UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL

TATIANE FABRÍCIA DA SILVA RODRIGUES BENTO

**Produção de lipídeos microbianos por leveduras empregando glicerol como
principal fonte de carbono**

Lorena-SP

Fev-2017

TATIANE FABRÍCIA DA SILVA RODRIGUES BENTO

Produção de lipídeos microbianos por leveduras empregando glicerol como principal fonte de carbono

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Novos materiais e Química fina.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Alves Silva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena-SP

2017

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.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bento, Tatiane Fabrícia da Silva Rodrigues
Produção de lipídeos microbianos por leveduras
empregando glicerol como principal fonte de carbono
/ Tatiane Fabrícia da Silva Rodrigues Bento;
orientador João Paulo Alves Silva - ed. reimp.,
corr. - Lorena, 2017.
141 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química na Área de Novos
Materiais e Química Fina) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientador: João Paulo Alves Silva

1. Leveduras oleaginosas. 2. Óleo microbiano. 3.
Glicerol. 4. Rhodotorula glutinis. I. Título. II.
Silva, João Paulo Alves, orient.

Dedico este trabalho ao meu marido Renato, à minha família pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos e por me incentivarem na realização deste grande desafio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, e a Nossa Senhora por intercederem por mim.

Ao meu Marido Renato, pela ajuda, apoio e amor.

Ao Prof. Dr. João Paulo Alves Silva, pela oportunidade, orientação, pela paciência, pelo aprendizado adquirido e pela contribuição para meu crescimento científico.

À Escola de Engenharia de Lorena, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Capes e a Fapesp (Processo 2016/06683-0) pelo apoio financeiro concedido.

Aos alunos de iniciação científica e amigos de laboratório Bruna, Camila, Letícia, Natalia e Vitor que me auxiliaram na realização dos experimentos.

À professora Dr. Inês Conceição Roberto por me permitir utilizar toda a infraestrutura do laboratório sob sua coordenação.

Aos professores Dr. Lívia Melo Carneiro e Dr. Marco Antônio Pereira pela supervisão no Estágio Supervisionado.

E a todas as pessoas que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

BENTO, T. F. S. R., **Produção de lipídeos microbianos por leveduras empregando glicerol como principal fonte de carbono**. 2016. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

Atualmente há uma busca crescente por fontes energéticas renováveis motivada principalmente por razões ambientais e estratégicas, tais como o acúmulo de poluentes na atmosfera decorrente do uso de combustíveis fósseis e a diminuição de suas reservas. O biodiesel tem atraído atenção cada vez maior por sua capacidade em substituir o diesel do petróleo. A maior parte do biodiesel produzido utiliza como matéria-prima os óleos vegetais, os quais apresentam como principais desvantagens a sazonalidade na produção devido aos períodos de safra e a competição no uso de terras agrícolas com a produção de alimentos. Uma alternativa capaz de possibilitar a redução do uso de óleos vegetais são os óleos microbianos, como os produzidos por microalgas, fungos filamentosos e leveduras. Os lipídeos produzidos por leveduras constituem uma fonte interessante de matéria-prima renovável para a produção de biocombustíveis, pois é independente das mudanças climáticas e sazonalidade, como as culturas vegetais. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo contribuir para o desenvolvimento de tecnologias voltadas para produção de óleos microbianos em cultivos heterotróficos. Neste sentido foram desenvolvidos estudos buscando selecionar leveduras capazes de produzir lipídeos tendo glicerol como substrato, bem como estabelecer as condições de cultivo mais favoráveis para a produção e acúmulo de lipídeos pela levedura selecionada. Para a seleção de microrganismos foram realizados ensaios visando comparar cinco diferentes leveduras (*Cryptococcus curvatus* Y-1511, *Lipomyces starkeyi* Y-27493, *Rhodotorula glutinis* Y-12905, *Rhodospiridium toruloides* Y-1091 e *Rhodotorula mucilaginosa* Y-27053), neste estudo verificou-se que as cinco leveduras avaliadas foram capazes de consumir substrato, crescer e produzir lipídeos durante os cultivos. Dentre as leveduras avaliadas a *Rhodotorula glutinis* Y-12905 e *Cryptococcus curvatus* Y-1511 foram as que apresentaram as maiores produtividades volumétricas em lipídeos, alcançando valores entre 0,20 e 0,23 g/L.dia, respectivamente. Quanto à capacidade de consumo de substrato a *R. glutinis* se destacou em relação as demais leveduras tendo sido capaz de consumir cerca de 59% do glicerol após 120 horas de cultivo, consumo este que representa quase duas vezes o valor alcançado pela *C. curvatus*, que apresentou o segundo maior consumo de substrato. Devido a sua elevada capacidade de assimilação de glicerol e apresentando uma das maiores produtividades volumétricas de lipídeos entre as leveduras avaliadas a levedura *Rhodotorula glutinis* foi considerada como uma das mais promissoras para a obtenção de óleos microbianos empregando glicerol como substrato. Nos ensaios realizados com diferentes agitações e razões de volume de frasco por volume de meio verificou-se que quanto maior a disponibilidade de oxigênio, maior foi o acúmulo de lipídeos, o crescimento celular e o consumo de glicerol. Quanto à avaliação da composição nutricional a presença de fontes de nitrogênio orgânico, tais como extrato de levedura e peptona mostraram-se fundamentais para o processo de produção de óleos microbianos juntamente com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Quando estes nutrientes estavam presentes de forma combinada foram obtidas concentrações de até 4,4 g/L de lipídeos e produtividades de 0,43 g/L.dia. Na avaliação da influência do pH inicial e da razão carbono/nitrogênio (C:N), verificou-se que o acúmulo de lipídeos pela levedura é favorecido para cultivos realizados em pH inicial entre 6 e 7, e com razão C:N entre 30:1 e 50:1. Em tais condições a levedura foi capaz de acumular até 8 g/L de lipídeos com produtividade de até 0,82 g/L.dia. A composição do óleo microbiano obtido pela levedura revelou elevados teores dos ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2), os quais correspondem a 99% de sua composição. O óleo apresentou um comportamento de fluido newtoniano com viscosidade de 39,3 cP à 50°C, tendo um índice de acidez de $5,8 \pm 0,2 \text{ mgKOH/g}_{\text{óleo}}$ e teor de ácido graxos de $1,93 \pm 0,08 \%$.

Palavras-chave: Leveduras oleaginosas, Óleo microbiano, Glicerol, *Rhodotorula glutinis*.

ABSTRACT

BENTO, T. F. S. R., **Production of lipids microbial yeast using glycerol as the main carbon source**. 2016. 141 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

Currently, there is a search for renewable energy sources motivated mainly by environmental and strategic reasons, such as the concept of solutions for the development of fossil fuel use and a decrease of its reserves. Biodiesel has attracted increasing attention for its ability to replace diesel oil. Most of the biodiesel produced uses vegetable oils as raw material, which has as main disadvantages the seasonality and a competition in the use of agricultural land with a food production. An alternative capable of reducing the use of vegetable oils is the use of microbial oils, such as those produced by microalgae, fungi and yeasts. The lipids produced by yeasts are an interesting source of renewable raw material for biofuel production, because it is independent of climatic changes and seasonality, such as vegetable crops. In this way, the present study aims to contribute to the development of technologies of microbial oils production in heterotrophic cultures. In this sense, studies were developed to select yeasts capable of producing lipids having glycerol as substrate, as well as to establish the culture conditions more favorable for the production and accumulation of lipids by the selected yeast. For a selection of microorganisms assays were carried out aiming to compare five different yeasts (*Cryptococcus curvatus* Y-1511, *Lipomyces starkeyi* Y-27493, *Rhodotorula glutinis* Y-12905, *Rhodospiridium toruloides* Y-1091 and *Rhodotorula mucilaginosa* Y-27053). In this step it was verified that the five yeasts evaluated were able to consume substrate, grow and produce lipids during the cultures. Among the evaluated yeasts, *Rhodotorula glutinis* Y-12905 and *Cryptococcus curvatus* Y-1511 has presented the highest volumetric lipid yields, reaching values between 0.20 and 0.23 g/L.day, respectively. Regarding the substrate consumption capacity, *R. glutinis* stood out in relation to other yeasts, being able to consume about 59% of glycerol after 120 hours of cultivation. Due to its high capacity for assimilation of glycerol and presenting one of the highest volumetric productivities of lipids among evaluated yeasts, *Rhodotorula glutinis* was considered as one of the most promising for the obtaining of microbial oils from glycerol as substrate. In the assays performed with different oxygenation levels, it was verified that higher oxygen availability higher the volume of lipids, cell growth and glycerol consumption. In the nutritional composition evaluation it was observed that the organic nitrogen source, such as yeast extract and peptone are essential for the production process of microbial oils together with $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. When these nutrients were presents in combination, concentrations of 4.4 g/L lipids and productivity of 0.43 g/L.day were obtained. In the evaluation of the influence of the initial pH and the carbon/nitrogen ratio (C:N), it was verified that the accumulation of lipids by yeast is favored for the cultures at initial pH between 6 and 7, and with C:N ratio between 30:1 and 50:1. In such conditions, it was obtained by yeast 8 g/L of lipids and volumetric productivity of 0.82 g/day. The composition of the microbial oil obtained by the yeast revealed high levels of palmitic (C16:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1) and linoleic (C18:2) fatty acids, which correspond to 99% of composition. The oil exhibited a Newtonian fluid behavior and a viscosity of 39.3 cP at 50 °C, having an acid number of $5.8 \pm 0.2 \text{ mg}_{\text{KOH}}/\text{g}_{\text{oil}}$ and a fatty acid content of $1.93 \pm 0.08\%$.

Keywords: Oleaginous yeast, Microbial oil, Glycerol, *Rhodotorula glutinis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Participação de matérias-primas na matriz energética nacional da produção de biodiesel. Fonte: ANP, (2015 d).....	25
Figura 2 – Representação de uma reação de transesterificação para a produção de Biodiesel.....	26
Figura 3 – Representação das etapas intermediárias uma reação de transesterificação de óleos vegetais.	26
Figura 4- Representação de uma reação de esterificação para a produção de Biodiesel.....	27
Figura 5 - Evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP no país.	28
Figura 6 - Fórmula estrutural do glicerol.....	40
Figura 7 – Via metabólica da síntese de lipídeos a partir de glicerol por leveduras oleaginosas.	46
Figura 8 - Organograma das principais etapa desenvolvidas no estudo da produção de óleo microbiano por leveduras a partir de glicerol como fonte de carbono.	49
Figura 9 - Consumo de Glicerol (a); Perfil de crescimento celular (b); Produção de Lipídeos (c) pelas diferentes leveduras nos cultivos em Glicerol. Onde: ● <i>Cryptococcus curvatus</i> Y-1511; ● <i>Lipomyces starkeyi</i> Y-27493; ● <i>Rhodotorula glutinis</i> Y-12905; ● <i>Rhodospiridium toruloides</i> Y-1091 e ● <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Y-27053.	60
Figura 10 – Gráfico de barras que expressa a concentração celular e de lipídeos, e o substrato residual para os diferentes ensaios do planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central para a avaliação da influência da Aeração sobre a produção de lipídeos.	66
Figura 11- Gráfico de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta substrato residual.	67
Figura 12 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) que relacionam a concentração de glicerol residual com relação $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ e agitação empregados durante o cultivo.....	69
Figura 13 - Gráficos de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta produção de biomassa.....	70
Figura 14 – Gráfico de superfície de resposta (a) e curva de nível (b) de que relaciona produção de biomassa com relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ e agitação.	72

Figura 15 - Gráfico de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta concentração de lipídeos.	73
Figura 16 – Gráfico de superfície de resposta (a) e curvas de nível (b) que relaciona produção de lipídeos com relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ e agitação.	75
Figura 17 - Gráfico de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$ (g/g).	76
Figura 18 - Gráfico de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta conversão de substrato em Lipídeos $Y_{X/S}$ (g/g).	77
Figura 19 - Gráfico de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta a produtividade de lipídeos Q_P (g/L.h).	78
Figura 20 – Gráfico de superfície de resposta que relaciona produção de lipídeos com as variáveis Agitação e Relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$	81
Figura 21 - Gráfico de barras que expressa os resultados de concentração celular, lipídeos e consumo de substrato para os diferentes ensaios do planejamento experimental Taguchi L16 (Pep. = Peptona, E.L. = Extrato de levedura).	86
Figura 22 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a média da resposta concentração de células.	89
Figura 23 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental sobre a média da resposta concentração de lipídeos.	90
Figura 24 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a média da resposta consumo de substrato.	92
Figura 25 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a média da resposta fator de conversão de substrato em lipídeos ($Y_{P/S}$).	95
Figura 26 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a média da resposta fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).	96
Figura 27 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a média da resposta da Produtividade volumétrica em lipídeos (Q_P).	96
Figura 28 – Perfil de crescimento celular (a), acúmulo de lipídeos (b) e consumo de substrato (c) pela levedura <i>Rhodotorula glutinis</i> – Y – 12905 nos cultivos realizados sob diferentes valores de pH inicial.	99

Figura 29 – Valores de pH no decorrer dos cultivos realizados com a levedura <i>Rhodotorula glutinis</i> sob diferentes valores de pH inicial.....	100
Figura 30 - Concentração celular, lipídeos e consumo de substrato para os diferentes razões de C:N.	104
Figura 31 - Variação do pH no decorrer do tempo em cultivos com diferentes razões C:N..	105
Figura 32– Concentração de nitrogênio e de carbono no meio de cultivo utilizando-se frascos com C:N de 30:1.....	107
Figura 33 - Viscosidade absoluta em função da taxa de deformação do material lipídico da biomassa da levedura <i>Rhodotorula glutinis</i> Y-12905, determinada em um viscosímetro cone-placa a uma temperatura de 50°C.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de diversas oleaginosas para a produção de óleo.	29
Tabela 2 – Teores de ácidos graxos no biodiesel de óleo de soja.	30
Tabela 3 - Comparação das características decorrentes do uso do querosene e do bioquerosene	32
Tabela 4 – Teor lipídico em diferentes fontes oleaginosas.	34
Tabela 5- Concentração celular, teor de lipídeos, concentração de lipídeos e produtividade volumétrica em lipídeos para as leveduras cultivadas em meio à base de glicerol bruto.	35
Tabela 6 – Microrganismos oleaginosos e suas produtividades volumétricas em lipídeos.	37
Tabela 7 - Composição de ácidos graxos dos lipídeos de diferentes leveduras oleaginosas. .	38
Tabela 8 - Planejamento fatorial do tipo 2^2 com face centrada e triplicata no ponto central, para a avaliação do efeito da agitação/aeração, na produção de lipídeos por leveduras a partir de glicerol.....	51
Tabela 9 –Arranjo Ortogonal de Taguchi L16, onde os fatores principais avaliados no estudos são A (Peptona), B (Extrato de levedura), C (NH_4Cl), D (KH_2PO_4) e E ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e suas interações, representadas pelas combinações de letras.	52
Tabela 10 – Valores e níveis das variáveis estudadas no planejamento Taguchi L16 para a seleção de nutrientes para a composição do meio de cultivo.....	53
Tabela 11 – Resultados da fermentação utilizando Glicerol como substrato	63
Tabela 12 - Planejamento fatorial empregado na avaliação da influência da agitação e da razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ sobre a produção de lipídeos.....	64
Tabela 13 - Análise de variância dos efeitos principais dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a concentração de substrato residual.	68
Tabela 14 - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da concentração de substrato residual, obtido com base nos termos significativos.....	68
Tabela 15 - Análise de variância dos efeitos principais dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a resposta concentração celular.....	71
Tabela 16 - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da concentração celular, obtido com base nos termos significativos.....	71
Tabela 17 - Análise de variância dos efeitos principais dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a produção de lipídeos.	74

Tabela 18 - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da produção de lipídeos, obtido com base nos termos significativos.	74
Tabela 19 - Análise de variância dos efeitos principais, dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a conversão de substrato em produto.....	77
Tabela 20 - Análise de variância dos efeitos principais dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a conversão de substrato em lipídeos.	78
Tabela 21 - Análise de variância dos efeitos principais dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a produtividade de lipídeos Q_P (g/L.h).	79
Tabela 22 - Análise de variância da regressão para o modelo representativo para a produtividade de lipídeos, obtido com base nos termos significativos.	79
Tabela 23 -Matriz experimental de Taguchi L16, com as diferentes condições de cultivo avaliadas, e as respostas: produção de células, concentração de lipídeos, consumo de substrato, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ e Q_P	84
Tabela 24- Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre a concentração celular.....	87
Tabela 25 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre a produção de lipídeos.	88
Tabela 26 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre o consumo de substrato.	91
Tabela 27 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre o fator de conversão de substrato em lipídeos $Y_{P/S}$	93
Tabela 28 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre o fator de conversão de substrato em biomassa $Y_{X/S}$	93
Tabela 29 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a produtividade volumétrica em lipídeos Q_P	94
Tabela 30 - Consumo de glicerol, concentração celular e de lipídeos, Q_P , $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$, obtidos para os cultivos realizados com a levedura <i>Rhodotorula glutinis</i> sob diferentes valores de pH inicial.	102
Tabela 31 - Resultados da fermentação variando-se as razões de C:N para 240h de fermentação.	106

Tabela 32 - Perfil de ácidos graxos (%) da fração de lipídeos obtida da biomassa da levedura <i>Rhodotorula glutinis</i> Y-12905 (composição identificada no presente trabalho em comparação a dados da literatura. (n.q. – não quantificado; n.r. – não reportado).	108
Tabela 33 – Dados das curvas de calibração para as cinco espécies de leveduras.	127

LISTA DE SIGLAS

ANP – Agencia Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível.

AMP - Adenosina Monofosfato.

ATP - Adenosina Trifosfato.

CLAE - Cromatografia Líquida De Alta Eficiência.

C/N – Razão Carbono Nitrogênio.

CO – Monóxido de Carbono.

CO₂ – Dióxido de Carbono.

cP – Centipoise.

oC – Graus célsius.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

FA - Ácidos Graxos.

FAS - Ácidos Graxos Complexos.

H₂ – Hidrogênio.

IA – Índice de Acidez.

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada.

KH₂PO₄ - Fosfato Monopotássico.

K – Índice de Consistência.

KOH - Hidróxido de Potássio.

LOQ – Departamento de Engenharia Química.

MgSO₄.7H₂O - Sulfato de Magnésio Heptahidratado.

NaOH - Hidróxido de Sódio.

(NH₄)₂HPO₄ - Fosfato de Amônio Dibásico.

NH₄Cl - Cloreto de amônio.

Q_p - Produtividade Volumétrica em Lipídeos.

rpm - Rotações por Minuto.

SE - Esteril Ésteres.

τ - Tensão de Cisalhamento.

TG – Triacilgliceróis.

USDA - United States Department of Agriculture.

γ - Taxa de Deformação Aplicada.

Y_{X/S} - Fator De Conversão De Substrato em Biomassa.

$Y_{P/S}$ - Fator De Conversão De Substrato em Produto.

%AGL - Teor de Ácidos Graxos Livres.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. Matriz energética nacional	23
2.2. Biocombustíveis baseados em lipídeos	24
2.2.1. Biodiesel.....	25
2.2.2. Bioquerosene	31
2.3. Microrganismos como fonte de lipídeos	33
2.4. Glicerol como substrato em cultivos microbianos	39
2.5. Fatores que influenciam a produção de lipídeos por leveduras	42
2.6. Via metabólica.....	45
3. OBJETIVO GERAL	48
3.1. Objetivos específicos	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. Microrganismos E Preparo Do Inóculo.....	50
4.2. Seleção De Leveduras Produtoras De Lipídeos	50
4.3. Efeito Da Agitação/Aeração No Acúmulo De Lipídeos Em Cultivos Em Frascos Agitados	51
4.4. Estabelecimento Da Composição Mínima Do Meio De Cultivo	52
4.5. Avaliação Da Influência Do Ph Inicial.....	53
4.6. Avaliação Da Razão Carbono:Nitrogênio.....	54
4.7. Metodologias Analíticas	54
4.7.1. Determinação da concentração celular	54
4.7.2. Determinação de lipídeos.....	54
4.7.3. Determinação de glicerol.....	55
4.7.4. Quantificação de nitrogênio.....	56
4.7.5. Análise do perfil de ácidos graxos.....	57
4.7.6. Estudo reológico	58
4.7.7. Índice de acidez e teor de ácidos graxos livres (%agl)	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1. Seleção da levedura	60

5.2. Efeito da agitação/aeração no acúmulo de lipídeos em cultivos em frascos agitados	64
5.3. Estabelecimento de composição mínima do meio de cultivo.....	82
5.4. Avaliação da influência do ph inicial sobre a produção de óleo microbiano ..	98
5.5. Avaliação da influência da razão c:n no meio de cultivo.....	102
5.6. Caracterização do óleo microbiano	107
6. CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS	113
APÊNDICE	127
APÊNDICE A - ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS	127
A.1 - Determinação de concentração celular por espectrofotometria	127
A.2 - Determinação da concentração de lipídeos	129
A.3 - Determinação da concentração de glicerol	131
APÊNDICE B - ACOMPANHAMENTO DOS PROCESSOS DE BIOCONVERSÃO	132
B.1 - Efeito da agitação/aeração no acúmulo de lipídeos em cultivos em frascos agitados	132
B.2 - Estabelecimento de composição mínima do meio de cultivo	136
B.3 - Avaliação da influência da razão C:N no meio de cultivo.....	140

1. INTRODUÇÃO

Devido às preocupações ambientais e estratégicas tais como a redução das reservas de combustíveis fósseis, o aquecimento global e aos problemas poluição ambiental gerados pelo acelerado consumo destes combustíveis, há uma busca crescente por alternativas energéticas sustentáveis. O aumento dos preços de petróleo bruto, o fim dos recursos não renováveis e diretivas que impõem reduções de emissão de gases que provocam o efeito estufa têm levado cada vez mais à busca por combustíveis de origem renovável. Com isso tem havido um aumento no número de estudos que buscam o aprimoramento de energia renovável. Dentre os combustíveis renováveis empregados no setor automotivo, o biodiesel, devido à sua capacidade de substituir o diesel do petróleo vem atraindo cada vez mais a atenção mundial (BELIGON et al., 2015; CESCUT et al., 2014).

A produção de biodiesel a partir de óleos vegetais ainda não é tão competitiva quanto o diesel de petróleo, devido aos elevados custos das matérias-primas, e além disso, a produção de biodiesel convencional cria uma competição pelo uso da terra entre indústria alimentar e a óleo química. Com isso a investigação de novas tecnologias que possibilitem aumentar a eficiência da produção de biodiesel, assim como novas fontes para a obtenção de lipídeos a partir de outros recursos renováveis é um desafio necessário para melhorar a competitividade da indústria de biodiesel, e ampliar o número de possíveis alternativas para a matriz energética (CESCUT et al., 2014).

Uma alternativa aos óleos vegetais são os óleos microbianos, como os produzidos por microalgas, fungos filamentosos e leveduras. O interesse na obtenção de fontes de óleos a partir de recursos renováveis, e de fontes alternativas aos atuais óleos de origem vegetal ou animal, tem despertado o interesse por fontes como microrganismos heterotróficos (leveduras e fungos filamentosos) ou microrganismos autotróficos (algas), que tenham a capacidade de acumular conteúdos elevados de óleo, além de altos rendimentos de bioconversão. Alternativas como os cultivos de microrganismos heterotróficos possibilitam ainda o aproveitamento de subprodutos, tal como o glicerol, como fonte de carbono e energia em processos de bioconversão. Em geral são gerados 0,3 kg de glicerol para cada galão de biodiesel produzido. O glicerol é o principal subproduto resultante da produção do biodiesel pelo processo de transesterificação, e pode ser utilizado como substrato em processos fermentativos (HUANG et al., 2015).

Sendo o glicerol um importante resíduo da produção de biodiesel, uma alternativa para o seu uso é a utilização como substrato em cultivos para a produção de lipídeos microbianos. Com isso, o cultivo de leveduras oleaginosas em meios à base de glicerol como fonte de carbono para produção de lipídeos tem gerado interesse, pois o custo final para a produção de óleos microbianos depende do substrato.

Neste contexto, o presente trabalho visa contribuir para desenvolvimento de tecnologias voltadas para produção de óleos microbianos em cultivos heterotróficos. Desta forma foram realizados estudos envolvendo à seleção de microrganismos e otimização das condições de cultivo para a maximização da produção óleos microbianos em condições heterotróficas, empregando glicerol como substrato para os cultivos de leveduras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Matriz energética nacional

A competitividade econômica de um país bem como a qualidade de vida de seus cidadãos é intensamente influenciada pela disponibilidade de recursos energéticos (TOLMASQUIM et al., 2007). A energia é utilizada todos os dias e com o aumento da população mundial este consumo de energia deve aumentar em aproximadamente 56% nos próximos 30 anos (MASNADI et al., 2015).

Após a Revolução Industrial, iniciou-se o consumo do carvão mineral, começando a era dos combustíveis fósseis. Com a diminuição das reservas mundiais de carvão, e por facilidades no processamento em refinarias, o petróleo tornou-se a principal fonte energética mundial (OLIVEIRA et al., 2013). Nos últimos anos os combustíveis fósseis têm correspondido a mais de 80% do consumo mundial de energia primária (IEA, 2013), desempenhando papel crucial no mercado global de energia (GOLDEMBERG, 2006). O uso de combustíveis fósseis tem sido questionado em termos de impactos negativos, pois o uso desses combustíveis para diversas finalidades resulta no aumento da concentração de dióxido de carbono na atmosfera, acarretando em sérios problemas ambientais (PETERSEN et al., 2014).

