONVERTI, A.; TechnicalEconomical Evaluation of Sugarcane Bagasse Hydrolysis for Bioethanol Production **Chemical Engineering and Technology** , v.30, p.270-275, 2007.

SASAKI, K.; WATANABE, M.; SUDA, Y.; ISHIZUKA, A.; NOPARATNARAPORN, N. Applications of Photosynthetic Bacteria for Medical Fields. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n.5, p.481-488, 2005.

SCHALLER, J.P.; BUCK, R.H.; RUEDA, R. Ribonucleotides: Conditionally essential nutrients shown to enhance immune function and reduce diarrheal disease in infants. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v 12, p. 326-328, 2007.

SCHALLER, J.P.; KUCHAN, M.J.; THOMAS D.L.; CORDLE, C.T.; WINSHIP, T.R.; BUCK, R.H.; BAGGS, G.E.; WHEELER, J.G. Effect of Dietary Ribonucleotides on Infant Immune Status. Part 1: Humoral Responses. **Pediatric Research**, v.56, n.6, p.883-890, 2004.

SERIO, M.; ARAMO, P.; ALTERIIS, E.; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. Quantitative Analysis of the Key Factors Affecting Yeast Growth. **Industrial Engineering and Chemistry Research**, v.42, p.5109-5116, 2003.

SIMONI, I.C. Tratamentos antivirais. **Biológico**, São Paulo, v.65, p.41-44, 2003.

SPRAGUE, G.F.; CRONAN, J.E. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism. **Journal of Bacteriology**, v.129, p.1335-1342, 1977.

SLOBODIANIK, N.H. Dietary ribonucleotides and health. **Nutrition**, v.19, n.1, p. 68-69, 2003.

SSEB - SOUTHERN STATES ENERGY BOARD (2005). Developing State Policies Supportive of Bioenergy Development. Technical progress report submitted to U.S. Department of Energy National Energy Technology Laboratory. Disponível em : www.osti.gov/bridge/servlets/purl/837189-Yhbgdr/native/837189.pdf. Acesso em: 20 junho de 2007.

STAMBUK, B. U. A simple laboratory exercise illustrating active transport in yeast cells **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v.28, p. 313-317, 2000.

SUTHERLAND, F.C.W.; LAGES, F.; LUCAS, C.; LUYTEN, K.; ALBERTYN, J.; HOHMANN, S.; PRIOR, B.A.; KILIAN, S.G.; Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.7790-7795, 1997.

TANI, Y.; YAMADA, K. Glycerol Metabolism in Methylotrophic Yeasts. **Agriculture and Biological Chemistry**, v.51, n.7, p.1927-1933, 1987.

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

TKÁČ, J.; NAVRÁTILA, M.; ŠTURDÍK, E.; GEMEINER, P. Monitoring of Dihydroxyacetone Production during Oxidation of Glycerol by Immobilized *Gluconobacter oxydans* Cells with an Enzyme Biosensor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.383-388, 2001.

TSURUTA, T.; ISHIMOTO, Y.; MASUOKA, T. Effects of glycerol on intracellular ice formation and dehydration onion epidermis. **Annual New York. Academic. Science**, v.858, p. 217-26, 1992.

VOEGELE, R.T.; SWEET, G.D.; BOOS, W. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.1087-1094, 1993.

WANG, Z-X.; ZHUGE, J.; FANG, H. ; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**. v.19, p.201-223, 2001.

WAGNER, D.R. Hyperhydrating with glycerol: Implications for athletic performance. **Journal of American Dietary Association**, v.99, p.207-212, 1999.

WATANABE, Y.; TAKAKUWA, M. Change of lipid composition of *Zygosaccharomyces rouxii* after transfer to high sodium chloride culture medium. **Journal of Fermentation Technology**. v.65, p.365-369, 1987.

WALKER, G.M. Yeast Metabolism. In: **Yeast Physiology and Biotechnology**. London – England: John Wiley & Sons, 1998, p 233.

XIU, Z-L.; CHEN, X.; SUN, Y-Q.; ZHANG, D-J. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumonia* under microaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v.33, p.42-45, 2007.

YANG, X.J.; KOW, L.M.; FUNABASHI, T.; MOBBS, C.V. Hypothalamic glucose sensor. Similarities to and differences from pancreatic b-cell mechanisms. **Diabetes**, v.48, p.1763-1772, 1999.