Com o aumento da frota de veículos e da expansão econômica que impulsiona a produtividade no setor industrial, tende-se a um aumento do consumo de derivados de petróleo, como a gasolina e o diesel tornando imprescindível a necessidade de fontes energéticas renováveis que apresentem uma boa produtividade e que sejam menos agressivas ao meio ambiente (BRESOLIN, 2013). Com isso há o interesse no desenvolvimento de tecnologias para a produção de biocombustíveis, o que representa um importante avanço tecnológico

De um modo geral, biocombustível pode ser definido como todo produto útil para a geração de energia, e pode ser obtido total ou parcialmente de biomassa, de fontes renováveis de produtos vegetais ou compostos de origem animal. (TOLMASQUIM, 2003). Combustíveis derivados de petróleo e gás natural utilizados em motores à combustão ou em outro tipo de geração de energia podem ser substituídos total ou parcialmente por biocombustíveis. (ANP, 2015 b). Sendo uma alternativa importante para a demanda atual energética mundial, como o

biodiesel feito a partir de óleos vegetais e o etanol obtido a partir da sacarose e amido são os biocombustíveis mais comuns em uso no setor de transportes (MACEDO et al., 2008).

No Brasil os principais biocombustíveis líquidos usados são o etanol da cana-de-açúcar e o biodiesel, que é produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais, o qual é adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis para comercialização (ANP, 2015b).

2.2. Biocombustíveis baseados em lipídeos

Os lipídeos são compostos encontrados nos organismos vegetais, animais e também nos microrganismos. Baseados nas diferenças estruturais existem três categorias principais de lipídeos: os triacilgliceróis, os fosfolipídeos e os esteróis (PELCZAR JR et al., 1997).

Os lipídeos encontram-se enquadrados em duas frações: os saponicáveis e os insaponicáveis. Os mono, di e triacilgliceróis pertencem aos saponicáveis cuja hidrólise resulta na formação de ácidos graxos e glicerol, os monoacilgliceróis contêm uma única molécula de ácido graxo ligada ao glicerol, os diacilgliceróis contêm duas moléculas e os triacilgliceróis contêm três moléculas de ácidos graxos ligadas ao glicerol. Os carotenoides, esteróis, álcoois e hidrocarbonetos pertencem a classe dos insaponicáveis (SILVA, 2014).

Os triacilgliceróis são a classe mais abundante dentro do grupo dos lipídeos e são uma importante fonte de reserva de energia para os animais, principalmente nos adipócitos que são células especializadas no armazenamento de gorduras. São lipídeos formados pela ligação de três moléculas de ácidos graxos com o glicerol, um triálcool de três carbonos, através de ligações do tipo éster encontrados em gorduras e óleos. As gorduras são frequentemente chamadas de triacilgliceróis, são lipídeos simples constituídos de dois tipos de grupamento: glicerol e ácidos graxos. Os fosfolipídeos são lipídeos complexos encontrados na membrana celular, onde desempenham importante papel estrutural. Diferem dos triglicerídeos pelo fato de somente duas moléculas de ácidos graxos estarem ligadas à molécula de glicerol e por um grupo fosfato estar ligado ao glicerol (PELCZAR JR et al., 1997).

Os óleos e gorduras são substâncias classificadas como triacilgliceróis. A relação entre a quantidade dessas classes de compostos, bem como os tipos de ácidos graxos dos quais são formados, depende da fonte do óleo ou da gordura e da região onde foram produzidas. Os óleos e gorduras também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico (CASTRO et al., 2004).

Atualmente, várias são as matérias-primas utilizadas como fontes de óleos e gorduras para a produção de biocombustíveis, sendo este um fator importante, pois determina a rentabilidade do biocombustível (SILVA, 2014).

Em agosto de 2015, as matérias-primas mais utilizadas para a produção do biodiesel no Brasil foram: o óleo de soja que correspondeu a cerca de 77,61% da matéria-prima usada na produção desse biocombustível, seguido da gordura bovina com 18,42% e o óleo de algodão, com 2,35%. As demais oleaginosas usadas na produção de biodiesel representam somadas apenas 1,61% da matéria-prima usada na produção do biodiesel, como mostrado na Figura 1 (ANP, 2015 d).

Figura 1 - Participação de matérias-primas na matriz energética nacional da produção de biodiesel.

Fonte: ANP, (2015 d).

2.2.1. Biodiesel

Biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustível de origem fóssil (POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007).

O processo mais comumente utilizado para a produção do biodiesel é a transesterificação (Figura 2) de óleo vegetal ou gordura animal com álcool, metanol ou etanol, na presença de catalisadores, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, resultando na

produção de ésteres de ácidos graxos e glicerol, além de resíduos do processo (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002). A Figura 3 representa as etapas intermediárias da reação de transesterificação de óleos vegetais, o mecanismo de produção envolve três reações sucessivas e reversíveis. A primeira etapa é a conversão de um triglicerídeo a um diglicerídeo, seguido pela conversão de um diglicerídeo a monoglicerídeo e posteriormente de monoglicerídeo para glicerol, para cada glicerídeo em cada fase da reação é gerada uma molécula de éster.

Figura 2 – Representação de uma reação de transesterificação para a produção de Biodiesel.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Representação das etapas intermediárias uma reação de transesterificação de óleos vegetais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Outro processo utilizado para a obtenção do biodiesel é a esterificação que consiste na reação de um ácido graxo com um mono-álcool para formar ésteres. Estas reações de esterificação são catalisadas por ácidos (OLIVEIRA et al., 2013). A reação de esterificação pode ser observada na Figura 4.

Figura 4- Representação de uma reação de esterificação para a produção de Biodiesel.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar das propriedades semelhantes entre o diesel fóssil e o biodiesel, este último apresenta algumas vantagens como: a baixa toxicidade e a baixa formação de poluentes durante a combustão, sendo o biodiesel praticamente isento de enxofre e contribui para a

diminuição do acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera, o que fazem do biodiesel um excelente substituto para o combustível derivado de petróleo (ZHU et al., 2008).

Atualmente existem 55 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no País, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 7,47 bilhões de litros/ano (ANP, 2015 d). Na Figura 5 é mostrada a evolução anual da produção, da demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP no Brasil.

Figura 5 - Evolução anual da produção de biodiesel e da sua demanda compulsória e da capacidade nominal autorizada pela ANP no país.

Fonte: ANP (2015 d).

O grande desafio atual para a produção de biodiesel é diminuir a dependência do óleo de soja como matéria-prima, que não deve ser predominante pois a soja possui uma baixa produtividade de óleo por área plantada quando comparada a outras culturas (Tabela 1). O óleo de soja é consequência da demanda por farelo protéico, que é utilizado como matéria-prima para a produção de ração animal para o frango, porco e o bovino confinado. Entre as causas para que a soja responda pela maior parcela do óleo vegetal brasileiro está o fato da soja possuir uma cadeia produtiva bem estruturada, possuir um cultivo tradicional e adaptado para produzir com igual eficiência em todo o território nacional, possuir um rápido retorno do investimento com ciclo com duração de 4 a 5 meses, também pelo fato da soja pode ser armazenada por longos períodos, e o óleo de soja ser um dos óleos mais baratos. A Tabela 1

apresenta a produtividade de diversas culturas oleaginosas. Nota-se nesta Tabela que várias outras oleaginosas conseguem produzir uma quantidade superior de óleo quando comparadas a soja. Várias fontes de matérias primas podem ser utilizadas para a produção do biodiesel como através da utilização de culturas tradicionais como amendoim, girassol, mamona e algodão, como também na exploração de novas culturas como o dendê, pinhão manso, nabo-forrageiro, pequi, buriti, macaúba (MENDES; COSTA, 2010).

Tabela 1 – Características de diversas oleaginosas para a produção de óleo.

Espécies	Teor de óleo (%)	Ciclo (anos)	Meses de colheita	Produtividade (Tonelada de óleo/ha)
Dendê	20	8	12	3,0-6,0
Babaçu	66	7	12	0,1-0,3
Girassol	38-48	Anual	3	0,5-1,9
Canola	40-48	Anual	3	0,5-0,9
Mamona	43-45	Anual	3	0,5-0,9
Soja	17	Anual	3	0,2-0,4
Algodão	15	Anual	3	0,1-0,2

Fonte: Mendes; Costa (2010).

O diesel em sua composição possui frações leves compostas de querosene e nafta (5% a 10 % em massa) e possui frações mais pesadas obtidas após o craqueamento do petróleo, como o óleo leve que possui temperatura de destilação entre 160 °C e 380 °C (AGUIAR, 2013). Semelhante ao diesel, o biodiesel é composto por ésteres de ácidos graxos com massa molecular variada, a qual está relacionada a composição de ácidos graxos do óleo usado como matéria prima no processo. Como exemplo, a composição do biodiesel a partir de óleo de soja, óleo de frango, sebo bovino e óleo de algodão encontram-se na Tabela 2. Para o biodiesel produzido a partir de óleo de soja observa-se uma maior concentração de ácido linoleico, ácido oleico e ácido palmítico com 40,95%,19,79% e 15,08%, respectivamente, não apresentando os ácidos octanóico e decanóico em sua composição (SILVA et al., 2014).

Dantas (2006) caracterizou a composição do biodiesel obtido a partir de óleo de algodão, de acordo com o estudo realizado este óleo possui a predominância dos ácidos linoleico e oleico, com semelhança ao obtido através do óleo de soja. O biodiesel obtido a partir da gordura de frango e sebo bovino possuem composição percentual semelhante com predominância dos ácidos oleico e palmítico (CUNHA, 2008).

Tabela 2 – Teores de ácidos graxos no biodiesel de óleo de soja.

Éster	Óleo de Soja	Óleo de Frango	Sebo bovino	Óleo de Algodão
C8:0	-	-	-	-
C10:0	-	-	-	-
C12:0	0,21	-	-	-
C14:0	0,71	0,5	3,1	1,46
C16:0	15,08	26,5	29,1	24,71
C16:1	0,83	-	-	-
C18:0	12,09	5,5	18,9	1,65
C18:1	19,79	43,5	44,0	26,05
C18:2	40,95	14,5	0,9	39,95
C18:3	4,39	0,8	-	0,6
≥ C:20	2,98	-	-	2,96

Fonte: Silva et al. (2014); Dantas, (2006);

As propriedades físico químicas do biodiesel dependem da sua composição química, ou seja, da composição de ácidos graxos do biodiesel a qual depende do tipo de matéria prima utilizada (BHUIYA et al., 2016).

Atualmente várias fontes de lipídeos têm sido avaliadas para a produção de biodiesel, as quais incluem os óleos vegetais, gorduras animais e óleos residuais de cozinha e óleos microbianos (YEN et al., 2015b). Entretanto, ainda hoje o maior obstáculo para a comercialização da produção de biodiesel é o seu preço elevado em comparação com o baixo preço do diesel derivado de petróleo, pois seu potencial competitivo está atualmente limitado pelo alto preço das matérias-primas lipídicas, o que constitui entre 70 e 85% do custo total de produção de biodiesel. Na média do primeiro semestre de 2016, o preço do biodiesel pago às usinas ficou em R\$ 2,47/litro, enquanto o diesel S-10 à refinaria custou R\$ 2,11/litro (ABIOVE, 2016). A busca por novas matérias-primas para a produção do biodiesel pode ser considerada uma alternativa para reduzir os custos de produção (YEN et al., 2015b; OLKIEWICZ et al., 2016).

O emprego de lipídeos microbianos como matéria-prima em substituição a fontes oleaginosas convencionais para a produção de biodiesel gera interesse uma vez que os microrganismos possuem a possibilidade de crescer em substratos de baixo custo como por exemplo o glicerol (DUARTE, 2011).

2.2.2. Bioquerosene

O bioquerosene é constituído por uma mistura de hidrocarbonetos com um número de carbonos na sua maioria dentro do intervalo de C8 a C16 (RANUCCI et al., 2015). Que podem possuir cadeias lineares ou cíclicas, com composição similar ao do querosene fóssil (número de carbonos na sua maioria dentro do intervalo de C9 a C16). Pode ser utilizado em mistura com o querosene fóssil, ou puro (INOVA UNICAMP, 2015).

Uma vantagem de se utilizar o bioquerosene está no fato de ser totalmente compatível com as tecnologias atuais e que, misturados em proporções adequadas com o querosene de aviação de origem fóssil, não requerem alterações nos motores. (ÅKERMAN, 2005). Em uma comparação atual da utilização do querosene e do bioquerosene, observa-se as vantagens da utilização do bioquerosene, pois é considerado renovável, sua produção é dada principalmente a partir de óleos vegetais, pode ser considerado menos poluente e sua produção se dá a partir de várias rotas, como apresentado na Tabela 3 (OLIVEIRA, 2013).

Para a obtenção do bioquerosene podem ser utilizados diversos métodos entre eles o craqueamento térmico, gaseificação, síntese catalítica por Fischer-Tropsch, transesterificação e hidroprocessamento. No processo de craqueamento ocorre a decomposição térmica do óleo vegetal na presença de hidrogênio e catalisador, obtendo-se uma mistura de hidrocarbonetos (C8 a C16), que passa por uma destilação, gerando frações semelhantes ao querosene de aviação, no processo de gaseificação através de altas temperaturas (aproximadamente 1000 °C), ocorre à gaseificação da biomassa sólida, convertendo-a quase completamente em uma mistura de gases como: CO₂, CO, H₂ e vapor de água. Após a purificação desses gases, estes podem ser utilizados para a síntese de hidrocarbonetos líquidos pelo processo Fischer-Tropsch, na presença de catalisadores como cobalto e ferro (BONASSA et al., 2014). A reação de transesterificação o método mais simples quando comparado aos outros métodos. (RANUCCI et al., 2015).

Assim como o biodiesel, várias matérias primas podem ser utilizadas para a obtenção do bioquerosene, um biocombustível que pode ser usado em aviação e que também é baseado em lipídeos, tais como: os óleos vegetais, óleos residuais como os óleos utilizados em frituras, gorduras animais e até mesmo óleos produzidos por microrganismos. Atualmente fontes alternativas de óleos estão sendo estudadas para a produção de biocombustíveis destinados a aviação pela sua produtividade potencial, principalmente pela composição diferenciada em termos de ácidos graxos, tais como: o pinhão manso, babaçu, falso linho e algas (VELÁQUEZ et al., 2012).

Tabela 3 - Comparação das características decorrentes do uso do querosene e do bioquerosene

Querosene	Bioquerosene
Não renovável	Renovável
Produzido com petróleo	Produzido principalmente a partir de óleos vegetais
Mais Poluente	Menos Poluente
Processo único de produção	Várias rotas tecnológicas de produção
Produção bem estabelecida e distribuída em todo mundo	Produção apenas experimental, sem escala industrial.
Preço de Mercado	Preço ainda alto

Fonte: (OLIVEIRA, 2013), adaptado pelo autor.

Segundo Bonassa et al. (2014), para a produção de bioquerosene os óleos vegetais são considerados a matéria-prima com maior potencial para a produção de biocombustíveis visando substituir parcialmente o querosene de origem fóssil. As matérias – primas mais utilizadas para a produção do bioquerosene são: pinhão manso, camelina, babaçu e algas. Estes óleos apresentam algumas características fundamentais as quais devem ser observadas na escolha de uma matéria-prima para que esta esteja apta para a produção de bioquerosene, tais como: não interferir nos ecossistemas naturais, ser produzida de forma que o solo e a água não sejam sobrecarregados, não necessitar de grandes quantidades de insumos agrícolas, proporcionar redução de emissão e gerar conteúdo energético maior ou igual comparados ao combustível tradicional, agregar valor socioeconômico às comunidades locais, serem cultivadas em terras não utilizadas para a produção de alimentos e terras marginais (BONASSA et al., 2014).

De acordo com Cremonez et al. (2015) a indústria da aviação é responsável por 2% de todo o dióxido de carbono liberado na atmosfera. Com isso, existe um interesse de várias empresas e agências no desenvolvimento de combustíveis alternativos para a aviação, tornando assim o uso do bioquerosene bastante interessante. Como exemplo do impacto que o uso de combustíveis fósseis causa a sociedade, podemos mencionar um estudo realizado por Reynol (2007) sobre a relação dos aviões com a poluição, revelando que no ano de 2005 o uso

querosene de aviação resulta em 8,8% da poluição provocada pelos combustíveis na cidade de São Paulo.

Silveira (2009) reportou o desenvolvimento de um biocombustível para abastecer aviões com um preço por volta de 30% mais barato na fabricação e muito menos poluente que o querosene de aviação tradicional. O bioquerosene não emite poluentes como enxofre, compostos nitrogenados, hidrocarbonetos ou materiais particulados, como é comum nos combustíveis fósseis, e contribui com o balanço de emissão de CO₂, este no combustível produzido é considerado um bioquerosene de alta pureza, com valores acima de 99,9% (SILVEIRA, 2009).

No Brasil o uso de combustíveis alternativos para a aviação, como o bioquerosene está entre as áreas de estratégias para a pesquisa, desenvolvimento e inovação da Política do Desenvolvimento Produtivo da Indústria Aeronáutica. Além disso, a criação de políticas públicas como o Projeto de Lei nº 3213/2009 que dispõe sobre a criação do programa nacional de bioquerosene como incentivo à sustentabilidade ambiental da aviação brasileira demonstra o crescente interesse e consequente aumento na demanda por este biocombustível (ASSOCIAÇÃO DE INDUSTRIAS ESPACIAS DO BRASIL, 2012).

O Brasil tem grandes chances de se tornar o maior produtor mundial de bioquerosene, pois possui uma variedade de matérias-primas, um clima favorável, mão-de-obra disponível, além de possuir tecnologia própria já desenvolvida (REYNOL, 2007).

2.3. Microrganismos como fonte de lipídeos

Existe atualmente um crescente interesse em compostos lipídicos microbianos devido às suas diversas aplicações potenciais, tais como a produção de biocombustíveis, ou como matéria-prima para a indústria alimentícia (POLI et al., 2014).

Atualmente os lipídeos produzidos por microrganismos oleaginosos, que são os organismos que têm a capacidade de acumular pelo menos 20% do seu peso seco em lipídeos intracelulares, estão sendo pesquisados como uma alternativa a utilização de óleos vegetais na síntese de biocombustíveis (SITEPU et al., 2014 (a); SUBRAMANIAM et al., 2010).

Os lipídeos produzidos por microrganismos são armazenados como triacilgliceróis de ácidos graxos de cadeia longa. Os óleos microbianos têm um perfil de ácidos graxos semelhante com aqueles de origem vegetal como os óleos usados atualmente para a produção do biodiesel. Com predominância de ésteres com composição de 16 a 18 carbonos. Com isso,

óleos microbianos são considerados como potenciais candidatos em alternativa ao uso de óleos vegetais (BELIGON et al., 2015).

Existem diferentes tipos de microrganismos oleaginosos, tais como as algas, as bactérias, os fungos filamentosos e as leveduras (SITEPU et al., 2014). Na Tabela 4 encontram-se algumas espécies de microrganismos, que apresentam teor lipídico acumulado superiores à soja.

Tabela 4 – Teor lipídico em diferentes fontes oleaginosas.

Fonte Oleaginosa	Lipídeos (% m/m)
(Plantas superiores)	
Soja	18-21
(Microalgas)	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella vulgaris</i>	40-60
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Nitzia sp.</i>	45-47
(Bactérias)	
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40
(Leveduras)	
<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
(Fungos filamentosos)	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57

Fonte: Fontana (2010); Meng et al. (2009).

Em um estudo realizado por Kuntzler et al. (2013) com o objetivo de determinar o teor de lipídeos presente na biomassa das leveduras cultivadas em meio à base de glicerol bruto, foram obtidas a concentração de lipídeos, o teor de lipídeos, o rendimento do cultivo e a

produtividade volumétrica. As leveduras foram cultivadas em frascos agitados, utilizando glicerol bruto como fonte de carbono, a temperatura de 30 °C e 180 rpm, com diferentes tempos de cultivo. As leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* e *Rhodotorula glutinis* obtiveram as maiores produtividades volumétricas com 0,0356 g/L.h e 0,0277 g/L.h respectivamente. As maiores concentrações de célula foram obtidas pelas espécies *C. cylindracea* e *R. glutinis* com 9,92 e 9,80 g/L, respectivamente, a espécie *L. lipofer* foi a que apresentou maior teor lipídico com 57,64%, os resultados obtidos nesse estudo estão representados na Tabela 5.

Tabela 5- Concentração celular, teor de lipídeos, concentração de lipídeos e produtividade volumétrica em lipídeos para as leveduras cultivadas em meio à base de glicerol bruto.

Levedura	Tempo de Cultivo (h)	Concentração de células (g/L)	Teor de lipídeos (%)	Concentração de lipídeos (g/L)	Q _P (g/L.h)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	120	4,49 ± 0,2	27,90 ± 1,28	1,25 ± 0,09	0,0104
<i>Cryptococcus cylindracea</i>	96	9,92 ± 0,13	14,11 ± 0,47	1,40 ± 0,06	0,0145
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	120	7,79 ± 0,03	55,06 ± 0,20	4,28 ± 0,01	0,0356
<i>Rhodotorula glutinis</i>	144	9,80 ± 0,17	40,85 ± 1,88	4,00 ± 0,12	0,0277
<i>Lipomyces starkeyi</i>	120	5,74 ± 0,32	50,49 ± 0,99	2,89 ± 0,17	0,0240
<i>Lipomyces lipofer</i>	264	9,48 ± 0,27	57,64 ± 2,81	5,46 ± 0,34	0,0206

Fonte: (KUNTZLER et al., 2013).

As microalgas podem ser consideradas como uma fonte de matéria-prima alternativa para a produção de biocombustíveis devido a suas altas taxas de crescimento quando comparadas a culturas vegetais oleaginosas tradicionais, sua alta eficiência fotossintética e ao relativamente alto teor de moléculas ricas em energia (LI et al., 2015). Um exemplo é a microalga *Chlorella protothecoides* que, quando se desenvolve heterotroficamente, apresenta alto conteúdo lipídico (55%) nas células (MIAO; WU, 2006). Além disso são capazes de alcançar teores de óleo na faixa de 20-50% de seu peso.

Os cultivos das microalgas podem ser autotróficos, heterotróficos e mixotróficos, a diferença de cultivo entre eles está nas fontes de energia e de carbono utilizadas. No cultivo autotrófico as células obtêm energia da luz e o carbono do CO₂ do ar, produzindo lipídeos através da fotossíntese, no cultivo heterotrófico, compostos orgânicos são utilizados pelas células como fonte de energia e de carbono e, nos cultivos mixotróficos, são utilizados luz, compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de energia e CO₂ e compostos orgânicos como fonte de carbono (FRANCO, 2013).

Dentre as vantagens de se utilizar cultivos heterotróficos está o fato que este cultivo apresenta maiores concentrações de lipídeos, podendo ser regulados pelo uso de adequadas fontes de carbono; podem ser feitos em fermentadores tradicionais tornando assim o controle de crescimento mais eficiente e também podem ser utilizados cultivos mais densos, pois não há a necessidade de permitir a passagem de luz até o interior do meio de cultivo reduzindo assim o custo da colheita (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

As microalgas crescem em suspensão nos ambientes aquáticos tendo acesso à água, ao CO₂ e outros nutrientes, sendo assim capazes de produzir sob condições ótimas aproximadamente 30 vezes mais a quantidade de óleo por unidade de superfície do que as tradicionais colheitas de plantas utilizadas para a produção de óleos em solo (DA RÓS, 2012).

As bactérias são outro grupo de microrganismos capazes de produzir e acumular lipídeos. As bactérias geralmente acumulam polihidroxialcanoatos como composto de armazenamento e apenas algumas espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Mycobacterium actinobacterial*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* e *Nocardia* produzem quantidades relevantes de lipídeos (ALVAREZ; STEINBÜCHEL, 2002).

As cianobactérias acumulam lipídeos nas membranas dos tilacóides (sistemas de membranas internas do cloroplasto e das cianobactérias que contém a clorofila). As cianobactérias por serem organismos procarióticos, podem ser melhoradas por meio de manipulações genéticas mais prontamente do que as microalgas eucarióticas. A linhagem *Synechocystis* com uma mutação em um gene propiciou um acúmulo de 50% de lipídeos (RITTMANN, 2008; DA RÓS, 2012).

Alguns fungos filamentosos também podem produzir lipídeos utilizando amido solúvel, palha de trigo, ácido acético e glicerol. Fungos acumulam lipídeos dentro do seu micélio, e este teor pode variar de 18 a 64% em lipídeos do seu peso seco. Além disso, possuem o perfil de ácidos graxos bastante semelhantes ao de óleos vegetais convencionais, fazendo assim com que fungos filamentosos oleaginosos sejam considerados como uma matéria-prima favorável para uma indústria de biodiesel sustentável (ZHANG; HU, 2011).

Para Munch et al. (2015) as leveduras têm atraído interesse recente, pois possuem a capacidade de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono, como também possui uma ampla variedade de condições de cultura. Desta forma leveduras oleaginosas são apontadas como uma alternativa promissora para a produção de biocombustível à base de lipídeos (YU et al., 2014).

Na Tabela 6 encontram-se as produtividades volumétricas para alguns microrganismos oleaginosos. De acordo com a Tabela as leveduras são a espécie que apresentam a maior produtividade volumétrica quando comparadas às bactérias, fungos filamentosos e microalgas, sendo que a espécie *Lipomyces starkeyi* apresenta uma maior produtividade entre as leveduras apresentadas com cerca de 3,3 vezes maior do que a espécie *Rhodotorula mucilaginosa* e cerca de 70 vezes maior que a microalga *Phormidium sp.*

Tabela 6 – Microrganismos oleaginosos e suas produtividades volumétricas em lipídeos.

<i>Microrganismos</i>	<i>Q_P (g/L.h)</i>	<i>Fonte</i>
Leveduras		
<i>Lipomyces starkeyi</i>	0,60	(MORETON, 1988)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	0,59	(MEESTERS et al., 1996)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	0,54	(LI, Y. et al., 2007)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,18	(LI, M. et al., 2010)
Bactérias		
<i>Rhodococcus opacus PD630</i>	0,38	(VOSS, 2001)
Fungos Filamentosos		
<i>Mortierella ramanniana</i>	0,17	(HIRUTA et al., 1997)
<i>Mortierella isabelina</i>	0,12	(ECONOMOU et al., 2010)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	0,07	(CHEN; CHANG, 1996)
Microalgas		
<i>Phormidium sp</i>	0,0085	(SIQUEIRA et al., 2015)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Existem várias espécies de leveduras que são capazes de se acumular de forma eficiente lipídeos, tais como *Cryptococcus curvatus*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Yarrowia lipolytica*, entre outras (AGEITOS et al, 2011).

Ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e polinsaturados (PUFAs), como ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolênico (C18:3) e ácido mirístico (C 14:0), que são as principais matérias primas para produção do biodiesel, são os constituintes principais dos lipídeos produzidos por leveduras (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2010).

Na Tabela 7 encontra-se a composição lipídica do óleo produzido por algumas leveduras oleaginosas. Observa-se que o conteúdo e o perfil lipídico diferem entre as espécies. Os maiores teores de lipídio são observados para as leveduras *Rhodotorula glutinis* sendo capaz de acumular até 72% de seu peso em lipídeos, *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces starkeyi* e *Trichosporon pullulans* que são capazes de acumular até 65% de seus pesos em lipídeos. Para a levedura *Rhodotorula glutinis* os principais ácidos graxos produzidos são os ácidos oleico e ácido palmítico. O ácido palmítico é produzido por todas as leveduras observadas, sendo sua maior produção encontrada na espécie *Rhodotorula glutinis*.

Tabela 7 - Composição de ácidos graxos dos lipídeos de diferentes leveduras oleaginosas.

Microrganismo	Teor Lipídico (m/m%)	Principais ácidos graxos (% m/m)					
		C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<i>Cryptococcus curvatus</i>	58	25	-	10	57	7	0
<i>Cryptococcus albidus</i>	65	12	1	3	73	12	0
<i>Lipomyces starkeyi</i>	65	34	6	5	51	3	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72	37	1	3	47	8	0
<i>Rhodotorula graminis</i>	36	30	2	12	36	15	4
<i>Rhizopus arrhizus</i>	57	18	0	6	22	10	12
<i>Trichosporon pullulans</i>	65	15	0	2	57	24	1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36	11	6	1	28	51	1

Fonte: Beopoulos, A.; Nicaud, J. (2012).

A levedura *Rhodotorula glutinis*, tem sido estudada também pela sua alta produtividade lipídica e de β caroteno (GANGAR et al., 2001). Esta levedura possui uma capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono, tais como glicose e glicerol, fazendo da *Rhodotorula glutinis* uma espécie atraente para a produção de óleo microbiano (YEN et al., 2015). *Rhodotorula glutinis* é capaz de acumular grandes quantidades de lipídeos, cerca de 60% do seu peso seco sob a forma de triacilgliceróis (EASTERLING et al., 2009). De acordo com Saenge et al. (2011) a levedura *Rhodotorula glutinis* tem demonstrado características favoráveis para a bioconversão de glicerol bruto da usina de biodiesel em lipídeos.

Segundo Huang et al. (2015) a espécie *Cryptococcus curvatus*, é outra levedura com grande potencial para aplicação em produção de óleo microbiano, pois também pode acumular grandes quantidades de óleo, até 60% do peso seco da célula e também pela sua capacidade de utilizar fontes mais baratas de carbono como o permeado de soro de leite.

Em outro estudo Seo et al. (2014) verificaram um acúmulo de 33% de ácido graxo monoinsaturado utilizando *Cryptococcus curvatus*.

De acordo com Zhao et al. (2008), dentre os organismos oleaginosos, a espécie *Lipomyces starkeyi* pode ser considerada uma alternativa para a produção de lipídeos, pois utiliza matérias-primas, tais como glucose e xilose. E possui um acúmulo de lipídeos acima de 20% de sua massa seca (MENG et al., 2009). Resultados promissores para a obtenção de óleo microbiano são também reportados por Tsakona et al. (2014) e Yang et al. (2014). Em seus estudos Tsakona et al. (2014) obtiveram um teor de óleo microbiano da levedura *Lipomyces starkeyi* de 57,8% (m/m) em relação a sua massa seca e uma produtividade volumétrica de 0,4 g/L.h em cultivos utilizando biorreator em batelada alimentada, tendo glicose como fonte de carbono. Trabalhando também com a levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi*, Yang et al. (2014) demonstraram que esta levedura poderia utilizar os monossacarídeos glicose e manose, simultaneamente, para a produção de lipídeos, obtendo um fator de conversão de 0,12 g de lipídeo/g de açúcares redutores totais.

A espécie *Rhodospiridium toruloides* também vem sendo considerada como uma levedura potencialmente promissora para a obtenção de óleos microbianos a partir do glicerol devido à sua boa adaptação ao substrato, alto teor de lipídeos intracelulares, e ao potencial de coprodução de carotenóides. A levedura *Rhodospiridium toruloides* também chamada de “levedura rosa” além de apresentar potencial para aplicações voltadas à produção de óleo microbiano, também tem sido apontada como promissora para a obtenção de corante natural e aditivos alimentares de interesse industrial (XU et al., 2015; DIAS et al., 2015).

A espécie *Rhodotorula mucilaginosa* é utilizada para a produção de óleo microbiano por possuir características como rápido crescimento e alto teor lipídico utilizando diversas fontes de carbono (LI et al., 2011). Li et al. (2010) verificaram que *R. mucilaginosa* pode acumular 52,9% (m/m) de óleo a partir de glicose e de hidrolisado de amido de mandioca após 120h de cultivo em batelada alimentada.

2.4. Glicerol como substrato em cultivos microbianos

O Glicerol, é um triálcool que contém três átomos de carbonos em sua molécula e seu nome de acordo com a IUPAC é 1,2,3-propanotriol, sendo considerado um solvente orgânico não tóxico e de ponto de ebulição elevado, cerca de 290 °C (SILVA et al., 2009). Sua fórmula estrutural encontra-se representada na Figura 6.

Figura 6 - Fórmula estrutural do glicerol

Fonte: EMPRABA (2016).

O glicerol constitui o principal co-produto gerado no processo de produção do biodiesel via esterificação de ácidos graxos vegetais ou gordura animal com álcool (metanol ou etanol) para produzir ésteres na presença de catalisadores (KOH ou NaOH). Durante a fabricação do biodiesel, obtém-se cerca de 10% em peso de glicerol, tornando-se necessária a busca de alternativas de utilização do glicerol bruto que é gerado. O aproveitamento do glicerol evitar pode evitar futuros problemas derivado da acumulação de glicerol e também pode tornar a produção de biodiesel mais competitiva (RIVALDI, 2012).

À medida que a demanda mundial por biodiesel continua a aumentar, o desenvolvimento de processos sustentáveis para a utilização desta matéria-prima orgânica é de grande importância. Assim, uma alternativa do emprego do glicerol bruto é a sua utilização como matéria-prima para a bioconversão microbiana (YEN et al., 2015).

Cada vez mais atenção está sendo dada para a utilização de glicerol bruto derivado da produção de biodiesel com a finalidade de reduzir custos da produção de biodiesel e promover a sua industrialização em grande escala (YANG et al., 2012). Desta forma estudos estão sendo realizados tendo como objetivo a conversão microbiológica do glicerol em produtos com maior valor agregado (ABREU, 2013).

Os setores industriais vinculados aos segmentos alimentícios, farmacêuticos e de cosméticos são os principais mercados consumidores do glicerol e dos seus derivados, porém esses setores não são capazes de absorver todo o volume de glicerol gerado com a produção do biodiesel (SOUZA et al., 2007; UMPIERRE; MACHADO, 2012). Apesar de o glicerol apresentar estas aplicações na forma pura, poucos estudos estão sendo direcionados para a

utilização de glicerol bruto na forma direta (RIVALDI et al., 2008). Poucas são suas aplicações comerciais, devido a um número de impurezas, tais como o metanol (geralmente utilizados para a transesterificação, triglicéridos), sais (como catalisador) e sabão que são encontradas no glicerol proveniente da transesterificação na produção de biodiesel (YANG et al., 2012). Uma alternativa para a disposição adequada desse coproduto é a utilização do glicerol como substrato para a produção de produtos biotecnológicos (DUARTE, 2011).

Valorizar o glicerol é um grande desafio para a indústria química brasileira, novas tecnologias que sejam capazes de agregar valor ao glicerol devem ser desenvolvidas devido ao aumento da quantidade de biodiesel produzido no Brasil. A via de oxidação catalítica e a polimerização são tecnologias bastante indicadas para a conversão do glicerol em produtos de maior valor agregado. Essas tecnologias de aproveitamento do glicerol residual podem ser associadas aos processos de produção do biodiesel via transesterificação de oleaginosas para assim garantir maior sustentabilidade ambiental e econômica (UMPIERRE; MACHADO, 2012).

Os óleos microbianos são obtidos quando os microrganismos oleaginosos são cultivados em substrato, sendo o custo final destes óleos dependentes do custo do substrato, sendo interessante o aproveitamento de fontes de carbono de baixo custo em condições de processo processos com alta produtividade. Assim, o glicerol bruto pode ser considerado uma das matérias-primas promissora para a produção de lipídeos, pois é um importante resíduo da produção de biodiesel. Desta forma o cultivo de leveduras oleaginosas em meios a base de glicerol tem atraído grande interesse e novas pesquisas estão sendo realizadas em busca de novas espécies capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono para crescimento de produção de lipídeos (RAIMONDI et al., 2014).

Durante o cultivo de microrganismos, estes atuam desenvolvendo processos de catabolismo de substratos orgânicos através de reações catalisadas por enzimas, podendo acarretar na formação de substâncias intermediárias dos produtos finais da oxidação biológica total, sendo tais moléculas passíveis de aproveitamento em diversas aplicações (REGULY, 2000). Para favorecer a obtenção de um determinado produto de interesse em cultivos microbianos, as condições ambientais desejadas devem ser conhecidas e controladas.

O crescimento microbiano é dependente da disponibilidade de nutrientes, tais como: fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais, que se transferem à célula, como também de parâmetros ambientais, como temperatura e pH, e estes devem ser mantidos no valor ótimo (SANTOS, 2009).

O glicerol pode ser utilizado por vários microrganismos como única fonte de carbono, tais como *Citrobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, o *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans* e *Lactobacillus reuteri*. Podendo assim ser utilizado em substituição as tradicionais fontes de carbono em cultivos microbianos como os carboidratos, glicose, sacarose e amido (DA SILVA et al., 2009). Como exemplo do uso de glicerol como fonte de carbono podemos mencionar os estudos realizados por Meesters et al. (1996). Estes autores estudaram o crescimento e acúmulo de lipídeos em *Cryptococcus curvatus* numa fermentação empregando glicerol como fonte de carbono e energia obtendo um teor de lipídio de 25% em 50h de fermentação com cultivo em batelada alimentada.

Em outro estudo realizado por Raimondi et al. (2014) utilizando a espécie *Candida freyschussii* ATCC 18737 e glicerol como fonte de carbono obteve-se uma produção de lipídeos de 4,6 g / L e um teor de lipídeos em biomassa de 33% m/m, com uma fermentação de 30 h. É importante ressaltar que em cultivos microbianos, as condições ambientais e nutricionais empregadas devem ser bem estabelecidas, uma vez que estas tem grande influência na capacidade do microrganismo gerar o produto de interesse.

2.5. Fatores que influenciam a produção de lipídeos por leveduras

Todos os organismos para crescer necessitam de uma variedade de elementos químicos como nutrientes. Quando os microrganismos são cultivados em laboratório os meios utilizados para seu crescimento são meios que simulam ou até mesmo melhoram suas condições naturais de crescimento. Para o crescimento das células, os principais elementos químicos utilizados são carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo (PELCZAR JR et al., 1997). Compreender as necessidades nutricionais das leveduras é importante não só para o cultivo bem sucedido em laboratório, mas também para a otimização do processo de bioconversão em escala industrial.

O cultivo microbiano é controlado de modo a manter condições favoráveis ao crescimento e metabolismo do microrganismo por fatores como: temperatura, pH, agitação e concentração de nutrientes. Um dos mais importantes parâmetros físicos que influenciam o crescimento de leveduras é temperatura, tendo a maioria das leveduras uma faixa ótima de crescimento entre 20° e 30°C (REGULY, 2000).

Sabe-se que a concentração e composição de lipídeos produzidos por leveduras podem ser afetadas pelas condições de cultivo, tais como, fonte de carbono e sua concentração, a aeração, a temperatura, a fonte de nitrogênio, e micronutrientes (WOODBINE, 1959).

O acúmulo de lipídeos por leveduras oleaginosas depende principalmente de condições de limitação de nutrientes, associado ao excesso de carbono presente no meio, pois a limitação de nutrientes impede que novas células sejam geradas, enquanto o excesso de carbono é convertido em armazenamento de triacilglicerol, sendo a limitação de nitrogênio a forma mais eficiente para a indução lipogênese, levando a maiores valores de rendimento de conversão de substrato e do teor de lipídeos dentro da biomassa (ROSSI et al., 2011).

A limitação de nitrogênio é uma estratégia eficaz usada para melhorar a produção de metabólitos secundários em células de plantas e também para o excesso de produção de várias substâncias por microrganismos, como ácido cítrico e glicerol (WANG et al., 2015). As leveduras oleaginosas são conhecidas por acumular lipídeos quando cultivadas em deficiência de nitrogênio ou com limitação de outro nutriente no meio. Sendo este acúmulo a atividade dominante das leveduras oleaginosas durante a limitação de nitrogênio (CALVEY et al., 2016).

As leveduras oleaginosas acumulam mais lipídeos com o aumento da relação entre as proporções de fontes de carbono e nitrogênio (razão C / N) até certo ponto, e a acumulação de lipídeos é iniciada quando o nitrogênio é esgotado do meio. Segundo Sitepu et al. (2014) a deficiência de nitrogênio induz um maior acúmulo de lipídeos em leveduras oleaginosas. Estes autores reportam que para cultivos em meios com deficiência em nitrogênio foi obtido um maior teor de lipídeos em 35 das 37 espécies de leveduras oleaginosas testadas, após 5 dias de cultivo em um meio variando de baixo teor de nitrogênio até meios praticamente isento de nitrogênio nos últimos dias de cultivo (SITEPU et al., 2014).

Assim como a relação C/N, o tipo da fonte de carbono é de fundamental importância para a produção de lipídeos. Muitos compostos, especialmente os açúcares, podem causar repressão catabólica de várias enzimas e diminuir a velocidade de crescimento de alguns microrganismos (LILLY, 1979). Sendo a produção de lipídeos por leveduras oleaginosas ótima em altos índices de Carbono-Nitrogênio (CALVEY et al., 2016). Segundo Rosa, (2014) a glicose, xilose, glicerol, amido, hidrolisados de celulose, e de resíduos orgânicos industriais são algumas fontes de carbono possíveis para serem utilizadas para a produção de lipídeos por leveduras.

A disponibilidade de oxigênio é outro fator que exerce grande influência em cultivos microbianos submersos. A existência de um adequado dimensionamento do meio de

transferência de oxigênio é essencial em processos fermentativos envolvendo o cultivo de células aeróbicas e aeróbicas facultativas que visam à produção de antibióticos, enzimas, vitaminas, fermentos, inoculantes e proteínas recombinantes (hormônios de crescimento e insulina) (SCHMIDELL et al., 2001).

Segundo Zara et al. (2009), uma maior disponibilidade de oxigênio durante o cultivo de duas diferentes cepas de *S. cerevisiae*, proporcionou uma maior produção de lipídeos, acarretando também em um aumento da proporção de ácidos graxos insaturados em relação ao total de óleos produzidos. Ainda segundo estes autores, o nível de oxigenação teve influência direta na expressão de genes envolvidos na codificação de enzimas ligadas a biossíntese de lipídeos, o que acarreta em diferentes composições de ácidos graxos em cultivos sob diferentes condições de oxigenação.

O pH é um dos parâmetros ambientais de grande importância e que afetam o crescimento das células e formação do produto. Os efeitos do pH sobre o crescimento celular e acumulação de produto variam de acordo com as diferentes composições de meio de cultivo para microrganismos, e as condições operacionais (LUO et al., 2013). Segundo Dias et al. (2015), o pH do meio ideal para a produção de ácidos graxos pela levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 é 4.0 e para a acumulação de lipídeos o pH 5,0 é considerado o mais favorável.

Suutari et al. (1990) estudaram as mudanças nas composições de ácidos graxos produzidos pelas leveduras *Candida oleophila*, *Candida utilis*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides* e *Saccharomyces cerevisiae* em três diferentes valores de temperatura. Os autores reportam que não foram observadas alterações nos teores dos principais ácidos graxos para nenhuma das leveduras dentro das temperaturas de crescimento (20 -26 °C). Com relação a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram observadas alterações no comprimento médio da cadeia de ácidos graxos com a variação de temperatura. Para as leveduras *Candida oleophila*, *Candida utilis* e *Lipomyces starkeyi* o teor de ácidos graxos diminuiu com o aumento da temperatura e o com a diminuição de temperatura houve alterações no comprimento da cadeia. Para temperaturas abaixo de 20-26 °C foram observadas alterações dependentes da temperatura no comprimento de cadeia médio enquanto que para temperaturas acima de 20-26 °C houve alterações no grau de instauração.

2.6. Via metabólica

Compreender os fatores genéticos que contribuem para a produção de óleo nas células é crucial para o desenvolvimento de linhagens com melhores capacidades de acumulação de lipídeos. A regulação das vias metabólicas e produção de enzimas-chave podem ser manipuladas para canalizar o carbono em produtos desejados (SITEPU et al., 2014 (a)).

O metabolismo lipídico é uma rede altamente complexa de reações que são objeto de regulação sofisticado. Os lipídeos celulares possuem três funções principais, (1) eles fornecem um depósito de fonte de energia na forma de triacilgliceróis (TG) e de esteril ésteres (SE); (2) certas classes de lipídeos são componentes importantes da membrana biológica tais como: glicerofosfolípidos, esteróis, esfingolípidos e glicolípidos e (3) os lipídeos podem atuar como mensageiros celulares. De um modo geral, os ácidos graxos (FA) de triacilgliceróis e/ou triacilgliceróis podem ser utilizados para a produção de energia através de β -oxidação ou como blocos de construção para a síntese de lipídeos da membrana (GSELL et al., 2015).

Os lipídeos não-polares tais como triglicérideos (TGs) e esteril ésteres (SEs) são as principais formas de depósito de energia metabólica (SCHMIDT et al., 2014).

A Figura 7 demonstra uma representação esquemática das principais etapas envolvidas na via metabólica de leveduras oleaginosas, na qual lipídeos são obtidos a partir de glicerol.

Nas leveduras oleaginosas, os lipídeos podem se acumular através de duas vias distintas: através da síntese de lipídeos a partir dos blocos de construção de acetil-CoA e de malonil-CoA ou a partir de um caminho de acumulação de lipídeos envolvendo a absorção de ácidos graxos, óleos e TG do meio de cultura, sendo a síntese de lipídeos a forma mais importante para a obtenção de óleos microbianos (BEOPOULOS, 2012).

Figura 7 – Via metabólica da síntese de lipídeos a partir de glicerol.

Fonte: Adaptado de: (BARBOSA, 2009; FONTES et al., 2008).

A acumulação de lipídeos em leveduras oleaginosas ocorre quando um nutriente no meio se torna limitado (o nitrogênio ou fonte de fósforo) ficando a fonte de carbono presente em excesso e sendo assimilada pelas células e convertida em triacilgliceróis. A limitação de nitrogênio é a condição mais eficiente para a indução da lipogênese. Depois que o nitrogênio é esgotado do meio, a divisão celular termina e o lipídeo formado tem de ser armazenado dentro das células existentes (BEOPOULOS, 2012; RATLEDGE, 2004; ROSSI et al., 2011).

Vários são os fatores que afetam a lipogênese após o esgotamento de nitrogênio, tais como: (1) acúmulo de ATP (Adenosina Trifosfato) e o esgotamento de AMP (Adenosina Monofosfato); (2) inativação mitocondrial de NAD^+ : isocitrato desidrogenase; (3) o transporte de citrato a partir da mitocôndria para o citosol; (4) expressão citosólica de ATP: citrato liase; (5) inibição do retorno de ATP: atividade liase citrato e citrato de efluxo por ésteres de ácidos graxos de acil-CoA de cadeia longa (SITEPU et al., 2014 (b)).

De um modo geral um passo importante na síntese dos ácidos graxos é a produção de acetil-CoA. Os ácidos graxos são construídos a partir de acetil-CoA e os lipídeos são sintetizados por condensação de um esqueleto de glicerol-3-fosfato com o ácido graxo acabado (LIU et al., 2013).

A limitação de nitrogênio no cultivo de um microorganismo oleaginosa induz a reações que conduzem à formação de acetil-CoA. No início da exaustão de nitrogênio ativa AMP desaminase que supre de NH_4^+ a célula, diminuindo o conteúdo celular de AMP, incluindo o seu conteúdo na mitocôndria. Esta por sua vez afeta a atividade de isocitrato desidrogenase como em células oleaginosas, esta enzima é estritamente dependente de AMP para a atividade. Como isso, o isocitrato não pode ser metabolizado, permitindo o acúmulo de citrato mediante a enzima aconitase. O citrato acumula na mitocôndria e é então transportado para o citosol via malato/citrato sendo convertido em acetil-CoA e oxaloacetato. O oxaloacetato é convertido através de malato desidrogenase de malato, sendo utilizado no sistema de efluxo de citrato (RATLEDGE, 2004).

O acetil-CoA e malonil-CoA produzido durante a síntese de lipídeo são então adicionados na cadeia de ácidos graxos (FA) pela síntese enzimática de ácidos graxos complexos (FAS). Os FAS produzidos ou assimilados pelo meio são direcionados para a via de armazenamento de lipídeos (BEOPOULOS, 2012).

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo contribuir com o desenvolvimento de processos de produção de óleos microbianos por microrganismos heterotróficos empregando como principal fonte de carbono o glicerol.

3.1. Objetivos específicos

Para alcançar tal objetivo as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- Seleção de estirpes de leveduras capazes de produzir lipídeos em cultivos sob condições heterotróficas empregando glicerol como principal fonte de carbono;
- Avaliação da influência das condições de transferência de oxigênio (agitação e razão volume de frasco/volume de meio) em cultivos realizados em incubador de frascos agitados.
- Estabelecimento da composição nutricional mínima do meio de cultivo para produção de lipídio pela levedura selecionada na etapa anterior;
- Avaliação da influência das condições de cultivo como razão carbono / nitrogênio e pH inicial sobre a produção de lipídeos pela estirpe selecionada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de biocombustíveis do Departamento de Engenharia Química (LOQ), da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL-USP). As diversas etapas desenvolvidas no presente trabalho são apresentadas no organograma da Figura 8. Inicialmente foram realizados cultivos visando a seleção da levedura de maior potencial para a produção de lipídeos a partir de glicerol. Com a levedura selecionada foram iniciados os estudos das condições de cultivo para maximizar a produção e acúmulo de lipídeos. Nestes estudos, algumas etapas foram desenvolvidas paralelamente, como as etapas 2 e 3 (Figura 8), compreendidas pela Análise do efeito da agitação/ aeração e Avaliação da influência do pH inicial, respectivamente. E outras etapas foram desenvolvidas de forma subsequente, como as etapas 2 e 4 ou as etapas 3 e 5, nas quais os resultados das etapas anteriores foram considerados para a escolha das condições de cultivo da próxima etapa.

Figura 8 - Organograma das principais etapas desenvolvidas no estudo da produção de óleo microbiano por leveduras a partir de glicerol como fonte de carbono.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1. Microrganismos e preparo do inóculo

No desenvolvimento das atividades experimentais foram utilizadas cinco diferentes leveduras: *Cryptococcus curvatus* Y -1511, *Lipomyces starkeyi* Y-27493, *Rhodotorula glutinis* Y- 12905, *Rhodospiridium toruloides* Y-1091 e *Rhodotorula mucilaginosa* Y-27053, todas cedidas pela USDA (United States Department of Agriculture), de Peoria, Illinois. As culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinado e conservadas em geladeira a 4°C, e transferidas periodicamente. O preparo do inóculo foi realizado transferindo-se uma alçada de células, proveniente de um cultivo de 24 h em meio de manutenção (ágar extrato de malte inclinado), para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura composto de 30,0 g/L de glicerol, 3,0 g/L de Extrato de levedura, 1,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 3,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, o qual foi preparado e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Os frascos foram incubados à 30°C em agitador rotatório a 200 rpm por 24 horas. Após este período as células foram separadas por centrifugação a 2000xg por 10 minutos e ressuspensas em água destilada estéril de modo a obter uma suspensão concentrada. Esta suspensão foi então adicionada como inóculo ao meio de cultivo de modo a obter uma concentração inicial de cerca de células de 1 g/L.