YAMAGUCHI, S.; NINOMIYA, K. The use and utility of glutamates as flavoring agents in food. **Journal of Nutrition**, v.130, p.921S-926S, 2000.

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

YONG, K.C.; OOI, T.L.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z.; HAZIMAH, A.H. Refining of crude glycerine recovered from glycerol residue by simple vacuum distillation. **Journal of Oil Palm Research**, v.13, p.39-44, 2001.

ZHAO, Y-N.; CHEN, G.; YAO, S-J. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemistry Engineering Journal**, v.32, p.93-99, 2006.

ZHENG, Z-M.; HU, Q-L.; HAO, J.; XU, F.; GUO, N-N.; SUNA, Y.; LIU, D-H. Statistical optimization of culture conditions for 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* AC 15 via central composite design. **BioresoucesTechnology**, 2007. In press. DOI:10.1016/j.biortech.2007.02.038

APÊNDICES

APENDICE A

Figura A1 - Efeito da concentração de extrato de farelo de arroz (EFA) na concentração de células, concentração de glicerol e pH do meio para a levedura *Hansenula anomala* CCT 2648 cultivada em meio contendo glicerol; EFA: 1 % (v/v) (◇), 8 % (v/v) (□) e 15 % (v/v).

Figura A2 - Efeito da concentração de extrato de farelo de arroz (EFA) na concentração de células, concentração de glicerol e pH do meio para a levedura *Kluyveromyces marxianus var lactis* CCT 4086 cultivada em meio contendo glicerol; EFA: 1 % (v/v) (◇), 8 % (v/v) (□) e 15 % (v/v).

APÊNDICE B

Figura B1- Variação das concentrações de glicerol (□), células (○) e ribonucleotídeos (▲) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 1.

Tabela B1- Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos (Ensaio 1).

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	dx/ds (g/g)	μ_x (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo de glicerol (%)
0	10,0	0,94	0,00	0,000	5,83	84,1
2	9,62	1,00	0,17	0,079	7,78	
4	9,00	1,25	0,32	0,111	9,06	
6	8,75	1,55	0,49	0,112	10,60	
8	7,73	1,95	0,45	0,140	9,36	
10	7,10	2,39	0,50	0,076	8,45	
12	6,69	2,79	0,56	0,056	8,57	
14	6,03	3,30	0,59	0,074	7,29	
16	5,06	3,77	0,57	0,056	7,19	
20	3,84	4,40	0,56	0,044	6,89	
24	2,51	5,33	0,59	0,031	5,81	
30	1,59	5,75	0,57	0,012	6,37

Figura B2- Variação das concentrações de glicerol (□), células (○) e ribonucleotídeos (▲) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 2.

Tabela B2- Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos (Ensaio 2).

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	dx/ds (g/g)	μ_x (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo de glicerol (%)
0	50,46	0,98	0,00	0,000	5,30	21,6
2	48,90	1,28	0,19	0,140	6,14	
4	48,14	1,69	0,31	0,077	6,43	
6	47,66	1,80	0,30	0,092	5,89	
8	46,36	2,37	0,34	0,075	5,55	
10	46,24	2,91	0,46	0,068	6,48	
12	45,46	3,07	0,42	0,076	4,98	
14	42,10	3,46	0,30	0,039	4,74	
16	43,59	3,61	0,38	0,034	5,03	
20	41,99	4,46	0,41	0,039	4,37	
24	41,09	5,01	0,43	0,024	3,69	
30	39,56	5,55	0,42	0,016	3,16

Figura B3- Variação das concentrações de glicerol ($\square$), células ($\circ$) e ribonucleotídeos ($\blacktriangle$) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 3.

Tabela B3- Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos (Ensaio 3).

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	dx/ds (g/g)	μ_x (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo de glicerol (%)
0	10,06	0,99	0,00	0,000	7,37	100
2	9,80	1,13	0,15	0,079	7,84	
4	9,14	1,34	0,22	0,184	8,27	
6	8,71	2,16	0,56	0,223	8,19	
8	7,61	3,29	0,72	0,093	9,56	
10	6,73	3,51	0,62	0,088	11,17	
12	5,22	4,66	0,66	0,093	7,73	
14	3,76	5,29	0,61	0,064	5,97	
16	2,44	6,00	0,60	0,039	5,68	
20	1,94	6,11	0,58	0,004	6,36	
24	0,46	6,20	0,50	0,001	5,78	
30	0,00	6,08	0,47	0,000	5,97

Figura B4 - Variação das concentrações de glicerol (□), células (○) e ribonucleotídeos (▲) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 4.