4.2. Seleção de leveduras produtoras de lipídeos

Buscando selecionar a levedura de maior potencial para a produção de óleo microbiano a partir de glicerol como fonte de carbono, foram avaliadas cinco diferentes leveduras: *Cryptococcus curvatus* Y -1511, *Lipomyces starkeyi* Y-27493, *Rhodotorula glutinis* Y- 12905, *Rhodospiridium toruloides* Y-1091 e *Rhodotorula mucilaginosa* Y-27053, Os ensaios para comparação das leveduras foram realizados em frascos agitados de 250 mL com 100 mL de meio de cultura composto de 70,0 g/L de glicerol, 3,0 g/L de Extrato de levedura, 1,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 3,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e pH inicial 6,0. Após o meio de cultura ser inoculado, os frascos foram incubados em agitador rotatório à temperatura de 30°C e agitação de 200 rpm por um período de 120 horas, e durante este período foram retiradas amostras a cada 24 horas para o acompanhamento do crescimento celular, produção de lipídeos e consumo de substrato.

4.3. Efeito da agitação/aeração no acúmulo de lipídeos em cultivos em frascos agitados

Visando determinar as melhores condições de fornecimento de oxigênio para os cultivos em frascos agitados que propiciem maximizar o acúmulo de lipídeos pelas leveduras, foram realizados estudos utilizando a metodologia de planejamento experimental. Nesta etapa foram empregados planejamentos fatoriais do tipo 2^2 com face centrada e triplicata do ponto central, para avaliar os efeitos da variação da velocidade de agitação e da relação volume de frasco/volume de meio de fermentação, sobre o acúmulo de lipídeos pela levedura *R. glutinis*, foram utilizados frascos de 250 mL, conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Planejamento fatorial do tipo 2^2 com face centrada e triplicata no ponto central, para a avaliação do efeito da agitação/aeração, na produção de lipídeos por leveduras a partir de glicerol.

Ensaio	Variáveis			
	Agitação (rpm)		V _{frasco} /V _{meio}	
	Valor real (rpm)	Nível	Valor real	Nível
1	150	-1	2,5	-1
2	250	1	2,5	-1
3	150	-1	5	1
4	250	1	5	1
5	150	-1	3,75	0
6	250	1	3,75	0
7	200	0	2,5	-1
8	200	0	5	1
9	200	0	3,75	0
10	200	0	3,75	0
11	200	0	3,75	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados dos cultivos serão analisados considerando parâmetros como: o consumo de substrato, o crescimento celular, o acúmulo de lipídeos, o fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e em lipídios ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em lipídeos (Q_P). Para a análise estatística será utilizado o software Statistica 13 (licença: JKK510H198630AR-B).

4.4. Estabelecimento da composição mínima do meio de cultivo

Esta etapa do trabalho teve como objetivo avaliar a influência da composição nutricional do meio de cultivo sobre o processo de produção de óleo microbiano em cultivos em frascos agitados, tendo glicerol como principal fonte de carbono. Os efeitos da presença ou ausência de nutrientes como peptona, extrato de levedura, NH_4Cl , KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, bem com suas interações foram estudados através do método estatístico de Taguchi, utilizando uma matriz L_{16} (conforme a Tabela 9), o qual consiste de 16 experimentos nos quais cinco variáveis foram estudadas em dois níveis (Tabela 10).

Tabela 9 –Arranjo Ortogonal de Taguchi L_{16} , onde os fatores principais avaliados nos estudos são A (Peptona), B (Extrato de levedura), C (NH_4Cl), D (KH_2PO_4) e E ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e suas interações, representadas pelas combinações de letras.

Exp.	Condições experimentais														
	A	B	AB	C	AC	BC	DE	D	AD	BD	CE	CD	BE	AE	E
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
5	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2
6	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1
7	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1
8	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2
9	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
10	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1
11	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1
12	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2
13	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1
14	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2
15	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2
16	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de fermentação com composição variada, segundo condições do planejamento experimental, com 1,0 g/L de inóculo de células. Após inoculados, os frascos foram incubados à temperatura de 30°C, sob agitação de 250 rpm. As amostras foram retiradas periodicamente para acompanhamento das fermentações. As respostas observadas são a

produção de biomassa e a produtividade de lipídeos nas diferentes condições do planejamento. Os níveis reais e os codificados utilizados neste estudo são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores e níveis das variáveis estudadas no planejamento Taguchi L16 para a seleção de nutrientes para a composição do meio de cultivo.

Variáveis		Níveis	
		1	2
Peptona	(A)	Ausência	3,0 g/L
Extrato de levedura	(B)	Ausência	3,0 g/L
NH ₄ Cl	(C)	Ausência	3,0 g/L
KH ₂ PO ₄	(D)	Ausência	5,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	(E)	Ausência	1,0 g/L

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados dos cultivos referentes aos ensaios do planejamento experimental serão analisados considerando parâmetros como: o consumo de substrato, o crescimento celular, o acúmulo de lipídeos, o fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e em lipídios ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em lipídeos (Q_P). Para a análise estatística será utilizado o software Statistica 13.

4.5. Avaliação da influência do pH inicial

Visando avaliar a influência da condição de pH inicial do meio de cultivo sobre o acúmulo de lipídeos por leveduras a partir de glicerol, foram realizados cultivos sob diferentes valores de pH inicial, sendo também realizado o acompanhamento de sua variação ao longo do tempo. O pH dos meios de cultura foram ajustados através da adição de ácido sulfúrico (98%) ou adição de hidróxido de sódio (40%), de tal forma que os valores de pH entre 3 e 7. Os ensaios foram realizados em frascos agitados de 250 mL com 50 mL de meio de cultura composto de 70,0 g/L de glicerol, 3,0 g/L de Extrato de levedura, 1,0 g/L de MgSO₄.7H₂O, 3,0 g/L de (NH₄)₂HPO₄ e 20 g/L de fosfato monopotássico. Após o meio de cultura ser inoculado com 1g/L, os frascos foram incubados em agitador rotatório à temperatura de 30°C e agitação de 200 rpm por um período de 240 horas, e durante este período foram retiradas amostras a cada 48 horas para o acompanhamento do crescimento celular, produção de lipídios e consumo de substrato.

4.6. Avaliação da razão carbono:nitrogênio

Buscando estabelecer a proporção entre fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultivo, capaz de favorecer o acúmulo de lipídeos pela levedura foram realizados ensaios variando tal proporção entre 10:1 e 200:1 (razão molar) mantendo-se fixa a fonte de carbono e variando a concentração das fontes de nitrogênio. Nestes ensaios a concentração de glicerol foi fixada em 70,0 g/L, e foi variada a quantidade de extrato de levedura e de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, mantendo sempre a proporção 1:1 entre os compostos nitrogenados. As demais variáveis, como agitação 200 rpm, temperatura 30°C e tempo de cultivo 240 horas, frasco de 250 mL, volume de meio de 50 mL, e retirada de amostra em intervalos de 48 horas mantiveram-se inalteradas.

4.7. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

4.7.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada pela medida das absorbâncias das amostras em espectrofotômetro e as concentrações celulares foram calculadas através de curvas de calibração entre a absorbância a concentração celular em termos de peso seco. Foram feitas curvas de calibração para cada diferente espécie de levedura utilizada neste estudo. Para a determinação da absorbância, amostras foram retiradas do meio de cultivo e foram centrifugadas a 2000 xg por 10 minutos. As células foram lavadas com água destilada e centrifugadas novamente nas mesmas condições, e ressuspensas em água destilada, sendo realizadas diluições entre 10 e 100 vezes, conforme a necessidade. A absorbância da suspensão celular foi determinada a 600 nm, utilizando-se água como branco, e as concentrações foram calculadas utilizando-se as curvas de calibração.

4.7.2. Determinação de lipídeos

Para a determinação de lipídeos produzidos pela levedura foi utilizado o método Bligh & Dyer (1959) na etapa de extração, sendo a quantificação realizada por técnica colorimétrica

empregando o método de coloração por Sulfo-fosfo-vanilina (KNIGHT et al., 1972). Durante a fermentação foram retiradas alíquotas de 1 mL do meio de cultivo, as quais foram centrifugadas para a separação do sobrenadante. As células foram então submetidas a extração de lipídeos. Para a extração foi adicionando as células 1 mL de metanol (pureza de 99,8%) e 2 g de pérolas de vidro (0,50 mm de diâmetro). Esta mistura foi submetida a agitação em vortex por quatro ciclos de um minuto com intervalos de um minuto em banho de gelo (MEDEIROS et al., 2008). Após a realização dos ciclos foram adicionados 2 mL de clorofórmio (P.A. com 99,8% de pureza) e a mistura foi agitada durante 1 hora a 200 rpm (Incubadora refrigerada Shaker, marca CienLab, modelo: CE 725/R), após este período foram acrescentados 1 mL de solução de cloreto de potássio 0,88% visando uma melhor separação de fases e 0,8 mL de água destilada. A mistura foi então centrifugada a 2000 xg por 5 minutos havendo a separação de duas fases. Foi retirada uma alíquota de 0,4 mL da fase de fundo (orgânica) a qual foi colocada em tubos de ensaio e levada a estufa a 80°C por 24 horas para evaporação do solvente.

Para a quantificação de lipídeos pelo método colorimétrico, após a evaporação foi adicionado ao frasco 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (P.M. 98,08, pureza de 95,0 - 98,0%) e a mistura foi aquecida em banho Maria sob fervura por 10 minutos. As amostras foram então resfriadas em água a temperatura ambiente, sendo em seguida adicionada as amostras uma solução de ácido fosfórico (17%) contendo 0,0200 g/L de vanilina para desenvolver a coloração. As amostras foram abrigadas em ambiente isento de luz por 45 minutos. Após esse período foi então determinada a absorbância das amostras a 525 nm, tendo água como branco. A concentração de lipídeos foi calculada por uma curva de calibração baseada no método de sulfo-fosfo-vanilida (KNIGHT et al., 1972).

4.7.3. Determinação de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Waters com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm), nas seguintes condições: temperatura da coluna de 45 °C; ácido sulfúrico 0,005 mol/L como eluente; fluxo de eluente de 0,6 mL/minuto; volume de amostra de 20 µL, temperatura do detector de 35 °C. As amostras foram diluídas em água deionizada e filtradas em filtro Sep-Pack C18 Cartridge (Waters Associates). As

concentrações foram calculadas através de curvas de calibração construídas para uma faixa de concentração de 0,5 a 6 g/L.

4.7.4. Quantificação de nitrogênio

A concentração de nitrogênio ao longo do período de cultivo foi determinada para o ensaios que apresentaram maior acúmulo de lipídeos dentre as diferentes condições avaliadas no estudo da proporção carbono:nitrogênio descrita no item 4.6. O nitrogênio no meio líquido foi quantificado segundo o método 4500- Norg C, Semi-micro-Kjeldahl descrito no “Standard methods for the examination of water and waste-water analysis” (APHA, 1998). As amostras de 1 mL foram submetidas a digestão em ácido sulfúrico concentrado para conversão no nitrogênio em sua forma amoniacal e foi alcalinizado e separado por destilação em um aparelho Buchi K-355, da Buchi/Pensalab, com recolhimento em ácido bórico. A quantidade de amônia recolhida em ácido bórico foi determinada por destilação, e quantidade de nitrogênio na amostra foi calculada com base na estequiometria das diferentes etapas, conforme detalhado a seguir.

As etapas realizadas foram as seguintes: primeiramente transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL de amostra para o tubo Kjeldahl, à esta alíquota foi adicionado 10 mL de ácido sulfúrico e 2,0 g de mistura catalítica (sulfato de sódio anidro/ sulfato de cobre pentaidratado 20:1), a amostra foi levada ao digestor com aquecimento a 250 °C até que a amostra assumisse uma coloração azul límpida. A reação que ocorre nesta etapa está demonstrada na Equação 1.

Após esse período retirou-se a amostra do digestor e adicionou-se solução 40% de NaOH até apresentar uma mudança na coloração de azul límpido a um azul escuro. Sendo a reação demonstrada na Equação 2.

Esta amostra então foi levada ao destilador onde o ácido bórico com indicador teve a função de recolher o gás formado segundo a Equação 3:

Esta reação tem uma duração de 4 minutos. Ao fim da reação retirou-se o produto do destilador e titulou-se com HCl 0,01 M, a Equação (4) representa esta etapa do processo.

Com isso, podemos calcular a concentração de nitrogênio na amostra a partir da Equação 5.

$$C = \frac{(V_{titulação} - V_{Branco}) * f * Concentração\ HCl}{V_{amostra}} \quad (5)$$

4.7.5. Análise do perfil de ácidos graxos

A composição em ácidos graxos dos lipídeos extraídos pela levedura *Rhodotorula glutinis* Y- 12905 foi determinada por cromatografia em fase gasosa, segundo metodologia da AOCS (2004), empregando cromatógrafo de fase gasosa (CG Perkin Elmer modelo Clarus 580), equipado com coluna capilar Perkin Elmer tipo Elite 5 – (5% difenil 95% dimetil polisiloxano), dimensões 30 m, diâmetro interno 0,25 mm, 0,25 µm filme), operando com rampa de aquecimento de 120°C (0,5 min), 120 – 280°C (3°C/min) e 280°C– 6,17 min e hidrogênio como gás de arraste a 0,5 mL por minuto. Os padrões de ácidos graxos utilizados

foram os ácidos caprílico (C8:0); cáprico (C10:0); láurico (C12:0); mirístico (C14:0); palmítico (C16:0); margárico (C17:0); esteárico (C18:0); oleico (C18:1); linoleico (C18:2).

Foram pesados 50 mg do óleo obtido da levedura *Rhodotorula glutinis* Y- 12905 e adicionados 2 mL de etanol contendo HCl 3N, em seguida essa amostra foi incubada à 60°C por cerca de 14 horas. Após o resfriamento foi adicionada 1 mL de uma solução de K₂CO₃ (6%), essa mistura foi submetida a agitação em vortex, em seguida foram adicionados 0,6 mL de hexano e agitou-se em vortex novamente. Essa amostra foi centrifugada por 10 min e uma pequena alíquota da fase contendo o hexano foi retirada para análise por cromatografia gasosa, baseado em (SITEPU et al., 2013).

4.7.6. Estudo reológico

Para a medição da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foi utilizado um viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) utilizando o cone CP 52. As medidas foram feitas a temperatura de 50°C em duplicata, empregando 1mL de amostra. Os dados obtidos (viscosidade, taxa de deformação e tensão de cisalhamento) foram ajustados de acordo com a lei de potência (6), descrito por Freitas et al. (1998), para verificação de possíveis desvios do comportamento Newtoniano.

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad (6)$$

Onde: τ é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de deformação aplicada, n é o valor do coeficiente angular e K é o índice de consistência.

4.7.7. Índice de acidez e teor de ácidos graxos livres (%AGL)

O índice de acidez dos lipídeos foi calculado pela relação de hidróxido de potássio em miligramas consumidos por grama da amostra analisada, sendo determinado segundo

metodologia da AOCS (2004), foi realizada uma titulação utilizando fenolftaleína como indicador, na titulação 0,2 g de amostra com 25 mL de uma solução de éter etílico e álcool etílico (95%) (2:1) foi titulada com uma solução de hidróxido de potássio 0,02 mol/L. Os cálculos do índice de acidez e do teor de ácidos graxos livres estão demonstrados nas equações 7 e 8.

$$IA\left(\frac{mgKOH}{g}\right) = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \cdot MM_{base} \cdot C_{base}}{m_{amostra}} \quad (7)$$

$$\%AGL = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \cdot MM_{ácido\ graxo} \cdot C_{base} \cdot 100}{m_{amostra}} \quad (8)$$

Dados: $V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra, V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco, MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1 g/mol), C_{base} = Concentração molar da solução de KOH (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa da amostra e $MM_{ácido\ graxo}$ = Massa Molar do ácido oleico (282 g/mol).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção da levedura

Para a seleção de leveduras capazes de produzir lipídeos a partir de glicerol como fonte de carbono foram realizados cultivo com cinco diferentes leveduras (*Cryptococcus curvatus* Y-1511, *Lipomyces starkeyi* Y-27493, *Rhodotorula glutinis* Y-12905, *Rhodospiridium toruloides* Y-1091 e *Rhodotorula mucilaginosa* Y-27053), em meio contendo glicerol como principal fonte de carbono. Os perfis de consumo de substrato, crescimento celular e produção de lipídeos para os cultivos das diferentes leveduras estão apresentados na Figura 9.

Em relação ao consumo de glicerol (Figura 9a), foi possível verificar que, de um modo geral, todas as leveduras foram capazes de consumir glicerol durante todo o período de 120 horas de cultivo. Dentre as leveduras avaliadas a *Rhodotorula glutinis* Y-12905 se destacou por ter apresentado um maior consumo de substrato comparada as demais, alcançando um consumo de cerca de 59% do substrato inicial após 120 horas.

Quanto ao crescimento celular (Figura 9b), todas as leveduras apresentaram crescimento durante todo o período observado, sendo este mais pronunciado para as leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Lipomyces starkeyi*, as quais alcançaram concentrações celulares de 23,9 e 22,9 g/L, respectivamente, após 120 horas de cultivo.

A levedura *Rhodotorula glutinis* Y-12905 foi a única, dentre as avaliadas, que mostrou um maior crescimento nas primeiras 24 horas de cultivo, alcançando uma concentração de cerca de 5 g/L neste período. As leveduras *Cryptococcus curvatus* Y-1511, *Rhodotorula glutinis* Y-12905 e *Lipomyces starkeyi* Y-27493 apresentaram um menor crescimento neste mesmo intervalo de tempo, alcançando concentrações inferiores a 3 g/L. O crescimento mais lento foi observado para a levedura *Rhodospiridium toruloides* Y-1091, a qual apresentou crescimento celular somente após o tempo de 48 horas de cultivo. O cultivo do inóculo em meio de cultura contendo glicerol como principal fonte de carbono pode ter contribuído para o fato da maioria das leveduras não ter apresentado período de latência.

Figura 9 - Consumo de Glicerol (a); Perfil de crescimento celular (b); Produção de Lipídeos (c) pelas diferentes leveduras nos cultivos em Glicerol. Onde: ● *Cryptococcus curvatus* Y-1511; ● *Lipomyces*

starkeyi Y-27493; ● *Rhodotorula glutinis* Y- 12905; ● *Rhodospiridium toruloides* Y-1091 e ● *Rhodotorula mucilaginosa* Y-27053.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação à produção de óleos microbianos, todas as espécies foram capazes de produzir e acumular lipídeos durante o tempo de cultivo avaliado. As leveduras mostraram um acúmulo de lipídeos crescente durante todo o período observado, sendo a concentração de óleos microbianos dependente da espécie de levedura. De um modo geral as concentrações de lipídeos após 120 horas de cultivo variaram entre 0,06 e 1,16 g/L, sendo a maior produção observado para a levedura *Cryptococcus curvatus* Y-1511. Estes resultados demonstram que a capacidade de produção de lipídeos pode variar de forma expressiva em diferentes espécies, sendo a comparação de diferentes leveduras um aspecto importante a ser considerado para avaliar o potencial das leveduras. Na Tabela 11 são apresentados os valores máximos de consumo de substrato, concentração celular, concentração de lipídeos e o teor de lipídeos, assim como os parâmetros fermentativos produtividade volumétrica em lipídeos (Q_P), fator de conversão de substrato em lipídeos ($Y_{P/S}$) e fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) observados nos cultivos das leveduras utilizando glicerol como substrato.

As maiores produtividades volumétricas em lipídeos, 0,0096 g/L.h e 0,0083 g/L.h, foram alcançadas nos cultivos com as leveduras *Cryptococcus curvatus* Y-1511 e *Rhodotorula glutinis* Y-12905, respectivamente (Tabela 11). As produtividades volumétricas em lipídeos alcançada nesta etapa do trabalho são pequenos quando comparados a literatura. Nos estudos realizados por Spier (2014), são reportados valores de produtividade volumétrica em lipídeos de até 0,104 g/L.h e 0,028 g/L.h para as leveduras *Cryptococcus curvatus* e *Rhodotorula glutinis*, respectivamente, para cultivos realizados em frascos agitados em meio contendo 100 g/L de glicerol bruto como fonte de carbono. Os valores de produtividade em lipídeos reportados por este autor são superiores aos encontrados na etapa inicial do presente trabalho, entretanto é importante ressaltar que os resultados obtidos até agora visam apenas a seleção de leveduras, e assim as condições de cultivo empregadas não são condições otimizadas. Desta forma tais resultados evidenciam a necessidade do desenvolvimento de estudos voltados para o estabelecimento de melhores condições de cultivo para a maximização da produção de lipídeos. Além disso, os resultados reportados por Spier (2014) demonstram a existência de um importante potencial para o aumento na produtividade em lipídeos das leveduras avaliadas, o que será melhor explorado nas etapas seguintes deste trabalho, pela avaliação das condições de cultivo dos microrganismos.

Os maiores valores observados para o fator de conversão de substrato em lipídeos foram obtidos pelas leveduras *Cryptococcus curvatus* Y-1511 e *Lipomyces starkeyi* Y-27493, com 0,046 e 0,044 respectivamente. Estas mesmas leveduras foram as que obtiveram os maiores fatores de conversão de substrato em biomassa quando compara as demais leveduras.

Tabela 11 – Resultados da fermentação utilizando Glicerol como substrato em 120 horas de cultivo.

Levedura	Consumo de substrato (%)	Células (g/L)	Lipídeos (g/L)	Lipídeos (%)	Q _P (g/L.h)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Y-27053	30,3	14,1	0,5	3,7	0,0043	0,022	0,61
<i>Rhodosporidium toruloides</i> Y-1091	15,8	8,2	0,1	0,7	0,0005	0,003	0,76
<i>Rhodotorula glutinis</i> Y-12905	58,5	23,9	1,0	4,2	0,0083	0,023	0,54
<i>Cryptococcus curvatus</i> Y-1511	34,6	18,6	1,2	6,2	0,0096	0,046	0,72
<i>Lipomyces starkeyi</i> Y-27493	30,6	22,9	0,9	4,0	0,0076	0,044	1,05

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre as leveduras avaliadas a levedura *Rhodotorula glutinis* Y – 12905 e a *Cryptococcus curvatus* Y-1511 foram as que mais se destacaram como sendo as mais promissoras para a produção de lipídeos a partir de glicerol. Estas leveduras apresentaram uma capacidade de acúmulo de lipídeos e produtividade volumétrica superiores as demais avaliadas. Quanto ao fator de conversão de substrato em produto à levedura *Cryptococcus curvatus* Y-1511 apresentou um valor de duas vezes o alcançado pela *Rhodotorula glutinis* Y-12905. Entretanto, esta última foi capaz de consumir glicerol de maneira mais rápida, alcançando um consumo de 58,5%, ou seja, cerca de 70% superior ao consumo apresentado pela *Cryptococcus curvatus* Y-1511, a qual apresentou o segundo maior consumo entre as leveduras avaliadas. Uma elevada afinidade pelo substrato é uma importante característica a se considerar na seleção de microrganismos, uma vez que a capacidade de dissimilar substrato é um fator que pode limitar a capacidade de formação de produto, podendo impactar parâmetros importantes de processo, como a produtividade, por exemplo. Desta forma tendo em vista a capacidade elevada de consumo de glicerol dentre as leveduras avaliadas e por ter alcançado uma das maiores produtividades em lipídeos, a *Rhodotorula glutinis* Y-12905 foi selecionada como sendo a de maior potencial para a produção de lipídeos a partir de glicerol.

5.2. Efeito da agitação/aeração no acúmulo de lipídeos em cultivos em frascos agitados

A disponibilidade de oxigênio em cultivos microbianos é um parâmetro que pode exercer grande influência sobre o metabolismo, podendo interferir fortemente tanto no crescimento celular quanto na síntese de bioprodutos. Desta forma no presente tópico é abordado o estudo da influência da disponibilidade de oxigênio sobre a obtenção de lipídeos e células utilizando a levedura *R. glutinis* tendo como variáveis a agitação e a razão o volume de frasco e o volume de meio de cultivo ($V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$).

Nos ensaios do planejamento a razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ variou de 2,5 a 5 e a agitação de 150 a 250 rpm. Como resposta do planejamento foram avaliados o consumo de substrato, crescimento celular, acúmulo de lipídeos além dos parâmetros de fermentação $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ e Q_P .

O planejamento fatorial consistiu de 11 diferentes experimentos os quais são apresentados na Tabela 12, juntamente com as respostas avaliadas.

Tabela 12 - Planejamento fatorial empregado na avaliação da influência da agitação e da razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ sobre a produção de lipídeos.

Ensaio	Nível das Variáveis		Respostas					
	A	B	Células (g/L)	Lipídeos (g/L)	Substrato Residual (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)
1	-1	-1	10,50	0,89	46,69	0,084	1,0007	0,007
2	1	-1	24,24	2,32	17,94	0,096	1,0008	0,019
3	-1	1	18,01	1,65	24,74	0,092	1,0008	0,014
4	1	1	39,44	4,45	8,70	0,113	1,0009	0,037
5	-1	0	16,81	1,24	32,13	0,074	1,0006	0,010
6	1	0	30,89	4,18	13,30	0,136	1,0011	0,035
7	0	-1	14,94	1,54	37,61	0,103	1,0009	0,013
8	0	1	27,60	3,62	18,82	0,131	1,0011	0,030
9	0	0	21,52	1,60	22,13	0,074	1,0006	0,013
10	0	0	18,89	1,21	21,28	0,064	1,0005	0,010
11	0	0	19,64	1,06	29,21	0,054	1,0005	0,009

A = Razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$; B = Agitação. Q_P calculado para 120 horas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a levedura foi capaz de acumular lipídeos em todas as condições de cultivo avaliadas, no período de cultivo observado, porém, houve uma grande variação nas concentrações finais de células e óleos, demonstrando assim a influência da aeração na produção de lipídeos. A fim de melhor visualização dos resultados obtidos, os mesmos foram organizados em um gráfico de barras apresentado na Figura 10. A máxima concentração de lipídeos foi obtida no ensaio 4 (250 rpm e com razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ de 5:1) alcançando 4,45 g/L de lipídeos em 120 h de cultivo. O ensaio no qual se obteve as menores concentrações de óleo e células (0,89 e 10,5 g/L, respectivamente) foi o ensaio 1, com agitação de 150 rpm e razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ de 2,5:1. Estes dados apontam para uma influência positiva do aumento da aeração na produção de óleo microbiano e crescimento celular.

Figura 10 – Gráfico de barras que expressa a concentração celular e de lipídeos, e o substrato residual para os diferentes ensaios do planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central para a avaliação da influência da Aeração sobre a produção de lipídeos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os efeitos da agitação e da razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ foram avaliados mais cuidadosamente através de ferramentas estatísticas utilizando-se a metodologia de superfície de resposta. No gráfico de Pareto da Figura 11 está representado a estimativa do efeito das variáveis estudadas sobre o consumo de substrato. Para esta análise são considerados termos significativos aqueles onde os valores de $t_{\text{calculado}}$ (representado pelas barras no gráfico de Pareto) são superiores ao valor de t_{tabelado} (representado pela linha vermelha do gráfico de Pareto), para a distribuição de Student, a 95% de confiança. Para a resposta consumo de substrato a análise do gráfico de Pareto (Figura 11) demonstrou que apenas os efeitos lineares das variáveis (1) Agitação e da (2) razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ foram significativos para um nível de confiança de 95%.

Figura 11- Gráfico de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta substrato residual.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para verificar a qualidade do ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto para a explicação da variação observada na resposta consumo de substrato foram realizadas as análises de variância dos efeitos e do modelo matemático (Tabelas 13 e 14 respectivamente). Na análise de variância dos efeitos foram considerados significativos apenas os efeitos lineares das variáveis (A) Agitação e da (B) Razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$, ou seja, os mesmos termos apontados como significativos na análise dos gráficos de Pareto. Na análise de variância do modelo matemático proposto para explicar a variação da resposta consumo de substrato

(equação 9) foi obtido um coeficiente de determinação de cerca de 0,90 demonstrando assim um bom ajuste do modelo aos dados.

Tabela 13 - Análise de variância dos efeitos principais dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a concentração de substrato residual.

Variável resposta	Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P	Contribuição (%)
Glicerol residual (g/L)	(A) Agitação	674,584	1	674,58410	69,3	0,00040	55,75
	A²	17,836	1	17,83630	1,8	0,23363	1,47
	(B) Vf/Vm	416,250	1	416,25010	42,8	0,00124	34,40
	B²	20,506	1	20,50600	2,1	0,20619	1,69
	A*B	40,335	1	40,33520	4,1	0,09729	3,33
	Erro	48,625	5	9,72490			
	Total	1210,09	10			R² = 0,9598	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 14 - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da concentração de substrato residual, obtido com base nos termos significativos.

Variável resposta	Fatores	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	P
Glicerol residual (g/L)	Modelo	1090,83	2	545,42	0
	Falta de ajuste	81,33	6	13,56	0,683
	Erro puro	37,92	2	18,96	
	Erro Total	119,26	8	14,91	
	Total	1210,09	10		
					R² = 0,9014

Fonte: Elaborado pelo autor.

Baseado no resultado de análise de variância do modelo que descreve a Concentração de glicerol residual em função da agitação e da razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$, o mesmo pôde ser apresentado na forma da Equação 9.

$$\text{Glicerol residual (g/L)} = 24,78 - 10,60 \text{ Agitação} - 8,33 V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}} \quad (9)$$

Utilizando a Equação 9 foi possível representar o comportamento do substrato residual na forma de um gráfico de superfícies de resposta.

Na Figura 12 é apresentada a superfície de resposta que relaciona o substrato residual no cultivo da levedura após 120 horas em função da razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ e a agitação. Verificou-

se que o consumo de substrato foi favorecido pelo aumento de ambas as variáveis para o nível +1 (maior condição de aeração). Nestas condições de cultivo, 250 rpm e razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ de 5:1, foi estimada uma concentração de cerca de 8 g/L de glicerol residual, ou seja, um consumo de cerca de 89% do substrato em 120 horas de cultivo.

Figura 12 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) que relacionam a concentração de glicerol residual com relação $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ e agitação empregados durante o cultivo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No gráfico de Pareto mostrado na Figura 13 estão representadas as estimativas do efeito das variáveis estudadas sobre a concentração celular. Nesta análise são considerados termos significativos os termos onde os valores de $t_{\text{calculado}}$ (representado pelas barras no gráfico de Pareto) são superiores ao valor de t_{tabelado} (representado pela linha vermelha do gráfico de Pareto), para a distribuição de Student, a 95% de confiança.

Para a resposta concentração celular, os efeitos lineares das variáveis (1) Agitação e da (2) Razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ lineares, assim como o efeito quadrático da Agitação e o efeito de interação entre a Agitação e da razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ foram significativos a um nível de confiança de 95%. Ainda para esta resposta apenas o efeito quadrático da razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ não foi estatisticamente significativo.

Figura 13 - Gráficos de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta produção de biomassa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para verificar a qualidade do ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto para a explicação da variação observada na resposta de concentração celular foram feitas análises de variância dos efeitos e do modelo matemático obtido (Tabelas 15 e 16, respectivamente). Na análise de variância dos efeitos foram considerados significativos os efeitos lineares das variáveis (A) Agitação e da (B) Razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ lineares, assim como o efeito quadrático da Agitação (A^2) e o efeito de interação entre a Agitação e da razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ($A*B$), ou seja, os mesmos termos observados nos gráficos de Pareto. O coeficiente de determinação

alcançado para o modelo que descreve a resposta concentração celular foi superior a 0,98, demonstrando assim um bom ajuste do modelo às observações realizadas.

Tabela 15 - Análise de variância dos efeitos principais dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a resposta concentração celular.

Variável resposta	Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P	Contribuição (%)
Células (g/L)	(A) Agitação	404,29	1	404,29	183,5	0,00004	61,25
	A²	19,19	1	19,18	8,7	0,03185	2,91
	(B) Vf/Vm	208,57	1	208,57	94,6	0,00020	31,60
	B²	0,07	1	0,07	0,03	0,86500	0,01
	A*B	14,78	1	14,78	6,71	0,04883	2,24
	Erro	11,01	5	2,20			
Total		660,06	10			R² = 0,9833	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 16 - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da concentração celular, obtido com base nos termos significativos.

Variável resposta	Fatores	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	P
Células (g/L)	Modelo	648,97	4	162,244	0
	Falta de ajuste	7,418	4	1,855	0,552
	Erro puro	3,669	2	1,834	
	Erro Total	11,087	6	1,848	
	Total	660,063	10		
					R² = 0,9832

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise de variância do modelo para produção de biomassa foi adequada para descrever o comportamento observado, visto que o modelo foi significativo, e não apresentou falta de ajuste significativa. Baseado no resultado de análise de variância para a resposta que descreve a concentração celular em função da Agitação e da Razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$, o modelo matemático pode ser apresentado na forma da equação 10.

$$\text{Conc. celular (g/L)} = 20,5 + 8,2 A + 5,9 B + 2,8 A^2 + 1,922 A * B \quad (10)$$

A Equação 10 possibilitou representar o modelo matemático por meio de um gráfico de superfícies de resposta como mostrado na Figura 14.

Figura 14 – Gráfico de superfície de resposta (a) e curva de nível (b) de que relaciona produção de biomassa com relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ e agitação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 14 é apresentada a superfície de resposta que relaciona a produção celular em função da razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ e a Agitação para o tempo de 120 horas de cultivo. Dentro da região de variação avaliada a máxima concentração celular 39,4 g/L foi obtida no nível +1 de ambas as variáveis (maior condição de aeração), ou seja, agitação de 250 rpm com uma relação $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ 5,0. De fato, condições de maior disponibilidade de oxigênio tendem a favorecer o crescimento celular, uma vez que o metabolismo oxidativo proporciona um ganho energético mais elevado quando comparado ao metabolismo em condições de limitação de oxigênio.

No gráfico de Pareto da Figura 15 estão representadas as estimativas dos efeitos das variáveis estudadas sobre a produção de lipídeos. São considerados termos significativos nesta análise os termos onde os valores de $t_{\text{calculado}}$ (representado pelas barras no gráfico de Pareto) são superiores ao valor de t_{tabelado} (representado pela linha vermelha do gráfico de Pareto), para a distribuição de Student, a 95% de confiança.

Figura 15 - Gráfico de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta concentração de lipídeos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a produção de lipídeos, a análise do gráfico de Pareto (Figura 15) demonstrou que os termos lineares das variáveis (1) Agitação e (2) razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ foram significativas a um nível de 95% de confiança. Verificou-se ainda que os termos quadráticos assim como o termo de interação AB, não apresentaram efeitos significativos dentro da faixa de variação observada neste estudo.

Com a finalidade de verificar a qualidade do ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto para a explicação da variação observada na resposta de produção de lipídeos foram feitas análises de variância dos efeitos e do modelo (Tabelas 17 e 18 respectivamente). Na análise de variância dos efeitos, apenas os efeitos principais das variáveis (A) Agitação e (B) Razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ foram significativos, os mesmos termos considerados significativos na análise do gráfico de Pareto. Na análise de variância do modelo matemático proposto foi

obtido um coeficiente de determinação de 0,74, sendo o modelo estatisticamente significativo e não apresentando falta de ajuste a um nível de significância de 0,05. Sendo assim considerado adequado para descrever o comportamento observado pela variável resposta.

Tabela 17 - Análise de variância dos efeitos principais dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a produção de lipídeos.

Variável resposta	Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P	Contribuição (%)
Lipídeos (g/L)	(A) Agitação	8,54	1	8,54	18,6	0,00761	50,24
	A²	0,73	1	0,73	1,6	0,26105	4,33
	(B) Vf/Vm	4,13	1	4,13	9,0	0,03001	24,34
	B²	0,42	1	0,42	0,9	0,38262	2,47
	A*B	0,46	1	0,46	1,0	0,36164	2,72
	Erro	2,29	5	0,45			
Total		17,00	10			R² = 0,865	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 18 - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da produção de lipídeos, obtido com base nos termos significativos.

Variável resposta	Fatores	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	P
Lipídeos (g/L)	Modelo	12,6833	2	6,34134	0,004
	Falta de ajuste	4,1691	6	0,69485	0,103
	Erro puro	0,1544	2	0,07721	
	Erro Total	4,3235	8	0,54044	
	Total	17,0068	10		
					R² = 0,7457

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base no resultado de análise de variância do modelo de resposta que descreve a produção de lipídeos, o modelo matemático pode ser representado na forma da equação 11.

$$\text{Lipídeos (g/L)} = 2,160 + 1,193 A + 0,831 B \quad (11)$$

Utilizando a Equação 11 foi possível representar o modelo matemático para a produção de lipídeos por meio de um gráfico de superfícies de resposta, conforme mostrado na Figura 16.

Na Figura 16 é apresentada a superfície de resposta que relaciona a concentração de lipídeos acumulados pela levedura após 120 horas de cultivo em função da razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$

e a agitação empregadas no cultivo. Analisando a superfície de resposta foi possível verificar que o aumento do valor de ambas as variáveis avaliadas influenciou positivamente o acúmulo de lipídeos. Dentro da região de variação observada a concentração de lipídeos variou entre 0,9 g/L e 4,5 g/L, sendo a máxima concentração obtida no nível +1 das duas variáveis (maior condição de aeração), ou seja, agitação de 250 rpm com uma relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ 5,0.

Figura 16 – Gráfico de superfície de resposta (a) e curvas de nível (b) que relaciona produção de lipídeos com relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ e agitação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 17 é mostrada o gráfico de Pareto para a resposta conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) com a estimativa dos efeitos das variáveis Agitação e Razão entre Volume de frasco e Volume de meio. Os termos considerados significativos são os quais os valores de $t_{\text{calculado}}$ (representado pelas barras no gráfico de Pareto) apresentam-se superiores ao valor de t_{tabelado} (representado pela linha vermelha do gráfico de Pareto), para a distribuição de Student, a 95% de confiança.

Figura 17 - Gráfico de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$ (g/g).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a resposta da conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$ (Figura 17) a análise do gráfico de Pareto demonstrou que nenhuma das variáveis foram significativas para um nível de confiança de 95%. Os resultados observados na análise do gráfico de Pareto foram confirmados na análise de variância para os efeitos (Tabela 19), na qual não houveram efeitos significativos, sendo encontrado um baixo coeficiente de determinação, cerca de 0,50, demonstrando assim que, dentro da região de variação avaliada, as variáveis estudadas não tiveram influência estatisticamente significativa sobre o fator de conversão de substrato em produto.

Na Figura 18 é representado o gráfico de Pareto para a estimativa do efeito da Agitação da Razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ para a resposta conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$). São considerados significativos para a distribuição de Student, a 95% de confiança os termos cujos valores de $t_{\text{calculado}}$ (representado pelas barras no gráfico de Pareto) apresentam-se superiores ao valor de t_{tabelado} (representado pela linha vermelha do gráfico de Pareto). De

modo semelhante ao observado para a conversão de substrato em lipídeos ($Y_{P/S}$) na análise da conversão de substrato em células $Y_{X/S}$ nenhuma das variáveis avaliadas foram significativas a um nível de confiança de 95%. A análise de variância dos efeitos para o fator de conversão de substrato em células (Tabela 20), também confirmou que esta resposta foi independente das variáveis avaliadas. Tal comportamento pode estar relacionado ao fato de que o consumo de substrato, o crescimento celular e o acúmulo de lipídeos variaram de maneira conjunta, de modo que, dentro da região de variação observada, os fatores de conversão de substrato em produto, ou substrato em células, permaneciam praticamente com o mesmo valor independente da condição de oxigenação estabelecida.

Tabela 19 - Análise de variância dos efeitos principais, dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a conversão de substrato em produto.

Variável resposta	Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P	Contribuição (%)
$Y_{P/S}$ (g/g)	(A) Agitação	0,00146	1	0,00146	2,15	0,20	21,09
	A²	0,00017	1	0,00017	0,24	0,63	2,43
	(B) Vf/Vm	0,00047	1	0,00047	0,69	0,44	6,79
	B²	0,00108	1	0,00108	1,59	0,26	15,57
	A*B	0,00002	1	0,00002	0,03	0,86	0,33
	Erro	0,00338	5	0,00068			
Total		0,0069	10				$R^2 = 0,5113$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 - Gráfico de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta conversão de substrato em Lipídeos $Y_{X/S}$ (g/g).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 20 - Análise de variância dos efeitos principais dos termos quadráticos e de interações (com 95% de confiança) para a conversão de substrato em lipídeos.

Variável resposta	Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P	Contribuição (%)
Y _{X/S} (g/g)	(A) Agitação	1,01E-07	1	1,01E-07	2,1585	0,201727	21,09
	A ²	1,17E-08	1	1,17E-08	0,2485	0,639288	2,43
	(B) Vf/Vm	3,26E-08	1	3,26E-08	0,6941	0,442738	6,78
	B ²	7,49E-08	1	7,49E-08	1,5938	0,262462	15,58
	A*B	1,60E-09	1	1,60E-09	0,0343	0,860315	0,33
	Erro	2,35E-07	5	2,35E-07			
Total		4,81E-07	10				R ² = 0,5113

Fonte: Elaborado pelo autor.

No gráfico de Pareto da Figura 19 está representado a estimativa do efeito das variáveis estudadas sobre a produtividade volumétrica de lipídeos (Q_p). Para esta análise são considerados termos significativos aqueles cujos os valores de t_{calculado} (representado pelas barras no gráfico de Pareto) são superiores ao valor de t_{tabelado} (representado pela linha vermelha do gráfico de Pareto), para a distribuição de Student, a 95% de confiança.

Figura 19 - Gráfico de Pareto que expressa as estimativas dos efeitos padronizados (barra azul) e limite de significância estatística ao nível de 95 % de confiança (linha vermelha) para a resposta a produtividade de lipídeos Q_p (g/L.h).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para Q_P (Figura 19) a análise do gráfico de Pareto demonstrou que apenas os efeitos lineares das variáveis (1) Agitação e da (2) razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ lineares apresentaram significância para um nível de confiança de 95%. Para verificar a qualidade do ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto para a explicação da variação observada na resposta Q_P foram realizadas análises de variância. Na análise de variância dos efeitos (Tabela 21), foram considerados significativos os efeitos lineares da (A) Agitação e da (B) razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$, ou seja, os mesmos termos observados nos gráficos de Pareto. Para a análise de variância do modelo foi obtido um coeficiente de determinação de cerca de 0,75, sendo o modelo estatisticamente significativo e não havendo falta de ajuste.

Tabela 21 - Análise de variância dos efeitos principais dos termos quadráticos e de interações (com

Variável resposta	Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P	Contribuição (%)
Q_P (g/L.h)	(A) Agitação	0,00059	1	0,00059	18,60	0,007	50,21
	A²	0,00005	1	0,00005	1,60	0,261	4,32
	(B) Vf/Vm	0,00029	1	0,00029	9,01	0,030	24,30
	B²	0,00003	1	0,00003	0,91	0,382	2,46
	A*B	0,00003	1	0,00003	1,00	0,361	2,71
	Erro	0,00016	5	0,00003			
	Total	0,00118	10				R² = 0,865

95% de confiança) para a produtividade de lipídeos Q_P (g/L.h).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 22 - Análise de variância da regressão para o modelo representativo para a produtividade de lipídeos, obtido com base nos termos significativos.

Variável resposta	Fatores	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	P
Q_P (g/L.h)	Modelo	0,000881	2	0,00044	0,004
	Falta de ajuste	0,00029	6	0,000048	0,103
	Erro puro	0,000011	2	0,000005	
	Erro Total	0,0003	8	0,000038	
	Total	0,001181	10		
					R² = 0,7458

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base no resultado de análise de variância do modelo para a resposta produtividade de lipídeos (Q_P), pode-se propor um modelo matemático representado na

equação 12. Utilizando esta equação foi possível representar o modelo por meio de gráficos de superfícies de resposta, os quais são apresentados na Figura 20.

$$Q_p(\text{g/L.h}) = 0,01800 + 0,00994 A + 0,00692 B \quad (12)$$

Na Figura 20 está representado o gráfico de superfície de resposta que relaciona a produtividade volumétrica de lipídeos com a razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ e a agitação empregadas no cultivo. Através da análise da superfície de resposta verificou-se que o aumento do valor de ambas as variáveis avaliadadas influenciou positivamente o a produtividade volumétrica de lipídeos. Dentro da região de variação observada a produtividade volumétrica variou entre 0,007g/L.h e 0,037g/L, sendo a máxima produtividade foi obtida na condição de maior aeração (nível +1 das duas variáveis, ou seja, agitação de 250 rpm com uma relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ 5,0. De forma semelhante ao observado para a crescimento celular, acumulo de lipídeos e para o consumo de substrato, a produtividade em lipídeos mostrou ser favorecida em condições de maior disponibilidade de oxigênio.

Dentro da região de variação estudada, não foi observada a ocorrência de um ponto ótimo. De um modo geral, os resultados sugerem que maiores concentrações de células e lipídeos, assim como uma maior produtividade volumétrica em lipídeos, poderiam ser alcançadas aumentando-se a agitação ou reduzindo a razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$, ou seja, proporcionando maiores níveis de oxigenação ao meio de cultivo. Verificou-se ainda que, dentro desta região, não houveram variações significativas no fator de conversão de substrato em células ou em produto. Apesar da tendência observada, não foi possível realizar ensaios com maiores agitações devido à limitações físicas (máxima agitação possível de 250 rpm). Também optou-se por não aumentar a razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ devido ao baixo volume de meio de cultivo nos frascos agitados que seria necessário. Desta forma, com base na tendência observada nos planejamentos experimentais as qual sugerem uma melhora no processo em condições de maior oxigenação, uma possibilidade para futuros estudos seria o desenvolvimento de cultivos em biorreatores, os quais poderiam proporcionar maiores níveis de oxigenação, além de permitirem a quantificação de tais níveis em termos de capacidade de transferência de oxigênio ao meio de cultivo.

Figura 20 – Gráfico de superfície de resposta que relaciona produção de lipídeos com as variáveis Agitação e Relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

De fato, níveis mais elevados de aeração têm sido reportados como condições propícias para a produção de lipídeos. Machado Junior (2010) estudou a influência da agitação e aeração na produção de biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, cultivadas em reator, utilizando como fonte de carbono glicerina residual. O estudo foi realizado através de um planejamento fatorial para análise dos efeitos das variáveis agitação e aeração, os parâmetros avaliados foram o crescimento celular, os teores de proteínas e lipídeos. Inicialmente foi realizado um crescimento em frascos agitados de 500 mL contendo 200 mL de meio utilizando 33,9 g/L de glicerina, agitação de 180 rpm e pH inicial ajustado em 4,8, à temperatura de 30°C e, a biomassa celular máxima obtida foi de 15,74g/L. Foram realizados cultivos utilizando em biorreator Biostat B, com capacidade de 5 L, variando-se a agitação em (100, 200 e 300 rpm) e a aeração em (0,5 vvm, 1,0 vvm e 1,5 vvm) verificou-se que o melhores resultados foram obtidos com 200 rpm de agitação e aeração de 1 vvm sendo obtida 19,14 g/L de biomassa celular, teor de lipídeos de 7,87%. Observou ainda que o cultivo em biorreator de bancada implicou em melhoria do desempenho da levedura quando comparado ao cultivo em frascos agitados, resultando em um incremento na máxima concentração de biomassa de 15,74 para 19,14 g/L, e na produtividade volumétrica de lipídeos aumentou de 0,11 para 0,37 g/L.h, para cultivos em frascos agitados e em biorreator, respectivamente.

5.3. Estabelecimento de composição mínima do meio de cultivo

Visando verificar a influência da composição nutricional do meio de cultivo sobre o crescimento celular e acúmulo de lipídeos pela levedura foram realizados ensaios em frascos agitados empregando meios de cultivo com diferentes composições nutricionais, de acordo com um planejamento fatorial. Todos os experimentos foram realizados em frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio de fermentação. Os frascos foram inoculados com 1 g/L de células e incubados em agitador rotatório sob agitação de 250 rpm, a temperatura de 30 °C, por 240 horas, sendo as amostras retiradas a cada 48 horas para o acompanhamento do processo.

As condições de incubação de rotação de 250 rpm e 50 mL de meio de fermentação em frascos de 250 mL, utilizadas para realização destes ensaios se deve aos resultados obtidos na etapa anterior, sendo estas as condições que favoreceram a produção lipídica. O aumento

do tempo de cultivo para 240 horas é devido ao consumo incompleto do glicerol em 120 horas de cultivo observados em todos os ensaios realizados na etapa anterior deste estudo.

A seleção dos fatores mais importantes para o estudo foi realizada pela análise estatística dos resultados, fazendo-se uso do método de Taguchi. Realizou-se os experimentos segundo um arranjo ortogonal L16 composto por 16 experimentos, no qual os fatores analisados foram empregados em dois diferentes níveis (1 e 2) os valores reais que correspondem aos níveis são mostrados na Tabela 10 (do item materiais e métodos). Neste estudo avaliou-se os efeitos da presença de Peptona (A), Extrato de levedura (B), NH_4Cl (C), KH_2PO_4 (D) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (E), assim como seus efeitos de interação AB (Peptona/Extrato de levedura), AC (Peptona/ NH_4Cl), BC (Extrato de levedura/ NH_4Cl), AD (Peptona/ KH_2PO_4), CE ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), BE (Extrato de levedura/ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e AE (Peptona/ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). As diferentes condições experimentais, assim como as respostas do planejamento são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 -Matriz experimental de Taguchi L16, com as diferentes condições de cultivo avaliadas, e as respostas: produção de células, concentração de

Ensaio	Condições experimentais (Fatores e Interações)															Respostas					
	A	B	AB	C	AC	BC	DE	D	AD	BD	CE	CD	BE	AE	E	Células (g/L)	Lipídeos (g/L)	Substrato (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)
	Peptona	E.L.		NH ₄ CL			*	KH ₂ PO ₄		*		*			MgSO ₄ .7H ₂ O						
1	1	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	0,7	0,7	44,2	0,06	0,06	0,003
2	1	1	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1,6	0,8	42,0	0,06	0,12	0,003
3	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	0,9	0,6	40,1	0,04	0,07	0,002
4	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	1,0	0,6	48,1	0,09	0,14	0,003
5	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	2	25,4	4,3	13,5	0,10	0,60	0,018
6	1	2	1	1	2	1	1	2	1	2	2	1	1	2	1	8,9	1,1	16,4	0,03	0,24	0,005
7	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1,9	0,8	25,8	0,03	0,07	0,003
8	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	3,2	1,0	18,4	0,03	0,09	0,004
9	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	2	13,9	2,0	29,4	0,11	0,77	0,008
10	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	1	5,2	1,2	33,7	0,15	0,67	0,005
11	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	7,8	1,2	29,1	0,06	0,41	0,005
12	2	1	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	15,1	2,0	28,9	0,09	0,63	0,009
13	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1	4,2	1,0	23,5	0,03	0,14	0,004
14	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	28,8	4,4	5,7	0,11	0,74	0,018
15	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	2	2	2	19,8	2,7	0,2	0,07	0,50	0,011
16	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	4,9	1	24,6	0,04	0,19	0,004

lipídeos, consumo de substrato, Y_{P/S}, Y_{X/S} e Q_P.