Tabela B4- Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos Ensaio 4).

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	dx/ds (g/g)	μ_x (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo de glicerol (%)
0	50,70	0,96	0,00	0,000	8,26	33,7
2	50,20	1,20	0,49	0,169	7,99	
4	48,44	1,77	0,36	0,148	5,79	
6	46,50	2,25	0,31	0,174	6,95	
8	44,00	3,43	0,37	0,056	6,96	
10	45,60	3,22	0,44	0,049	9,81	
12	43,67	4,17	0,46	0,128	6,91	
14	40,70	5,38	0,44	0,088	4,99	
16	38,00	6,11	0,41	0,062	9,00	
20	36,30	7,74	0,47	0,042	9,25	
24	35,65	8,74	0,52	0,023	8,36	
30	33,60	9,53	0,50	0,014	10,62

Figura B5 - Variação das concentrações de glicerol (□), células (○) e ribonucleotídeos (▲) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 5

Tabela B5 - Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos (Ensaio 5).

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	$\frac{dx}{ds}$ (g/g)	μ_x (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo de glicerol (%)
0	9,99	0,95	0,00	0,000	8,14	100
2	9,17	1,09	0,17	0,315	8,68	
4	7,45	2,64	0,66	0,353	9,09	
6	4,76	4,48	0,67	0,124	9,39	
8	1,92	5,15	0,52	0,101	15,32	
10	0,00	6,72	0,58	0,047	13,37	
12	0,00	6,77	0,58	0,000	13,68	
14	0,00	6,64	0,57	0,000	12,18	
16	0,00	6,75	0,58	0,000	11,22	
20	0,00	6,73	0,58	0,000	10,57	
24	0,00	6,74	0,58	0,000	9,78	
30	0,00	6,56	0,56	0,000	8,47

Figura B6 - Variação das concentrações de glicerol (□), células (○) e ribonucleotídeos (▲) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 6

Tabela B6 - Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos (Ensaio 6).

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	dx/ds (g/g)	μ_x (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo de glicerol (%)
0	49,02	1,01	0,00	0,000	8,68	97,7
2	48,58	1,16	0,47	0,102	9,03	
4	42,58	1,48	0,07	0,196	9,48	
6	38,68	2,37	0,13	0,170	8,99	
8	34,90	3,10	0,15	0,140	9,39	
10	35,76	4,13	0,24	0,184	8,96	
12	33,81	6,67	0,37	0,184	13,13	
14	26,35	9,04	0,35	0,170	10,01	
16	16,34	14,87	0,42	0,063	10,29	
20	5,43	16,65	0,36	0,040	4,69	
24	3,45	20,90	0,44	0,024	3,55	
30	1,12	21,44	0,43	0,004	4,06

Figura B7 - Variação das concentrações de glicerol (□), células (○) e ribonucleotídeos (▲) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 7

Tabela B7 - Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos (Ensaio 7).

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	dx/ds (g/g)	μ_x (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo de glicerol (%)
0	10,27	1,01	0,00	0,000	4,51	100
2	9,65	1,19	0,30	0,212	6,27	
4	8,95	2,14	0,86	0,233	6,98	
6	7,89	3,01	0,84	0,211	7,51	
8	3,71	4,82	0,58	0,183	10,54	
10	0,74	6,87	0,62	0,199	7,07	
12	0,00	6,80	0,56	0,000	8,23	
14	0,00	6,82	0,57	0,000	7,12	
16	0,00	6,89	0,57	0,000	7,43	
20	0,00	6,88	0,57	0,000	7,04	
24	0,00	6,88	0,57	0,000	6,94	
30	0,00	6,18	0,50	0,000	6,45

Figura B8 - Variação das concentrações de glicerol ($\square$), células ($\circ$) e ribonucleotídeos ($\blacktriangle$) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 8

Tabela B8 - Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos (Ensaio 8).