*Usados na estimativa do erro experimental.

Fonte: Elaborado pelo autor.

De um modo geral, a levedura foi capaz de produzir e acumular lipídeos em todas as condições usadas nos diferentes ensaios do planejamento (Tabela 23), porém houve grande variação das concentrações finais de lipídeos obtidas, variando entre 0,6 g/L e 4,4 g/L, assim como para a concentração celular, entre 0,7 g/L e 28,8 g/L, o que demonstra uma importante influência da composição nutricional para a obtenção de óleos microbianos.

Para uma análise inicial dos dados de acúmulo de lipídeos e concentração celular nas diferentes condições de cultivo, os resultados foram organizados na forma de gráficos de barra conforme apresentado na Figura 21. Verificou-se que o ponto que apresentou a maior produção de células, cerca de 28,8 g/L em 240 horas (condição 14), foi aquele em que estavam presentes os nutrientes Peptona, Extrato de levedura, KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ensaio 14), seguido pelo ensaio composto pelos nutrientes Extrato de levedura e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ensaio 5) com cerca de 25,4 g/L o que indica uma possível influência positiva da adição destes nutrientes (Extrato de levedura e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) sobre o crescimento celular. As maiores concentrações de lipídeos 4,4 g/L e 4,3 g/L após 120 horas de cultivo foram obtidas nos ensaios 14 e 5, respectivamente. Por outro lado os pontos com as menores concentrações de células e lipídeos, inferiores a 1,0 g/L após 240 horas, foram os ensaios de 1 à 4. Nestes ensaios os cultivos foram realizados na ausência de extrato de levedura e de peptona, ou seja, na ausência de fontes orgânicas de nitrogênio. Estes baixos consumos de substrato, crescimento celular e produção de lipídeos observadas nos ensaios de 1 à 4 pode indicar que fontes de nitrogênio orgânicas, como aminoácidos por exemplo, são de fundamental importância para que tanto para o acúmulo de lipídeos quanto para o crescimento celular da levedura.

Figura 21 - Gráfico de barras que expressa os resultados de concentração celular, lipídeos e consumo de substrato para os diferentes ensaios do planejamento experimental Taguchi L16 (Pep. = Peptona, E.L. = Extrato de levedura).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a avaliação dos nutrientes mais relevantes para o processo de produção e acúmulo de óleos microbianos foi empregada como ferramenta estatística o método de Taguchi. As respostas avaliadas no planejamento experimental foram: a máxima concentração de lipídeos acumulada, a concentração celular, o consumo de substrato, o fator de conversão de substrato em biomassa, o fator de conversão de substrato em lipídeos e a produtividade volumétrica em lipídeos. A significância estatística dos efeitos das variáveis sobre as respostas foram verificadas através da análise da variância (ANOVA). Para expressar o comportamento das variáveis sobre as respostas avaliadas foram utilizados gráficos dos efeitos dos fatores sobre a média das respostas, o que será discutido mais detalhadamente para cada resposta, a seguir.

As análises de variância (ANOVA) para as respostas concentração celular e concentração de lipídeos acumulados (Tabelas 24 e 25, respectivamente), apresentaram coeficientes de determinação de 99 e 96%, respectivamente, demonstrando que a variação observada pode ser explicada em grande parte pelas variáveis avaliadas. Para ambas as respostas, a presença de Peptona (A), Extrato de levedura (B), Cloreto de amônia (C) e Sulfato de magnésio (E), foram significativos a um nível de 95% de confiança. Quanto aos efeitos de interação, para ambas as respostas avaliadas as interações BC e BE foram significativas a um nível de 95% de confiança. Neste mesmo nível de confiança, as interações AD e CE foram significativas para o acúmulo de lipídeos enquanto que a interação AE foi significativa para a resposta concentração celular.

Tabela 24- Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre a concentração celular.

Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P
Peptona – A	1,988	1	1,99	26,40	0,01
E.L. – B	3,272	1	3,27	43,44	0,01
AB	0,214	1	0,21	2,84	0,19
NH₄CL – C	1,900	1	1,90	25,23	0,02
AC	0,289	1	0,29	3,84	0,14
BC	1,712	1	1,71	22,73	0,02
KH₂PO₄ – D	0,075	1	0,07	0,99	0,39
AD	1,191	1	1,19	15,81	0,03
CE	1,377	1	1,38	18,28	0,02
BE	2,915	1	2,91	38,71	0,01
AE	0,684	1	0,68	9,09	0,06
MgSO₄.7H₂O - E	6,652	1	6,65	88,33	0,00
Resíduo	0,226	3	0,08		
Total	22,49	15	1,50		
R² = 99,0%					

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 25 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados sobre a produção de lipídeos.

Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P
Peptona – A	196,09	1	196,09	27,17	0,01
E.L. – B	162,12	1	162,12	22,47	0,02
AB	24,01	1	24,01	3,33	0,17
NH₄CL – C	73,22	1	73,22	10,15	0,05
AC	39,03	1	39,03	5,41	0,10
BC	105,00	1	105,00	14,55	0,03
KH₂PO₄ – D	2,18	1	2,18	0,30	0,62
AD	31,56	1	31,56	4,37	0,13
CE	47,15	1	47,15	6,53	0,08
BE	101,86	1	101,86	14,12	0,03
AE	85,41	1	85,41	11,84	0,04
MgSO₄.7H₂O – E	343,88	1	343,88	47,65	0,01
Resíduo	21,65	3	7,22		
Total	1233,15	15	82,21		
R² = 96,4%					

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na análise do gráfico de efeitos dos fatores avaliados sobre a média da resposta concentração celular (Figura 22) verificou-se que a adição de Peptona, Extrato de levedura e MgSO₄.7H₂O tiveram efeitos significativos, tendo sua adição influenciado de forma positiva o crescimento celular. A adição de NH₄Cl também apresentou efeito significativo, porém sua adição influenciou de forma negativo o crescimento celular, sendo recomendada sua ausência na composição do meio de cultivo. Por fim, o nutriente KH₂PO₄ não apresentou influência significativa sobre o crescimento celular dentro da faixa de variação estudada.

Ainda em relação ao crescimento celular, dentre os efeitos de interação que apresentaram significância estatística, os efeitos BE (Extrato de levedura/MgSO₄.7H₂O) e AE (Peptona/MgSO₄.7H₂O) foram os que tiveram uma influência positivo sobre o crescimento da levedura, indicando que é benéfico para o crescimento celular a utilização conjunta destes nutrientes. Já a interação BC (Extrato de levedura/NH₄Cl) apresentou um efeito negativo, sendo assim recomendada a ausência de NH₄Cl no meio de cultivo quando o Extrato de Levedura estiver presente.

Na Figura 23 é apresentado o gráfico de efeitos dos fatores analisados sobre a média para a resposta concentração de lipídeos acumulados. A análise para esta resposta mostrou resultados semelhantes aos observados para a concentração celular, o que demonstra uma

relação próxima entre o crescimento da célula e a produção de lipídeos. A presença de Peptona, Extrato de Levedura, NH_4Cl e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram os nutrientes que apresentaram efeitos significativos. A presença dos nutrientes $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, extrato de levedura e peptona apresentaram efeitos positivos para o acúmulo de lipídeos. Já a adição de NH_4Cl tiveram um efeito negativo para a produção de lipídeos, enquanto que a presença de KH_2PO_4 não apresentou efeito significativo. As interações BE (Extrato de levedura/ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), AE (Peptona/ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e AD (Peptona/ KH_2PO_4) foram significativas tendo um efeito positivo, enquanto que as interações BC (Extrato de levedura/ NH_4Cl) e CE (NH_4Cl / $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) tiveram efeitos negativos.

Figura 22 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a média da resposta concentração de células.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental sobre a média da resposta concentração de lipídeos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A significância estatística sobre a concentração de substrato residual foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 26. A análise de variância (ANOVA) para a resposta concentração de substrato residual (Tabela 26) apresentou coeficiente de determinação de 96,3%. Para um nível de confiança de 95% a presença de Extrato de levedura (B) foi significativa para o consumo de glicerol, entretanto é importante ressaltar que a presença de Peptona (A) e de Sulfato de magnésio (E) apresentaram valores de teste p muitos próximos do limite de 0,05, indicando que estas variáveis exerceram um forte efeito sobre o consumo de glicerol. É importante salientar ainda que, a um nível de confiança de 90%, a presença de extrato de levedura e Sulfato de magnésio apresentaram efeitos estatisticamente significativos.

Tabela 26 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L₁₆ sobre o consumo de substrato.

Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P
Peptona - A	336,72	1	336,72	10,04	0,05
E.L. - B	1751,42	1	1751,42	52,24	0,01
AB	68,89	1	68,89	2,05	0,25
NH₄CL - C	2,89	1	2,89	0,09	0,79
AC	41,60	1	41,60	1,24	0,35
BC	10,56	1	10,56	0,32	0,61
KH₂PO₄ - D	9,00	1	9,00	0,27	0,64
AD	5,52	1	5,52	0,16	0,71
CE	10,24	1	10,24	0,31	0,62
BE	89,30	1	89,30	2,66	0,20
AE	42,90	1	42,90	1,28	0,34
MgSO₄.7H₂O - E	282,24	1	282,24	8,42	0,06
Resíduo	100,57	3	33,52		
Total	2751,85	15	183,46		
R² = 96,3%					

Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico dos efeitos dos fatores sobre a média das respostas para o consumo de substrato está apresentado na Figura 24. Na análise do gráfico de efeitos dos fatores avaliados sobre a média da resposta consumo de substrato (Figura 24) verificou-se que a presença dos nutrientes Peptona, Extrato de Levedura e MgSO₄.7H₂O apresentaram efeitos significativos. A presença desses nutrientes influenciou de forma positiva o consumo do substrato, sendo assim, de fundamental importância a adição destes nutrientes no meio de cultivo para garantir um bom consumo de substrato.

Figura 24 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a média da resposta consumo de substrato.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para avaliar a significância estatística sobre as respostas fator de conversão de substrato em lipídeos $Y_{P/S}$, fator de conversão de substrato em células $Y_{X/S}$ e sobre a produtividade volumétrica em lipídeos Q_P foram realizadas análises de variância (ANOVA) as quais são apresentadas nas Tabelas (27, 28 e 29, respectivamente). Na análise de variância para as respostas $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ e Q_P , os modelos estatísticos obtidos apresentaram coeficientes de determinação de 85%, 94%, 98%, respectivamente. Para a resposta fator de conversão de substrato em lipídeos a análise de variância mostrou que as variáveis estudadas não apresentaram influência sobre esta resposta a um nível de confiança de 95%. Quanto ao fator de conversão de substrato em biomassa, apenas a presença de Peptona foi significativa a 95% de confiança. Neste mesmo nível de confiança, para a resposta produtividade volumétrica em lipídeos foram significativos os efeitos da presença de Peptona (A), Extrato de levedura (B), Cloreto de amônia (C) e Sulfato de magnésio (E), e as interações BC, AD, CE e BE.

Tabela 27 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre o fator de conversão de substrato em lipídeos $Y_{P/S}$.

Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P
Peptona – A	0,003	1	0,003	3,212	0,171
E.L. – B	0,003	1	0,003	3,212	0,171
AB	0,001	1	0,001	0,664	0,475
NH ₄ CL – C	0,003	1	0,003	2,655	0,202
AC	0,000	1	0,000	0,425	0,561
BC	0,000	1	0,000	0,000	1,000
KH ₂ PO ₄ – D	0,001	1	0,001	0,664	0,475
AD	0,001	1	0,001	1,301	0,337
CE	0,001	1	0,001	0,664	0,475
BE	0,004	1	0,004	3,823	0,146
AE	0,000	1	0,000	0,425	0,561
MgSO ₄ .7H ₂ O – E	0,001	1	0,001	0,956	0,400
Resíduo	0,003	3	0,001		
Total	0,021	15	0,0014		
R² = 85,71%					

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 28 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre o fator de conversão de substrato em biomassa $Y_{X/S}$.

Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	P
Peptona – A	0,44	1	0,44	21,740	0,019
E.L. – B	0,01	1	0,01	0,277	0,635
AB	0,14	1	0,14	7,099	0,076
NH ₄ CL – C	0,10	1	0,10	4,724	0,118
AC	0,00	1	0,00	0,011	0,923
BC	0,02	1	0,02	0,768	0,445
KH ₂ PO ₄ – D	0,00	1	0,00	0,123	0,749
AD	0,02	1	0,02	1,181	0,357
CE	0,03	1	0,03	1,259	0,344
BE	0,06	1	0,06	2,951	0,184
AE	0,05	1	0,05	2,272	0,229
MgSO ₄ .7H ₂ O – E	0,16	1	0,16	7,866	0,068
Resíduo	0,06	3	0,02		
Total	1,09	15	0,072667		
R² = 94,5%					

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 29 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a produtividade volumétrica em lipídeos Q_P.

Efeito	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	F	p
Peptona - A	3,31E-05	1	3,31E-05	16,030	0,028
E.L. - B	5,26E-05	1	5,26E-05	25,485	0,015
AB	5,06E-06	1	5,06E-06	2,455	0,215
NH₄CL - C	3,31E-05	1	3,31E-05	16,030	0,028
AC	7,56E-06	1	7,56E-06	3,667	0,151
BC	3,31E-05	1	3,31E-05	16,030	0,028
KH₂PO₄ - D	5,63E-07	1	5,63E-07	0,273	0,638
AD	2,26E-05	1	2,26E-05	10,939	0,045
CE	2,26E-05	1	2,26E-05	10,939	0,045
BE	5,26E-05	1	5,26E-05	25,485	0,015
AE	1,41E-05	1	1,41E-05	6,818	0,080
MgSO₄.7H₂O - E	0,000105	1	0,000105	50,939	0,006
Resíduo	6,19E-06	3	2,06E-06		
Total	0,000388	15			
R² = 98,4					

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 25 é apresentado o gráfico dos efeitos das variáveis avaliados no planejamento experimental sobre a média da resposta para o fator de conversão de substrato em lipídeos (Y_{P/S}). A análise para esta resposta mostrou que as variáveis avaliadas não apresentaram influência sobre esta resposta dentro da faixa de variação avaliada.

A Figura 26 apresenta o gráfico dos efeitos das variáveis avaliadas no planejamento experimental sobre a média da resposta para o fator de conversão de substrato em biomassa (Y_{X/S}). Apenas a presença das variáveis Peptona e MgSO₄.7H₂O apresentaram efeitos significativos, demonstrando que a presença desses nutrientes influenciou de forma positiva a conversão de substrato em biomassa.

Na análise do gráfico dos efeitos das variáveis sobre a média da resposta da Produtividade volumétrica em lipídeos Q_P (Figura 27), a presença de Peptona, Extrato de levedura e MgSO₄.7H₂O e as interações AD (Peptona/KH₂PO₄) e BE (Extrato de levedura/MgSO₄.7H₂O) apresentaram efeitos positivos na produtividade de lipídeos, indicando que o uso desses nutrientes pode colaborar com o processo de bioconversão de glicerol em lipídeos. Já a adição do nutriente NH₄Cl, semelhante ao observado para o acúmulo de lipídeos, apresentou um efeito negativo para a produtividade de lipídeos. Tanto seu efeito principal, quanto os efeitos de interação envolvendo o nutriente NH₄Cl, tais como

BC (Extrato de levedura/ NH_4Cl) e CE (NH_4Cl / $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), também apresentaram influência negativa para a produtividade em lipídeos, sugerindo assim que é a melhor condição para a produção de lipídeos ocorre em sua ausência.

Figura 25 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a média da resposta fator de conversão de substrato em lipídeos ($Y_{P/S}$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a média da resposta fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 - Efeitos dos fatores avaliados no planejamento experimental Taguchi L16 sobre a média da resposta da Produtividade volumétrica em lipídeos (Q_P).

Fonte: Elaborado pelo autor.

De um modo geral o acúmulo de lipídeos mostrou um comportamento semelhante ao crescimento celular e a Produtividade volumétrica Q_p . A análise estatística mostrou que as condições de ajuste que se mostraram mais favoráveis para processo analisado foi a adição de Peptona, Extrato de Levedura, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ na ausência de NH_4Cl e independente da adição de KH_2PO_4 .

Spier, (2014) em seus estudos avaliou os efeitos dos constituintes do meio de cultivo, bem como a influência do pH inicial e da temperatura, no acúmulo de lipídios pela levedura silvestre *Rhodotorula mucilaginosa*, empregando um planejamento experimental Plackett-Burman. Estes autores reportaram que as concentrações de Extrato de levedura e de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ foram as variáveis que demonstraram maior influência na produção de lipídeos para a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, resultados semelhantes aos observados no presente trabalho. A melhor condição para a produção de lipídeos estabelecida para esta levedura, foi quando utilizaram 30 g/L de glicerol, 5 g/L KH_2PO_4 ; 1 g/L Na_2HPO_4 ; 3 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,2 g/L de Extrato de levedura. Nestas condições obtiveram uma concentração celular máxima de 9,20 g/L e lipídeos totais produzidos de 5,51 g/L.

Castanha et al. (2013), em estudo que visava a otimização da produção de biomassa e lipídeos totais da levedura *Cryptococcus laurentii* em meio utilizando de soro de leite para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas, obtiveram, a partir de um delineamento Plackett-Burman mediante a suplementação do meio de cultivo com Extrato de levedura e sais inorgânicos (KH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e $ZnO_4 \cdot H_2O$), um aumento de 133,1% na produção de lipídeos totais em relação ao meio com soro de leite sem suplementação, alcançando 2,96g/L de lipídeos em 360 horas de fermentação. Estes resultados demonstram a importância da suplementação nutricional do meio de cultivo sobre a produção de lipídeos.

A importância da adição de nutrientes ao meio de cultivo para aumentar o acúmulo de lipídeos também foi reportada por Singh et al. (2016), que avaliaram a influência da composição nutricional sobre a produção de lipídeos pelas microalgas *Aurantiochytrium sp.* DBTIOC-18 e *Schizochytrium sp.* DBTIOC-1 a partir de glicerol. Estes autores reportaram que a adição de sais de cálcio e magnésio podem levar a um aumento tanto a produção de biomassa quanto à obtenção de concentrações mais elevadas de lipídeos. Os meios suplementares com íons de cálcio e magnésio promovem uma maior utilização de glicerol, resultando em um aumento substancial na produção volumétrica de biomassa de 14,98 g/L a 55,12 g/L para a *Aurantiochytrium sp.* DBTIOC-18 e de 15,21 g/L a 48,12 g/L para *Schizochytrium sp.* DBTIOC-1 e o aumento de ácido graxo para biodiesel de 6,27 g/L a 27,14 g/L para a *Aurantiochytrium sp.* DBTIOC-18 e de 7,13 g/L a 22,15 g/L para *Schizochytrium sp.*

5.4. Avaliação da influência do pH inicial sobre a produção de óleo microbiano

Para o acompanhamento dos cultivos da levedura *Rhodotorula glutinis* – Y – 12905 em meio contendo glicerol como fonte de carbono e sob diferentes valores de pH inicial (entre 3 e 7), foram quantificados a concentração celular, o acúmulo de lipídeos e consumo de substrato. Os resultados encontrados para estes parâmetros são apresentados nos gráficos mostrados na Figura 28.

Na análise dos perfis de crescimento da levedura (Figura 28 a) durante os cultivos realizados sob os diferentes valores de pH inicial, verificou-se que o pH inicial teve grande influência sobre o crescimento celular. Em todas as condições avaliadas a levedura apresentou crescimento até o tempo de 192 horas de cultivo, havendo pouca variação no crescimento celular após esse período. De um modo geral, o crescimento celular foi fortemente afetado pelo pH inicial, tendo este um grande impacto sobre as concentrações celulares ao fim dos cultivos, as quais variaram entre 7,5 e 28,6 g/L após 240 horas de cultivo. Nos cultivos realizados em condições de pH inicial 6 e 7, foram alcançadas concentrações celulares de cerca de 27,8 e 28,6 g/L em 240 horas, respectivamente, sendo tais condições de pH as que proporcionaram a maior produção de biomassa celular. Pode-se verificar também que a redução do pH inicial para valores inferiores a pH 6 influenciou de forma negativa o crescimento da levedura. Os cultivos realizados com pH inicial entre 5 e 3 alcançaram concentrações finais entre 12,8 e 7,5 g/L após 240 horas o que representa uma redução de no mínimo 50% na produção de biomassa celular quando comparados aos cultivos realizados com pH 6 e 7.

Assim como o observado para o crescimento celular o acúmulo de lipídeos foi fortemente afetado pelo pH inicial (Figura 28 b). As maiores concentrações de lipídeos foram obtidas para cultivos realizados em pH 6 e 7, alcançando concentrações superiores a 7,0 g/L após 240 horas de cultivo. O menor acúmulo de lipídeos, 1,5 g/L em 240 horas de cultivo, ocorreu para um pH inicial de 3. Estes resultados demonstram que o pH inicial é uma variável de grande importância para a obtenção de elevadas concentrações de lipídeos.

Semelhante ao observado para a produção de biomassa celular e acúmulo de lipídeos, o pH inicial teve grande influência no consumo de substrato (Figura 28 (c)). Os cultivos com pH inicial de 6 e 7 foram os que apresentaram maiores consumos do substrato, sendo a levedura capaz de consumir praticamente todo o glicerol com 192 horas de cultivo. Para as demais condições de pH avaliadas, até o tempo final de cultivo acompanhado (240 horas) houve um consumo parcial, sendo consumido entre 79% e 53% do glicerol para os cultivos em pH inicial de 5 e 3, respectivamente.

Figura 28 – Perfil de crescimento celular (a), acúmulo de lipídeos (b) e consumo de substrato (c) pela levedura *Rhodotorula glutinis* – Y – 12905 nos cultivos realizados sob diferentes valores de pH inicial.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o acompanhamento do processo de bioconversão, a variação do pH durante os cultivos também foi monitorada (Figura 29). Pode-se verificar que para todas as condições de cultivo, com exceção do pH = 7, houve uma redução do valor de pH, tendendo a se estabilizar em pH 3. Verificou-se ainda que o cultivo com pH inicial 6,0 sofreu uma redução de maneira mais gradual do que os demais, alcançando um valor de pH de cerca de 4 após 240 horas. Quanto ao cultivo realizado em pH inicial 7, esta condição se manteve praticamente constante durante as 240 horas de cultivo.

Figura 29 – Valores de pH no decorrer dos cultivos realizados com a levedura *Rhodotorula glutinis* sob diferentes valores de pH inicial.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Tabela 30 são apresentadas informações dos cultivos realizados sob diferentes valores de pH inicial, tais como o consumo de substrato, a máxima concentração celular, a concentração de lipídeos acumulada e o teor de lipídeos na biomassa, assim como os parâmetros fermentativos Q_P (produtividade volumétrica em lipídeos), $Y_{P/S}$ (fator de conversão de substrato em lipídeos) e $Y_{X/S}$ (fator de conversão de substrato em células).

Os maiores teores de lipídeos 28,8% e 24,9%, foram observados para os cultivos realizados em pH 6,0 e 7,0, respectivamente. Nestas condições de pH também foram obtidas as maiores produtividades de lipídeos quando comparada às outras condições de pH avaliadas. A maior produtividade volumétrica de lipídeos, cerca de 0,030 g/L.h, foi obtida em cultivos em pH inicial 6,0, a qual foi cerca de quatro vezes maior que a produtividade obtida para cultivos em pH 3,0 e 4,0, nos quais a produtividade foi de cerca de 0,006 e 0,007 g/L.h,

respectivamente. Os resultados encontrados são semelhantes aos reportados no trabalho de Karatay e Dönmez, (2010). Estes autores avaliaram quatro diferentes valores de pH iniciais observando sua influência sobre o acúmulo de lipídeos. Foram avaliadas condições de pH inicial entre 4 e 7. A maior produção lipídica foi obtida em meios de cultivo com pH entre 5 e 6, e os valores de pH inferiores a estes foram considerados desfavoráveis para produção lipídica. Em outro trabalho realizado por Fei et al., (2011), utilizando a levedura, *Cryptococcus albidus* o acúmulo de lipídios foi fortemente inibido quando utilizado pH abaixo de 4,0. Entretanto, quando utilizaram pH entre 5,5 a 7,0, a levedura apresentou uma melhor capacidade em acumular lipídeos.

Em outro estudo Castelo Branco (2015) avaliou o desempenho da levedura *R. mucilaginosa* CMIAT 164 na produção de biomassa, consumo de glicerol e produção de carotenoides variando o pH inicial do meio de cultivo entre 3,0 e 7,0 e mantendo-o constante durante todo o processo fermentativo. A maior produção de biomassa ($8,85 \pm 0,4$ g/L) em 216 h de processo foi obtida quando o pH do meio de fermentação foi mantido em 6,0. Neste mesmo estudo os autores analisaram os perfis de consumo de glicerol, em diferentes valores de pH, observaram que quando os cultivos foram realizados em condições entre pH 4 e 7, houve esgotamento da fonte de carbono a partir de 144 h de fermentação e que para pH 3 o consumo de glicerol foi incompleto. Estes resultados são semelhantes aos obtidos no presente trabalho onde os melhores valores observados para a produção biomassa e consumo de glicerol bruto, ocorreram para cultivos com pH entre 6 e 7.

Quanto ao fator de conversão de substrato em produtos, os maiores valores foram observados para os cultivos em meios com pH iniciais 6 e 7, com 0,102 e 0,095 g/g, respectivamente. De acordo com a literatura os maiores valores são de aproximadamente 0,20-0,22 g/g utilizando glicose como substrato (RATLEDGE, 2014). Nestas mesmas condições de cultivo foram alcançados os maiores valores de conversão de substrato em células, 0,355 e 0,381 g/g, para os pH 6 e 7, respectivamente.

Tabela 30 - Consumo de glicerol, concentração celular e de lipídeos, Q_P , $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$, obtidos para os cultivos realizados com a levedura *Rhodotorula glutinis* sob diferentes valores de pH inicial.

pH	Consumo de Substrato (%)	Células (g/L)	Lipídeos (g/L)	Lipídeos (%)	Q_P (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)
3	53,3	7,5	1,5	19,98	0,0063	0,037	0,18
4	63,1	12,2	1,8	14,52	0,0074	0,037	0,25
5	78,8	12,8	3,0	23,60	0,0126	0,054	0,23
6	99,9	26,8	7,7	28,81	0,0321	0,102	0,36
7	99,9	28,6	7,1	24,91	0,0297	0,095	0,38

Fonte: Elaborado pelo autor.

De um modo geral, nesta etapa do estudo verificou-se que a produção e o acúmulo de lipídeos pela levedura *Rhodotorula glutinis*, bem como o crescimento celular, consumo de substrato e parâmetros fermentativos como Q_P , $Y_{P/S}$, foram fortemente influenciados pela condição de pH inicial do meio de cultivo, sendo favorecidos sob condições de pH do meio de fermentação entre 6 e 7.

5.5. Avaliação da influência da razão C:N no meio de cultivo

Para avaliar a influência da razão carbono/nitrogênio (C:N) sobre o acúmulo de lipídeos, foram feitos cultivos em meios contendo 70 g/L de glicerol como fonte de carbono, sendo empregadas diferentes quantidades de fontes de nitrogênio de modo a se obter razões C:N entre 10:1 e 200:1. Para o acompanhamento dos cultivos foram avaliadas a concentração de células, o acúmulo de lipídeos, consumo de substrato e parâmetros fermentativos como o fator de conversão de substrato em produto e a produtividade em lipídeos.

Para uma análise dos dados de acúmulo de lipídeos e concentração celular e consumo de substrato nas diferentes proporções de C:N, os resultados dos cultivos foram organizados na forma de gráficos de barra conforme apresentado na Figura 30. Verificou-se que a razão C:N inicial do meio de cultivo teve grande influência sobre o crescimento celular, sendo alcançadas concentrações finais entre 13,4 e 34,1 g/L, em 240 horas de cultivo nas diferentes condições avaliadas. De modo geral, a diminuição da concentração de nitrogênio (aumento da razão C:N) afetou negativamente o crescimento celular para razões superiores a 20:1.

Quanto ao acúmulo de lipídeos, verificou-se que as diferentes razões C:N utilizadas no meio de cultivo tiveram forte influência sobre este parâmetro, comportamento este que foi

semelhante ao observado no crescimento celular. As maiores concentrações de lipídeos acumulados, foram observados na região de razão C:N entre 10:1 e 50:1, com concentração de lipídeos de até 8 g/L nos cultivos com razão C:N 30:1 e 50:1. Nos cultivos utilizando-se as razões de C:N entre 100:1 e 200:1 o acúmulo de lipídeos variou entre 4 e 5 g/L, ou seja, foram obtidas concentrações cerca de 50% menores que em C:N 30:1.

Semelhante ao observado para a produção de biomassa celular e acúmulo de lipídeos, para o consumo de substrato foi afetada pelas diferentes proporções de C:N avaliadas. Os maiores consumos de substrato foram observados na região de razão C:N entre 10:1 e 30:1, sendo a levedura capaz de consumir 100% do substrato nestas condições. Já para o cultivo realizado com razão C:N 50:1, houve um consumo de 91,87% do substrato após 240 horas de cultivo. Para as demais proporções de C:N avaliadas, até o tempo final de cultivo acompanhado (240 horas) houve um consumo parcial, sendo consumido entre 36,65% e 68,08% do glicerol para os cultivos com proporções de C:N de 200:1 e 100:1 respectivamente.

De um modo geral a razão C:N dos meios de cultivo foi uma variável de grande influência sobre a capacidade da levedura em acumular lipídeos. Resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho foram reportados por Kolouchová, et al. (2016). Estes autores avaliaram o acúmulo de lipídeos em leveduras oleaginosas, utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-20, em meio contendo 30 g/L de glicose, e sob valores de razões de C:N que variaram de 3:1 a 30:1. Estes autores observaram que a razão C:N 30:1 foi a que levou a uma maior acúmulo de lipídeos sendo observada uma concentração de cerca de 2,8 vezes maior nos cultivos com C/N de 30:1, quando comparado aos cultivos realizados com razão C/N de 3:1.

Saenge et al. (2011), estudou a influência da relação C:N no acúmulo de lipídios pela levedura *R. glutinis* TISTR 5159 utilizando glicerol bruto como fonte de carbono. Estes autores avaliaram valores de razão C:N entre 35:1 a 85:1, o pH foi mantido em 6,0, os cultivos foram realizados à 200 rpm por um período de 72 horas. O máximo teor de lipídeos foi encontrado utilizando razão C:N de 85:1 (nível máximo investigado) no qual foi alcançada uma concentração de 5,49 g/L de células e 2,27 g/L de lipídeos.

No presente trabalho, a razão em que se obteve as maiores produções de biomassa e lipídeos foi semelhante a obtida por Kolouchová, et al., (2016) razão de C:N 30:1, com produção de lipídeos (7,7 g/L), ou seja, superior à obtida por Saenge et al. (2011) que foi de 2,7 g/L.

Figura 30 - Concentração celular, lipídeos e consumo de substrato para os diferentes razões de C:N.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 31 estão representadas as variações do pH no decorrer do tempo em cultivos com diferentes razões C:N. O pH inicial foi ajustado em 6,5 e monitorado até o tempo final de fermentação de 240 horas. Pode-se verificar que o pH dos meios de cultivo com razão C:N 100:1, 150:1, 200:1 e 10:1 praticamente não sofreram variação, permanecendo entre 6,33 e 6,49 até o tempo final de cultivo. Quanto dos cultivos com razão C:N 20:1, 30:1 e 50:1 foi observado uma pequena variação de pH, alcançando valores próximos a 5,2, após 240 horas.

Figura 31 - Variação do pH no decorrer do tempo em cultivos com diferentes razões C:N

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Tabela 31 são apresentadas informações dos cultivos nas diferentes razões de C:N, tais como o consumo de substrato, a máxima concentração celular, a concentração de lipídeos acumulada e o teor de lipídeos na biomassa, assim como os parâmetros fermentativos Q_P (produtividade volumétrica em lipídeos), $Y_{P/S}$ (fator de conversão de substrato em lipídeos) e $Y_{X/S}$ (fator de conversão de substrato em células).

Os maiores teores de lipídeos 8,1% e 7,7%, foram observados para os cultivos realizados com razões de C:N de 50:1 e 30:1, respectivamente. Nestas condições razão C:N também foram obtidas as maiores produtividade de lipídeos quando comparada às outras condições avaliadas, 0,034 g/L.h e 0,032 g/L.h, respectivamente.

Quanto ao fator de conversão de substrato em produtos, este parâmetro apresentou valores entre 0,11 e 0,14 g/g, com exceção da condições condição com C:N de 200:1, no qual foi alcançado um fator de conversão de 0,20 g/g. Apesar desta última condição ter apresentado um fator de conversão superior aos demais, este mesmo ensaio foi o que apresentou os menores valores de consumo de substrato, concentração celular e produtividade volumétrica em lipídeos. Quanto aos ensaios que apresentaram as maiores produtividades em lipídeos, com razão C:N entre 30:1 e 50:1, foram alcançados fatores de conversão de substrato em produto de 0,13 e 0,14 g/g, respectivamente. Estes valores de $Y_{P/S}$ estão próximos ao reportado por Santa Anna et al. (2002) reportaram conversões de substrato em produto da ordem de 0,13 g/g para cultivos de leveduras oleaginosas, quando se utilizou glicerol numa concentração de 3% v / v, correspondendo a uma relação C:N de 60:1.

Tabela 31 - Resultados da fermentação variando-se as razões de C:N para 240h de fermentação.

Razão	Consumo de Substrato (%)	Células (g/L)	Lipídeos (g/L)	Lipídeos (%)	QP (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)
10:1	100,00	30,65	7,10	23,16	0,030	0,11	0,48
20:1	100,00	34,07	7,36	21,60	0,031	0,12	0,54
30:1	100,00	29,01	7,70	26,55	0,032	0,13	0,49
50:1	91,87	26,49	8,13	30,68	0,034	0,14	0,47
100:1	68,08	20,31	5,26	25,92	0,022	0,11	0,42
150:1	47,97	16,59	4,48	26,99	0,019	0,14	0,53
200:1	36,85	13,41	4,60	34,30	0,019	0,20	0,59

Fonte: Elaborado pelo autor.

Visando compreender a variação de nitrogênio no meio de cultivo ao longo da fermentação, foram feitas determinações de sua concentração total para o cultivo realizado com razão C:N inicial de 30:1 (Figura 32). Esta condição foi escolhida para este estudo por ter demonstrado um elevado acúmulo de lipídeos em comparação com as demais avaliadas. Verificou-se que houve um consumo contínuo de nitrogênio do meio até o tempo de 144 horas, após este tempo o consumo de nitrogênio pela levedura foi bastante reduzido. A concentração de nitrogênio no meio de cultivo é reduzida de 0,07 mol/L para 0,03 mol/L nas primeiras 144 horas, após este período, até o tempo de 240 horas, a concentração variou de 0,030 mol/L para 0,026 mol/L. Este consumo parcial de nitrogênio pode evidenciar que a levedura não foi capaz de utilizar uma das fontes disponíveis no meio de cultivo. Como fonte de nitrogênio o meio de cultivo oferecia uma fonte de nitrogênio orgânica, proveniente de aminoácidos do extrato de levedura, e fonte inorgânica proveniente de sais de amônia. Com base nos resultados obtidos a etapa de avaliação da composição do meio de cultura, no qual o extrato de levedura mostrou se importante para o processo de crescimento celular e produção de lipídeos, e que sais de amônia foram prejudiciais para este mesmo processo. É provável que a levedura tenha utilizado prioritariamente o nitrogênio proveniente de aminoácidos, e que após as 144 horas de cultivo o nitrogênio residual, seja proveniente de fontes inorgânicas. Verificou-se ainda que a levedura apresentou um consumo contínuo de substrato durante as 240 horas de cultivo, e que a utilização da fonte de carbono foi afetado pela desaceleração do consumo de nitrogênio ocorrido após 144 horas de cultivo.

Figura 32– Concentração de nitrogênio e de carbono no meio de cultivo utilizando-se frascos com C:N de 30:1.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6. Caracterização do óleo microbiano

Na Tabela 32 está apresentada a composição de ácidos graxos da fração de lipídeos obtidos da biomassa da levedura *Rhodotorula glutinis* Y-12905, cultivada em meio contendo glicerol como fonte de carbono, utilizando razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{meio}}$ de 5,0, pH inicial 6,0, razão C:N 30:1, agitação de 250 rpm cultivadas por 240 horas. De uma maneira geral foram identificados ácidos graxos com tamanho de cadeia variando entre C10 a C18 com diferentes graus de insaturação.

Tabela 32 - Perfil de ácidos graxos (%) da fração de lipídeos obtida da biomassa da levedura *Rhodotorula glutinis* Y-12905 (composição identificada no presente trabalho em comparação a dados da literatura. (n.q. – não quantificado; n.r. – não reportado).

Ácido graxo		Presente trabalho	Sitepu (2013)	Kot et al., (2016)	Zhang et al.; (2014)
Ácidos caprílico	C8:0	0,00 ± 0,00	0,0	n.r.	n.r.
Ácidos cáprico	C10:0	0,02 ± 0,01	0,0	n.r.	n.r.
Ácidos láurico	C12:0	0,07 ± 0,01	0,0	0,0	n.r.
Ácidos mirístico	C14:0	0,87 ± 0,02	1,7	0,4	0,7
Ácidos palmítico	C16:0	16,83 ± 0,06	12,0	24,3	16,5
Ácido palmitoléico	C16:1	n.q.	n.r.	0,2	0,4
Ácidos esteárico	C18:0	9,97 ± 0,05	5,5	10,1	3,7
Ácidos oleico	C18:1	53,54 ± 0,02	54,7	53,2	51,3
Ácidos linoleico	C18:2	18,73 ± 0,03	17,1	6,8	21,6
Ácido araquídico	C20:0	n.q.	n.r.	0,3	n.r.

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a Tabela 32, pode-se observar que no óleo produzido pela levedura *Rhodotorula glutinis* não foi detectada a presença de ácido caprílico (C8:0) e a proporção dos ácidos cáprico (C10:0) e láurico (C12:0) foi de apenas 0,02% e 0,07%, respectivamente. Já o ácido oleico (C18:1) foi produzido em maior quantidade, correspondendo a cerca de 53,54 % dos ácidos graxos produzidos pela levedura, seguido pelos ácidos linoleico (C18:2) e palmítico (C16:0), com 18,7% e 16,8%, respectivamente. A composição em ácidos graxos encontrada neste trabalho é semelhante a reportada na literatura para a levedura *Rhodotorula glutinis*, como o reportado por Kot et al. (2016), Sitepu (2013) e Zhang et al. (2014), sendo os principais ácidos graxos o palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoleico (18:2), correspondendo juntos a mais de 80% dos ácidos graxos que compõem a fração lipídica.

Um dos parâmetros relevantes para a avaliação das características do biocombustível obtido é o estudo reológico dos óleos e gorduras utilizados como fonte de matéria-prima na produção do biodiesel (DA RÓS, 2012).

A análise de viscosidade do material lipídico da biomassa da levedura *Rhodotorula glutinis* Y-12905 foi avaliada utilizando-se um viscosímetro cone-placa a uma temperatura de 50°C. Na Figura 33 é apresentado um gráfico que expressa a variação da viscosidade em função da taxa de deformação. Dentro da faixa de deformação avaliada (100 a 360 s⁻¹) a viscosidade média apresentada pelo material lipídico da levedura *Rhodotorula glutinis* Y-12905 foi de 39,3 cP à 50 °C. Este valor é elevado quando comparado a dados da literatura para óleos vegetais como os observados por Brock et al. (2008) que verificou a viscosidade de óleos vegetais à 50 °C para soja (22,3 cP), milho (24,8 cP), girassol (21,3 cP), arroz (24,5 cP),

algodão (24,6 cP), oliva (26,2 cP) e canola (25,2 cP). Como pode ser observado na Figura 33, o valor da viscosidade absoluta permanece praticamente constante, caracterizando um comportamento de um fluido newtoniano. Os fluidos newtonianos são aqueles que apresentam viscosidade constante, onde a taxa de deformação apresenta comportamento proporcionalmente linear à tensão de cisalhamento (ÇENGEL; CIMBALA, 2015).

Figura 33 - Viscosidade absoluta em função da taxa de deformação do material lipídico da biomassa da levedura *Rhodotorula glutinis* Y-12905, determinada em um viscosímetro cone-placa a uma temperatura de 50°C.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo Moreira et al. (2007), óleos vegetais e gorduras residuais geralmente apresentam comportamento de fluido Newtoniano. Desta forma, o comportamento de fluido newtonianos observado para o óleo microbiano obtido a partir da levedura *Rhodotorula glutinis* está de acordo com o reportando na literatura. Comportamento de fluido newtonianos são reportados também por Carvalho (2015), para o óleo microbiano proveniente da biomassa *M. circinelloides* URM 4182 onde foi obtida uma viscosidade de 60 cP utilizando uma faixa de deformação aplicada entre (60 a 260 s^{-1}), ou seja, a viscosidade de óleo se manteve praticamente constante.

O índice de acidez representa um bom parâmetro para o acompanhamento da qualidade dos óleos. Este índice revela o grau de ácidos graxos livres do material e é expresso em miligramas de hidróxido de potássio para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em

um grama de amostra. O óleo produzido pela levedura *Rhodotorula glutinis* Y-12905 apresentou um índice de acidez de $5,8 \pm 0,2$ mg de KOH/g óleo. O índice de acidez encontrado foi superior ao reportado para óleos brutos comerciais, os quais possuem um índice de acidez entre 0,5 – 3% (FERRARI et al., 2005).

Apesar o índice de acidez encontrado estar acima da média quando comparado a óleos comerciais, o teor de ácido graxos livres para o óleo obtido neste estudo foi de $1,93 \pm 0,08\%$. Segundo Ferreira et al. (2005) para que um óleo seja utilizado para produção de biodiesel com elevadas conversões são recomendados teor de ácidos graxos livres inferiores a 3%. Desta forma o óleo obtido no presente estudo apresentou um teor de ácidos graxos livres que o torna potencialmente utilizável para a produção de biodiesel por processos que empregam via alcalina, os quais são os mais utilizados atualmente, e necessitam de condições mais brandas de processamento quando comparados aos processos que empregam catálise ácida.

É importante salientar que além da fração lipídica obtida, a levedura *Rhodotorula glutinis* apresentou uma expressiva produção de carotenoides, o que conferiu à biomassa produzida, assim como ao óleo microbiano obtido, uma intensa coloração avermelhada. A produção de outros bioprodutos como carotenoides e proteína microbiana são aspectos que não foram abordados no presente trabalho, mas são de extrema importância para o emprego deste processo de bioconversão empregando leveduras junto a biorrefinarias, aumentando tanto a variedade de produtos obtidos quanto a eficiência global da utilização de glicerol residual.

6. CONCLUSÕES

Na avaliação da capacidade de produção de lipídeos a partir de glicerol por leveduras verificou-se que todas as cinco leveduras estudadas foram capazes de consumir substrato, crescer e acumular lipídeos.

Dentre as leveduras avaliadas a *Rhodotorula glutinis* Y-12905 foi a que apresentou maior consumo de glicerol durante o tempo de cultivo observado tendo se destacado também quanto ao acúmulo de biomassa celular e produtividade volumétrica em lipídeos. Desta forma esta levedura demonstrou um importante potencial para a obtenção de lipídeos a partir de glicerol.

Nos ensaios realizados com diferentes agitações e razões de volume de frasco por volume de meio verificou-se que tanto o crescimento quanto a produção de lipídeos pela levedura foram fortemente afetados pela condição de fornecimento de oxigênio ao meio de cultivo. Dentro da faixa de variação avaliada, verificou-se que quanto maior a disponibilidade de oxigênio no meio, maior foi a produção de lipídeos e a concentração celular.

Na avaliação da composição nutricional do meio de cultivo, verificou-se que a presença de fontes de nitrogênio orgânicos, tais como Peptona, Extrato de levedura são de fundamental importância para o acúmulo de lipídeos e crescimento celular, praticamente não ocorrendo produção de óleo microbiano na ausência destas fontes de nutrientes. Verificou-se ainda que a presença de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ teve uma influência positiva sobre o acúmulo de lipídeos e que a presença de fontes inorgânicas de nitrogênio, como sais de amônia não acarretaram em benefício para o processo.

Na avaliação da influência do pH inicial no meio de cultivo, sobre a produção de lipídeos, verificou-se que este parâmetro teve forte influência sobre o consumo de glicerol, o crescimento celular e acúmulo de lipídeos pela levedura. Verificou-se ainda a existência de região de pH inicial ótima para o processo entre 6 e 7, na qual ocorre pouca variação de pH durante o cultivo e que o crescimento celular, o consumo de glicerol e a produção de lipídeos é maximizada. Para condições de pH fora desta região foi possível verificar que o metabolismo da levedura foi prejudicado, afetando de modo negativo sua capacidade de consumo de substrato, crescimento celular e acúmulo de lipídeos.

Na avaliação da influência da razões C:N sobre o processo de produção de lipídeos, foi possível verificar que esta variável apresentou forte influência sobre o crescimento celular e o acúmulo de lipídeos. Dentre as condições avaliadas neste trabalho, foi encontrada uma

região ótima para a produção de lipídeos a partir de glicerol, a qual ocorreu para cultivos com razão molar C:N entre 30:1 e 50:1. Em cultivos realizados empregando razões C: N superiores ou inferiores a esta região, o desempenho da levedura foi afetado, prejudicando sua capacidade de crescimento celular e acúmulo de lipídeos. Verificou-se ainda que a levedura apresentou um consumo incompleto das fontes de nitrogênio disponíveis no meio, indicando possível uso preferencial de fontes orgânicas de nitrogênio, uma vez que as fontes inorgânicas avaliadas em outras etapas do estudo mostraram impactar de maneira negativa o acúmulo de lipídeos.

Na caracterização do óleo produzido pela levedura, verificou-se que o mesmo é constituído principalmente ácidos graxos de dezesseis e dezoito carbonos com diferentes graus de insaturação.

O óleo microbiano apresenta viscosidade e índice de acidez superiores aos encontrados para óleos vegetais comerciais, entretanto seu baixo teor de ácidos graxos livres possibilita sua aplicação em processos de transesterificação alcalina, o que o torna uma matéria-prima interessante para a produção de biodiesel por rotas convencionais.

A possibilidade de produção de lipídeos pela levedura *Rhodotorula glutinis* a partir de glicerol, subproduto da produção de biodiesel, evidencia um importante potencial de aumento da capacidade produtiva de biorrefinarias baseadas em lipídeos, uma vez que permite converter um de seus principais subprodutos em sua matéria-prima de interesse, suprimindo parte da sua demanda, além de possibilitar a obtenção de outros produtos resultantes de cultivos da levedura, tais como proteínas e carotenóides.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS ÍNDUSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Dados de preços de biodiesel e diesel B. 2016. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=>>>. Acesso em: 20 set. 2016.

ABREU, L. D. **Influência de diferentes estratégias de cultivo na produção de lipases por *Staphylococcus warneri* EX 17 e propriedades desta enzima após imobilização em suportes hidrofóbicos.** 57 p. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2013.

AGEITOS, J.M.; VALLEJO, J.A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T.G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 90, p. 1219, 2011.

AGUIAR, R. T. **Caracterização física, química e microbiológica do diesel, biodiesel e suas misturas durante a logística de distribuição.** 76 f. 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

ALVAREZ, H. M.; STEINBUCHER, A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology.** Vol. 60, No. 4, pp. 367-376, ISSN 0175-7598, 2002.

ÅKERMAN, J. Sustainable air transport—on track in 2050. **Transportation Research.** v. 10, p. 111–26, 2005.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the examination of water and wastewater.** 20th ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 1998.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS.** 5th ed. Champaign: AOCS, 2004.

ANDRADE, R. C. R., **Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipídica da levedura *Rhodotorula glutinis* NCYC 921 em culturas descontínuas monitorizadas por citometria de fluxo.** 61 p. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, Portugal, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Resolução ANP Nº 14, De 11.5.2012 - **Dou 18.5.2012.** Disponível em:

<http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml>. Acesso em 07 de set. 2015 (a).

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO – **Biocombustíveis.** Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?id=470>>. Acesso em 16 de set.2015 (b).

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO – **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis.** Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=73292&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1443812922121>>. Acesso em 02 de out.2015 (c).

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO – **Biodiesel.** Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=77873&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1444855092938>>. Acesso em 14 de out.2015 (d).

ASSOCIAÇÃO DE INDÚSTRIAS ESPACIAS DO BRASIL. Inserção do Brasil nos biocombustíveis aeronáuticos. **Parcerias Estratégicas**, v. 16, n. 32, p. 59-64, 2012.

BARBOSA, C. R. **Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para a produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.** 2009. 133f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2009.

BAROUTIAN, S. et al. Blended aviation biofuel from esterified Jatropha curcas and waste vegetable oils. **J Taiwan InstChemEng**, v. 44, p. 911–916, 2013.

BEATRIZ, A.; ARAUJO Y. J. K.; LIMA D. P. DE. Glycerol: a brief history and their application in stereoselective syntheses. **Química Nova**, v. 34, p. 306-319, 2011.

BECKER, W. Microalgal in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed) **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.** London: Blackwell Science, 2004, p.312-351.

BELIGON, V. et al. Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate: **Bioresource Technology**, v. 192, p. 582-591, 2015.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. Yeast: a new oil producer. **Oléagineux, Corps gras, Lipides**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2012.

BRESOLIN, L. **Estudo da quantificação de lipídeos microalgais através de fluorescência 2D**. Trabalho de Diplomação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Departamento de Química. Porto Alegre, RS, Brasil. 2013. 45p.

BROCK, J. et al. Determinação experimental da viscosidade e condutividade térmica de óleos vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p.564-570, set. 2008.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BONASSA, G. et al. Bioquerosene: um estudo de caso. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v 3, n 2, 2014.

BHUIYA, M.M.K. et al. Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel – Part 2: Properties, performance and emission characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p.1129-1146, mar. 2016.

CALVEY, C. H. et al. Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. **Bioresource Technology**, v. 200, p.780-788, jan. 2016.

CARVALHO, A. K. F. **Síntese de biodiesel por transesterificação pela rota etílica: comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos**. 2011. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

CARVALHO, A. K. F. **Avaliação do potencial do fungo filamentoso *Mucor circinelloides* como fonte de lipase e lipídios para a produção de biodiesel dentro do conceito de biorrefinaria**. 2015. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, University of São Paulo, Lorena, 2015.

CASTANHA, R. F. et al. Comparison of two lipid extraction methods produced by yeast in cheese whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 629-636, 2013.

CASTELO BRANCO, L. S. **Produção de carotenoides por linhagens do gênero *Rhodotorula* utilizando glicerol como fonte de carbono**. 91 f. 2015. Tese (Doutorado em

Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quím. Nova, São Paulo**, v. 27, n. 1, p. 146-156, fev. 2004 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000100025>. Acesso em: 08 nov. 2016.

CESCUT, J. et al. Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 11, 2014.