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	dx/ds (g/g)	μ_x (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo de glicerol (%)
0	50,90	0,95	0,00	0,000	4,86	99,7
2	49,06	1,32	0,20	0,212	6,34	
4	48,00	2,09	0,39	0,213	5,53	
6	44,68	3,41	0,40	0,211	4,61	
8	40,74	4,98	0,40	0,183	7,34	
10	32,66	7,16	0,34	0,199	3,96	
12	30,70	12,61	0,58	0,079	5,00	
14	25,60	14,00	0,52	0,065	4,07	
16	18,30	16,60	0,48	0,057	4,10	
20	4,43	18,95	0,39	0,041	4,27	
24	1,60	23,37	0,45	0,018	3,82	
30	0,08	23,08	0,43	0,000	3,69

Figura B9 - Variação das concentrações de glicerol (□), células (○) e ribonucleotídeos (▲) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 9

Tabela B9 - Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos (Ensaio 9).

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	dx/ds (g/g)	μ_x (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo de glicerol (%)
0	31,61	0,98	0,00	0,000	5,78	94,3
2	30,90	1,00	0,03	0,102	6,34	
4	30,50	1,39	0,37	0,318	6,01	
6	28,10	3,09	0,60	0,296	6,32	
8	24,60	5,07	0,58	0,131	7,16	
10	22,16	5,99	0,53	0,116	7,79	
12	20,60	8,23	0,66	0,134	13,26	
14	16,77	10,39	0,63	0,059	7,66	
16	14,65	11,12	0,60	0,042	5,95	
20	6,88	14,22	0,54	0,030	6,34	
24	3,78	15,02	0,50	0,011	6,79	
30	1,81	15,70	0,49	0,007	6,60

Figura B10 - Variação das concentrações de glicerol ($\square$), células ($\circ$) e ribonucleotídeos ($\blacktriangle$) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 10

Tabela B10 - Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	dx/ds (g/g)	μ_{max} (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo glicerol (%)
0	30,50	0,94	0,00	0,000	6,16	96,6
2	30,00	0,99	0,13	0,117	6,37	
4	29,21	1,41	0,38	0,322	5,92	
6	25,10	3,15	0,41	0,305	6,36	
8	24,60	5,29	0,74	0,134	6,37	
10	20,84	6,28	0,56	0,106	9,85	
12	18,30	8,11	0,59	0,122	12,95	
14	14,77	10,29	0,60	0,063	7,73	
16	10,12	11,12	0,50	0,043	7,46	
20	4,59	13,67	0,49	0,040	6,62	
24	2,97	15,50	0,53	0,016	6,58	
30	1,01	15,43	0,49	0,000	6,45

Figura B11 - Variação das concentrações de glicerol (□), células (○) e ribonucleotídeos (▲) em função do tempo de cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 obtidas no ensaio 11

Tabela B11 - Resultados das análises do cultivo da levedura *Hansenula anomala* CCT 2048 em meio contendo glicerol para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos

Tempo (h)	Glicerol (g/L)	Células (g/L)	dx/ds (g/g)	μ_x (1/h)	Ribonucleotídeos (mg/g célula)	Consumo glicerol (%)
0	30,32	0,98	0,00	0,000	5,47	96,7
2	30,10	1,01	0,15	0,109	6,20	
4	24,36	1,43	0,08	0,344	7,42	
6	27,45	3,08	0,73	0,310	6,50	
8	22,60	6,12	0,67	0,020	5,92	
10	23,00	5,41	0,60	0,025	8,64	
12	19,21	7,49	0,59	0,065	14,08	
14	15,01	10,59	0,63	0,054	8,08	
16	12,65	11,12	0,57	0,037	5,96	
20	5,34	14,94	0,56	0,028	6,05	
24	3,01	14,49	0,53	0,004	6,58	
30	1,00	15,20	0,48	0,000	3,81

Figura B12 - Regressões lineares de ΔX em função de $(-\Delta S)$ para cálculo do fator de conversão de glicerol ($Y_{X/S}$) em células de *H.anomala* CCT 2648. O valor de $Y_{X/S}$ está dado pelo coeficiente angular da equação.

APÊNDICE C

Figura C1. Curvas-padrão que relacionam absorbância e concentração celular para cada uma das leveduras cultivadas em meio contendo glicerol de biodiesel.