CHEN, H-C.; CHANG, C-C. Production of g-linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. **Biotechnol. Prog.**, v. 12, p. 338–341, 1996.

CREMONEZ, P. A. et al. Biofuels in Brazilian aviation: Current scenario and prospects. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 1063-1072, 2015.

ÇENGEL, Y. A.; CIMBALA, J. M. **Mecânica dos fluidos fundamentos e aplicações**. 3. ed. Porto Alegre/RS: AMGH, 2015, p51-54.

CUNHA, C. M. **Caracterização de biodiesel produzido com misturas binárias de sebo bovino, óleo de frango e óleo de soja**. 2008. 86 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

DA RÓS, P. C. M. **Avaliação de óleos de cianobactérias como matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel pela rota etílica**. 2012. 175p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2012.

DA ROSA, P. D. **Otimização da biossíntese de óleo microbiano pela levedura *Candida zeylanoides* QU 331**. 2014. Tese (Mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de ciências básicas da saúde, Porto Alegre, 2014.

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

DANTAS, H. J. **Estudo termoanalítico, cinético e reológico de biodiesel derivado do óleo de algodão (*Gossypium hisutum*)**. 2016. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2006.

DIAS, C. et al. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 309-318, 2015.

DONÁ, G. **Produção de ésteres metílicos com acetato de metila supercrítico em reator tubular**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

DUARTE, S. H. **Utilização de glicerol proveniente da síntese do biodiesel para a produção de lipídeos por leveduras silvestres**. 86 p. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP, Brasil, 2011.

EASTERLING, E. R. et al. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 356-361, 2009.

ECONOMOU, Ch. N. et al. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. **Bioresour. Technol.** v. 101, p. 1385–1388, 2010.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Glicerol**. 2016. Talita Delgrossi Barros. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1mqgo602wyiv802hvm3j818huet.html>>. Acesso em: 29 abr. 2016.

FEI, Q. et al. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 102(3), p. 2695–701, 2011.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, September, 2013.

FREITAS, S. P. et al. Efeito de enzimas hidrolíticas no comportamento reológico do óleo de palma cru. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 127-130, 1998.

FONTANA, J. D. **O duelo soja versus micro-algas no biodiesel brasileiro e internacional**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/colunistas/convidado/duelo-soja->

versus-micro-algas-biodiesel-brasileiro-internacional-260111.htm>. Acesso em: 25. Out. 2014.

FONTES, G. C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.2091-2099, 2008.

GANGAR, A.; KARANDE, A.A.; RAJASEKHARAN, R. Purification and characterization of acyl–acyl carrier protein synthetase from oleaginous yeast and its role in tryacylglycerol biosynthesis. **Biochem. J.**, v. 360, p. 471–479, 2001.

GSELL, M. et al. A yeast mutant deleted of GPH1 bears defects in lipid metabolism: **Plos One**, v. 10, p. 19, 2015.

GOLDEMBERG, J. The promise of clean energy. **Energy Policy** v.34, p.2185–2190, 2006.

HIRUTA, O. et al. Application of maxblend fermentor for microbial processes. **J. Ferment. Bioeng.** v. 83, p. 79–86, 1997.

HUANG, D. et al. Activation of glycerol metabolic pathway by evolutionary engineering of *Rhizopus oryzae* to strengthen the fumaric acid biosynthesis from crude glycerol. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 263-272, 2015.

IEA — International Energy Agency. **World Energy Outlook**. IEA, Paris. 2013.

INOVA UNICAMP. **Processo de produção do bioquerosene**. Disponível em: <http://www.inova.unicamp.br/sici/visoes/ajax/ax_pdf_divulgacao.php?token=LxINZbIx>. Acesso em 15. Set. 2015.

JUSZCZYK, P. et al. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 124-131. 2013.

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

KNIGHT J. A.; ANDERSON S.; RAWLE J. M. Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. **Clin Chem**, v.18. p.199-202, 1972.

KOLOUCHOVÁ, I. et al. Lipid accumulation by oleaginous and non-oleaginous yeast strains in nitrogen and phosphate limitation. **Folia Microbiol**, v. 61, n. 5, p.431-438, 1 mar. 2016.

KOT, A M. et al. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 14, p.6103-6117, 21 maio 2016.

KUNTZLER, S. G. et al. Determinação do teor de lipídeos da biomassa de leveduras cultivadas em meio contendo glicerol bruto. In: 12^a MOSTRA DE PRODUÇÃO UNIVERSITÁRIA, 12., 2013, Rio Grande – RS.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1976, v.2. p. 436.

LI, M. et al. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass Bioenergy**, v.34, p.101-107, 2010.

LI, T. et al. Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 250-257, 2015.

LI, R. et al. Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 151-156, 2011.

LI, Y. et al., High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 41, p. 312–317, 2007.

LIU, L; REDDEN, H.; ALPER, H. S. Frontiers of yeast metabolic engineering: diversifying beyond ethanol and *Saccharomyces*. **Curr Opin Biotechnol**, v. 24, p. 1023–30, 2013.

LILLY, M.D. Production of intracellular microbial enzymes. In: APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOENGINEERING. New York: Academic Press, 1979, v.2.

LUO, H. et al. A pH control strategy for increased β -carotene production during batch fermentation by recombinant industrial wine yeast. **Process Biochemistry**, v. 48, p.195-200, 2013.

MACEDO, I. C. et al. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 7, p. 582-595, 2008.

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

MASNADI, M. S. et al. From fossil fuels towards renewables: inhibitory and catalytic effects on carbon thermochemical conversion during co-gasification of biomass with fossil fuels. **Applied Energy**, v. 140, p. 196-209, 2015.

MATSAKAS, L. et al. Use of dried sweet sorghum for the efficient production of lipids by the yeast *Lipomyces starkeyi* CBS 1807. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 367-372, 2014.

MEDEIROS, F. O. et al. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, p. 336-339, 2008.

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

MENDES, A. P. D. A.; COSTA, R. C. D. Mercado brasileiro de biodiesel e perspectivas futuras. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v.31, p. 253-279, 2010.

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

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v.97, n.6, p.841- 849, 2006.

MOREIRA, A. B. R. et al. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy and Fuels**, v. 21, p. 3689-3694, 2007.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia dos óleos e gorduras vegetais**. Rio de Janeiro: Varela, 1989.

MORETON, R.S. **Single cell oil**: Longman Scientific & Technical; John Wiley, 1988.

MUNCH, G. et al. Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 49-55, 2015.

OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. A. Z.; DOS SANTOS, W. L. P. Biodiesel: possibilidades e desafios. **Redes**, v. 1, n. 497, 2013.

OLIVEIRA M. Voo verde. Revista fapesp. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2013/07/11/voo-verde/>>, v. 209, jul. 2013. Acesso em 02. Out .2015.

OLKIEWICZ, M. et al. Biodiesel production from sewage sludge lipids catalysed by Brønsted acidic ionic liquids. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 181, p.738-746, fev. 2016.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 43-49, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. *Yarrowia lipolytica*: a model microorganism used for the production of tailor-made lipids. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 112, p. 639–654, 2010.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG N. R.: Microbiologia conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Pearson, 1997. v. 1. p. 524.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p.11-36, jan. 2011.

PETERSEN, E. E.; HOGLUND, J.; FINNVEDEN, G. Screening potential social impacts of fossil fuels and biofuels for vehicles. **Energy Policy**, v. 73, p. 416-426, 2014.

POLI, J. S. et al. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: a potential feedstock for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 320-326, 2014.

POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v.35, p. 5393-5398, 2007.

RAIMONDI, S. et al. Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 11, 2014.

RANUCCI, C. R. et al. A obtenção de bioquerosene de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) e suas misturas ao querosene fóssil. **Revista Tecnológica**, p. 43-52, 2015.

RATLEDGE, COLIN. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p.807-815, nov. 2004.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, v. 27, 2007.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**: produção de enzimas e engenharia das fermentações. Pelotas: Editora Universitária, 2000. 218 p.

REYNOL, F. Modelo do biodiesel poderia ser aplicado ao querosene vegetal. **Inovação Uniemp**, v. 3, n.3, p. 21-23, 2007.

RITTMANN, B. E. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v.100, n.2, p. 203-212, 2008.

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

RIVALDI, J.D. **Crescimento e caracterização enzimática de bactérias probióticas em meio contendo glicerol e seu encapsulamento em matriz polimérica natural**. 2012. 170p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

ROSA, P. D. **Otimização da biossíntese de óleo microbiano pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33**. 2014. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

ROSSI, M. et al. Getting lipids for biodiesel production from oleaginous fungi. **Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies**, v. 1, p. 72-74, 2011.

SAENGE, C. et al. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 210-218, 2011.

SANTA ANNA, L. M. et al. Production of biosurfactante from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, n. 2, p. 159 – 166, 2002.

SANTOS, E. O. **Aproveitamento do glicerol gerado na síntese de biodiesel para produção de biomassa de leveduras**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Bücher, 2001. v.2 p. 541.

SCHMIDT, C. et al. Defects in triacylglycerol lipolysis affect synthesis of triacylglycerols and steryl esters in the yeast. **Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, p. 1393-1402, 2014.

SEMIÃO, F. J. C., **Produção de single cell oil para biodiesel a partir da microalga *Chlorella protothecoides* em cultivo autotrófico e heterotrófico em simultâneo com troca simbiótica de correntes gasosas em circuito fechado**. 2013. Dissertação (Mestrado). Lisboa, Portugal, 2013.

SEO, Y. H.; HAN, S.; HAN, J.-I. Economic biodiesel production using algal residue as substrate of lipid producing yeast *Cryptococcus curvatus*. **Renewable Energy**, v. 69, p. 473-478, 2014.

SILVA, C. I. S. **Otimização das condições de cultivo da levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 para produção de lípidos carotenóides em frascos agitados**. 2014. p. 53. Dissertação (Mestre em Engenharia Alimentar) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

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

SILVA, M. G. S. et al. Estudo de viabilidade técnica da produção de biodiesel de babaçu: uma revisão crítica. **Ruvrv**, p.434-443, 2014.

SILVEIRA, E. Querosene Vegetal, revista FAPESP. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2009/10/01/querosene-vegetal/>>. ed. 164, Out 2009. Acesso em: 05. Out .2015.

SINGH, D. et al. Combination of calcium and magnesium ions prevents substrate inhibition and promotes biomass and lipid production in thraustochytrids under higher glycerol concentration. **Algal Research**, v. 15, p.202-209, abr. 2016.

SIQUEIRA, S. F. et al. Avaliação do cultivo heterotrófico de *Phormidium* sp. utilizando sacarose como fonte de carbono orgânico. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 5093-5097, 2015.

SITEPU, I. R. et al. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource Technology**, v. 144, p.360-369, set. 2013.

SITEPU, I. R. et al. Identification of oleaginous yeast strains able to accumulate high intracellular lipids when cultivated in alkaline pretreated corn stover. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 7645-7657, 2014 a.

SITEPU, I. R. et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1336-1360, 2014 b.

SOUZA, J. R.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, R L. B. Avaliação de microrganismos quanto à conversão do glicerol obtido do processo de produção do biodiesel em biossurfactantes. In: SINAFERM XV – SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES. 15., 2007, Curitiba – PR, Anais CD-room.

SPIER, F. **Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto gerado na síntese de biodiesel**. 2014. 190 f. Tese - Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

SUBRAMANIAM R. et al. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 37, p. 1271, 2010.

SUUTARI, M.; LIUKKONEN, K.; LAAKSO, S. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 1469-1474, 1990.

TOLMASQUIM, M.T. **Fontes renováveis de energia no Brasil**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

TOLMASQUIM, M. T.; GUERREIRO, A.; GORINI, R. Matriz energética brasileira: uma prospectiva. **Novos Estudos - CEBRAP**, p. 47-69, 2007.

TSAKONA, S. et al. Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. **Journal of Biotechnology**, v. 189, p. 36-45, 2014.

UMPIERRE, A.; MACHADO, F. Glicerocímica e valorização do glicerol. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 106-116, 2012.

VELÁZQUEZ, R. S. G.; KUBOTANI, R. T.; VELÁZQUEZ, S. M. S. G. Novos combustíveis para a aviação: um estudo de caso. **Revista Mackenzie de Engenharia e Computação**, v. 12, n. 1, 2012.

VOSS, I.; STEINBU CHEL, A. High cell density cultivation of *Rhodococcus opacus* for lipid production at pilot-plant scale. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 55, p. 547–555, 2001.

WANG, D. H. The mechanism of improved pullulan production by nitrogen limitation in batch culture of *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 325-331, 2015.

WIKIPEDIA. Glicerol, Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Glicerol>>. Acesso em 14. Out .2015.

WOODBINE M. Microbial fat: micro-organisms as potential fat producers. **Prog Ind Microbiol**, p. 179–245, 1959.

WU, S. et al. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6124-6129, 2010.

XU, J. et al. Exploration of sodium lignosulphonate's effects on lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 424-431, 2015.

YANG, F; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol-a by product of biodiesel production. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, n. 13, p. 1-10, 2012.

YANG, X. et al. Simultaneous utilization of glucose and mannose from spent yeast cell mass for lipid production by *Lipomyces starkeyi*. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 383-387, 2014.

YEN, H. W.; CHANG, J. T.; CHANG, J. S. The growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an internal-loop airlift bioreactor by using mixture substrates of rice straw hydrolysate and crude glycerol. **Biomass and Bioenergy**, v. 80, p. 38-43, 2015 a.

YEN, H. W.; LIAO, Y. T.; LIU, Y. X. Cultivation of oleaginous *Rhodotorula mucilaginosa* in airlift bioreactor by using seawater. **Journal of bioscience and bioengineering**, 2015 b.

YU, X. et al. Co-utilization of glucose, xylose and cellobiose by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. **Biomass & Bioenergy**, v. 71, p. 340-349, 2014.

ZARA, G. et al. Oxygen is required to restore flor strain viability and lipid biosynthesis under fermentative conditions. **Fems Yeast Research**, v. 9, n. 2, p.217-225, mar. 2009.

ZHANG, J.; HU B. Microbial biodiesel production: oil feedstocks produced from microbial cell cultivations, biodiesel, **Feedstocks and Processing Technologies**, 2011.

ZHANG, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. **Bioresource Technology**, v. 157, p.149-153, abr. 2014.

ZHAO, X. et al. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **Eur.J.Lipid Sci. Technol.** v. 110, p. 405–412, 2008.

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

APÊNDICE

APÊNDICE A - ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

A.1 - Determinação de concentração celular por espectrofotometria

Para o acompanhamento da concentração celular durante os cultivos foi utilizada a técnica espectrofotométrica de densidade óptica (D.O.) na qual a absorbância de suspensão celular a 600 nm é correlacionada à concentração celular determinada por gravimetria. Nesta técnica, se faz necessária a obtenção de curvas de calibração específicas para cada cepa de levedura. Desta forma, foram obtidas curvas de calibração para relacionar valores de densidade óptica à massa seca de células correspondente para cada uma das cinco espécies estudadas.

Na Tabela A.1 são apresentadas as equações que relacionam a absorbância da suspensão celular a 600 nm (densidade ótica) com a concentração celular de biomassa seca (em g/L), assim como seus respectivos coeficientes de determinação (R^2). As curvas de calibração também são apresentadas na Figura A.1. Para todas as leveduras avaliadas, as curvas de calibração apresentaram comportamento linear dentro da região observada, com valores de absorbância na região entre 0,01 e 1,30. As curvas de calibração obtidas por regressão linear dos dados apresentaram um bom ajuste, sendo os valores dos coeficientes de determinação (R^2) superiores a 96% para todas as leveduras no intervalo observado. Baseado no comportamento linear e no grau de ajuste obtido as curvas foram consideradas satisfatórias para a determinação da concentração celular a partir da leitura da densidade ótica da suspensão celular das leveduras.

Tabela 33 – Dados das curvas de calibração para as cinco espécies de leveduras.

Levedura	Equação	R^2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Y – 27053	Conc. (g/L) = 0,7411.Abs _{600nm} - 0,0526	0,9658
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y – 1091	Conc. (g/L) = 1,0817.Abs _{600nm} - 0,0368	0,9889
<i>Rhodotorula glutinis</i> Y – 12905	Conc. (g/L) = 0,4419.Abs _{600nm} - 0,0133	0,9917
<i>Cryptococcus curvatus</i> Y – 1511	Conc. (g/L) = 0,8552.Abs _{600nm} - 0,0593	0,9617

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura A.1 - Curvas de calibração de absorbância a 600 nm em função da concentração celular para as leveduras (a) *Rhodotorula mucilaginosa* Y – 27053; (b) *Rhodospiridium toruloides* Y – 1091; (c) *Rhodotorula glutinis* Y – 12905; (d) *Cryptococcus curvatus* Y – 1511 e (e) *Lipomyces starkeyi* Y – 27493.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A.2 - Determinação da concentração de lipídeos

A determinação da concentração de óleo microbianos produzidos e acumulados pelas leveduras foi realizada pela extração empregando o método Bligh & Dyer (1959) adaptado seguida pela quantificação por calorimetria utilizando a técnica de coloração pela reação Sulfo-fosfo-vanilina (KNIGHT et al., 1972). Para a utilização da técnica colorimétrica foi necessária a construção de uma curva de calibração que relacionasse a absorbância em 525 nm de uma solução resultante da reação de coloração com a concentração de lipídeos no extrato celular.

A curva de calibração obtida para produção de lipídeos está apresentada na Figura A.2. Dentro da região avaliada, absorbância entre 0,02 e 1,6, a curva mostrou um comportamento linear, sendo obtido coeficiente de determinação (R^2) de 0,9911, o que permitiu sua utilização para a quantificação do teor de lipídeos nas amostras de extrato celular.

Figura A.2. - Curva de calibração para determinação do teor de lipídeos

Fonte: Elaborado pelo autor.

O uso de técnica colorimétrica para a determinação de lipídeos no extrato celular permitiu a quantificação de lipídeos em pequenas quantidades de amostra, ou seja com as células presentes em cerca de 1,0 mL do meio de cultivo. Tal quantificação não poderia ser

determinado com o emprego de técnica gravimétrica devido a pequena massa de lipídio extraído. O emprego desta metodologia permitiu um acompanhamento mais detalhado da evolução do acúmulo de óleos microbianos pelas leveduras, sendo um importante parâmetro para o desenvolvimento dos passos seguintes deste estudo.

Visando comparar os resultados obtidos pela técnica colorimétrica com a técnica gravimétrica, comumente empregada para quantificação de lipídeos, foi realizado um ensaio no qual foi determinado o teor de lipídeos em leveduras provenientes do mesmo cultivo. Nesta comparação, foi utilizada a levedura *Rhodotorula glutinis* Y-12905 proveniente de um cultivo de 120 horas em meio contendo glicose como substrato. Para a determinação por técnica gravimétrica foi necessário um volume de amostra dez vezes maior que a técnica colorimétrica. As determinações foram feitas em duplicata para a técnica gravimétrica, na qual foi estimado um teor de $10,1 \pm 0,2$ %, de lipídeos em relação à massa seca de levedura. Para a técnica colorimétrica foram realizadas vinte repetições, e como resultado foi estimado um teor de 8 ± 1 % de lipídeos em relação à massa seca. Apesar da diferença observada, a técnica colorimétrica foi considerada satisfatória, pois permitiu estimar um teor muito próximo ao obtido pelo método gravimétrico.

A.3 - Determinação da concentração de glicerol

Para o acompanhamento do consumo de substrato pelas leveduras foi utilizada a técnica de determinação das concentrações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para o emprego desta técnica, foi necessária à obtenção de curvas de calibração específicas para glicose e glicerol. As curvas de calibração foram obtidas pela regressão linear dos dados de concentração das soluções padrão de glicose e glicerol em função das áreas dos picos dos cromatogramas, cujos dados são apresentados na Tabela A.2. Dentro da região observada, concentrações entre 0,04 e 6,00 g/L, as curvas de calibração apresentaram um comportamento linear e um elevado valor para o coeficiente de determinação ($R^2 = 1,0000$) para ambos os compostos analisados. Desta forma, a quantificação dos substratos por cromatografia líquida mostrou-se adequada para o acompanhamento das fermentações.

Tabela A.2. – Concentrações de analitos e as áreas correspondentes observadas nos cromatogramas, assim como a curva de calibração para determinação de glicerol por cromatografia líquida de alta eficiência.

	Área	Concentração (g/L)	Curva de calibração
	9850404,0000	5,8420	
	485104,5000	2,8640	$y = ax + b$
Glicerol	1594075,0000	0,9390	$a = 5,92 \text{ E-}0,07$
	754244,0000	0,4410	$b = 0,00 \text{ E}+0,00$
	288493,8130	0,1350	$r^2 = 1,0000$
	145513,8910	0,0820	

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE B - ACOMPANHAMENTO DOS PROCESSOS DE BIOCONVERSÃO

B.1 - Efeito da agitação/aeração no acúmulo de lipídeos em cultivos em frascos agitados

A Figura A.3 (a, b, c) mostra o perfil de acúmulo de lipídeos para as diferentes agitações utilizadas nos ensaios de avaliar a agitação/aeração em frascos agitados. As menores concentrações de lipídeos foram obtidas quando foi utilizada nos experimentos a agitação de 150 rpm (Figura A.3 (a)) tendo a máxima concentração de 1,65 g/L nesta agitação, aumentando a agitação para 200 rpm houve um acréscimo na produção de lipídeos, com a máxima concentração obtida de 3,65 g/L (Figura A.3 (b)), com o aumento da agitação para 250 rpm também houve um ganho em relação a produção de lipídeos, alcançando 4,45 g/L (Figura A.3 (c)). Com base nesses dados verifica-se que aumentando a agitação (150 a 250) houve um aumento na produção de lipídeos.

Figura A.3 - Concentração de lipídeos para os diferentes agitações avaliadas ((a) 150 rpm, (b) 200 rpm e (c) 300 rpm) nos ensaios em frascos agitados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura A.4 demonstra as concentrações de lipídeos para os diferentes volumes de frasco utilizados nos ensaios para avaliar a agitação/aeração em frascos agitados. As menores produções lipídicas foram obtidas quando foi utilizada nos frascos um volume maior de meio (100 mL) (Figura A.4 (c)) sendo obtida concentração de lipídeos nesta condição de 0,88 g/L a um máximo de 2,32 g/L, ao se diminuir o volume de meio no frasco para 66,7 mL houve um aumento na concentração máxima de lipídeos obtida chegando a 4,18 g/L (Figura A.4 (b)), e a maior concentração de lipídeos foi obtida diminuindo o volume de meio utilizado no frasco para 50 mL alcançando 4,45 g/L (Figura A.4 (a)). Com base nesses dados observou-se que o aumento da produção lipídica também se deu com a redução do volume do meio de fermentação (50 mL, 66,7 mL e 100 mL).

Figura A.4 - Concentração de lipídeos para os diferentes volumes ((a) 50 mL, (b) 66,7 mL e (c) 100 mL) utilizados nos ensaios em frascos agitados.

Fonte: Elaborado pelo autor.

B.2 - Estabelecimento de composição mínima do meio de cultivo

Na Figura A.5 (a,b) estão representados as concentração celular a produção de lipídeos para os ensaios que obtiveram maiores produções. Foi observado que os meios 5 e 14 que possuíam em comum os nutrientes Extrato de levedura e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram os meios que obtiveram maiores concentrações celulares com 25,4 g/L e 28,8 g/L e maiores teores de lipídeos com 4,3 g/L e 4,4 g/L em 240 h de fermentação.

Figura A.5 – Concentração celular (a) e de lipídeos (b) para os ensaios 5 (Extrato de Levedura e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e ensaio 14 (Peptona, Extrato de Levedura, KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi elaborado um gráfico com os ensaios contendo nutriente KH_2PO_4 no meio de cultivo. Observou-se que a adição do nutriente KH_2PO_4 ao meio de fermentação não causou influência significativa na produção de lipídeos (Figura A.6), com produções de lipídeos discretas, com única exceção para o meio 14 que obteve a maior produção o que se deve aos outros nutrientes presentes no meio de cultivo.

Figura A.6 - Concentração de lipídeos para os ensaios contendo KH_2PO_4 no meio de cultivo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura A.7 estão apresentados todas as condições avaliadas para a produção de lipídeos para o estudo do estabelecimento da composição mínima do meio de cultivo.

Figura A.7 – Teor de lipídeos para as condições avaliadas no estudo da composição nutricional do meio de cultivo para produção de lipídeos.

Figura A.7 – Teor de lipídeos para as condições avaliadas no estudo da composição nutricional do meio de cultivo para produção de lipídeos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

B.3 - Avaliação da influência da razão C:N no meio de cultivo

Na Figura A.8 são apresentados os perfis de crescimento celular, os perfis de acúmulo de lipídeos acumulados pela levedura no decorrer de 240h de fermentação, e o consumo de substrato para diferentes razões C:N no meio. Os maiores crescimentos celulares apresentados foram observados quando utilizadas razões de C:N de 20:1 e 30:1 respectivamente (Figura A.9 (a)) com 34,1 g/L e 29,0 g/L. A razão de C:N de 30:1 também apresentou um alto teor de lipídeos alcançando 7,70 g/L em 240 horas de cultivo (Figura A.9 (b)). Semelhante ao crescimento celular as condições que apresentaram maiores consumos do substrato estão na região de razão de C:N entre 10:1 e 30:1 com consumo de 100% do substrato em 240 horas de cultivo (Figura A.9 (c)).

Figura A.8 – Perfil de crescimento (a), acúmulo de lipídeos (b) e consumo de substrato (c) da levedura *Rhodotorula glutinis* – Y – 12905 em meios contendo diferentes razões C:N

Fonte: Elaborado pelo autor.