



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS



**UTILIZAÇÃO DE GLICEROL PROVENIENTE DA SÍNTESE DO BIODIESEL
PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POR LEVEDURAS SILVESTRES**

Susan Hartwig Duarte
Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP**

Hartwig Duarte, Susan

H259u Utilização de glicerol proveniente da síntese do biodiesel para a produção de lipídeos por leveduras silvestres / Susan Hartwig Duarte. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Francisco Maugeri Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Glicerol. 2. Biodiesel. 3. Lipídeos microbianos.
4. Ácidos graxos. I. Maugeri Filho, Francisco. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Use of glycerol from biodiesel synthesis for the production of lipids by wild yeasts

Palavras-chave em inglês (Keywords): Glycerol, Biodiesel, Microbial lipids, Fatty acids

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho

Eliana Setsuko Kamimura

Fátima Aparecida de Almeida Costa

Gabriela Alves Macedo

Telma Teixeira Franco

Data da Defesa: 29/03/2011

Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de mestrado **Utilização de glicerol proveniente da síntese do biodiesel para a produção de lipídeos por leveduras silvestres**, defendida por Susan Hartwig Duarte, aprovado pela Comissão Julgadora em _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Orientador – FEA/DEA/UNICAMP

Dr^a. Fátima Aparecida de Almeida Costa
Membro – FEA/DEA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Eliana Setsuko Kamimura
Membro – USP/PIRASSUNUNGA

Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo
Membro – FEA/DCA/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco
Membro – FEQ/UNICAMP

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Engenharia de Alimentos e à UNICAMP por me acolherem e permitirem meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Agradeço à agência financiadora CAPES pela bolsa de mestrado.

Agradeço ao Prof. Francisco Maugeri Filho pela orientação, dedicação, amizade, confiança e pelo grande ensinamento científico.

Gostaria de agradecer à Prof^ª. Eliana Setsuko Kamimura, Dr^ª. Fátima Aparecida de Almeida Costa (Fifa), Prof^ª. Gabriela Alves Macedo e Prof^ª. Telma Teixeira Franco por aceitarem fazer parte da banca examinadora e pelas correções e sugestões que contribuíram para este trabalho.

Agradeço à Fifa por ser uma pessoa adorável e estar sempre disposta a ajudar e também à Gi que ajudou muito na realização dos experimentos. Agradeço também à Prof^ª. Maria Isabel Rodrigues que esteve presente em diversos momentos da minha trajetória no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB).

Não posso deixar de agradecer meus amigos e colegas da pós-graduação, pelos momentos compartilhados, ajuda, amizade e alegria e aos amigos do LEB que tornaram o ambiente de trabalho alegre e prazeroso em especial Ana Paula, Cris, Suzana e Remi, com os quais convivi por maior tempo durante o período dos experimentos, agradeço pelo apoio e amizade. Também às minhas colegas de casa que convivi diariamente com grande amizade: Raquel, Adelaine, Lorena e Meiri.

Agradeço a uma pessoa especial, o qual amo e admiro muito, meu namorado Mariano, que me apoiou desde o início da minha decisão de vir para Campinas mesmo que isto nos mantivesse distantes. Ele tornou minha trajetória longe de casa mais fácil com palavras de incentivo, ajuda e principalmente com seu amor, carinho e amizade.

Termino agradecendo minha família. Meus pais Elimar e Lauret, à eles dedico esta conquista pois são fundamentais na minha vida, assim como meus irmãos Jessica e Eric que sempre me apoiaram. Amo vocês!

E principalmente à Deus, que me ilumina e protege todos os dias.

RESUMO

Os biocombustíveis, como o biodiesel, representam uma alternativa renovável e ambientalmente segura aos combustíveis fósseis. Sua produção encontra-se em crescimento acelerado, gerando como consequência, grande quantidade de glicerol, principal co-produto do processo. A utilização do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para obtenção de produtos biotecnológicos é uma alternativa de disposição adequada deste co-produto. Lipídeos microbianos podem ser empregados como substitutos de fontes oleaginosas utilizadas como matéria-prima para a produção do biodiesel, reduzindo seu custo de produção e tornando o processo sustentável. Tendo em vista o estudo de leveduras silvestres isoladas de biomas brasileiros, o objetivo deste trabalho foi aproveitar o glicerol residual do biodiesel como fonte de carbono no cultivo desses micro-organismos para a produção de lipídeo microbiano. Cinco leveduras foram pré-selecionadas, pela técnica de coloração com Sudan Black B, como potenciais produtoras de lipídeos: LEB-M3, LEB-AAN1, LEB-AQ5, LEB-AAI4 e LEB-AJ10. Essas leveduras foram cultivadas em glicerol puro e glicerol bruto acompanhando o crescimento celular e consumo de glicerol ao longo do cultivo e ao final os lipídeos. A levedura LEB-M3, isolada do Pantanal, atingiu em 192 horas de cultivo $11,86 \pm 0,08$ e $16,12 \pm 0,91$ g/L de biomassa e rendimentos de lipídeo de $7,57 \pm 0,19$ e $33,67 \pm 4,67\%$ para o glicerol puro e glicerol bruto, respectivamente. Apresentou um conteúdo de lipídeos de $56,58 \pm 5,62\%$ em relação a massa celular (base seca) para o cultivo em glicerol do biodiesel destacando-se entre as demais, tendo sido selecionada através de teste de Tukey, e geneticamente identificada como *Candida* sp. O perfil lipídico mostrou o predomínio do ácido oléico (C18:1) para o cultivo em glicerol puro, 57,35% e ácido linoléico (C18:2) para o cultivo em glicerol bruto com 46,0%. A influência das condições do meio de cultivo da levedura LEB-M3 na produção de lipídeos foi investigada através de um delineamento Plackett-Burman, destacando-se a temperatura como uma das variáveis mais relevantes. Assim, foi feito o estudo da influência da temperatura na produção de lipídeos e perfil de ácidos graxos. A concentração de lipídeos para a temperatura de 23°C foi significativamente maior, e no perfil de ácidos graxos houve o predomínio de C18:2, assim como para as demais temperaturas, com quantidade significativa de ácido gama linolênico (C18:3).

Palavras-chave: glicerol, biodiesel, lipídeos microbianos, ácidos graxos.

ABSTRACT

Biofuels such as biodiesel, are a renewable and environmentally safe alternative to fossil fuels. Their production is growing rapidly, leading as a consequence, to large amounts of glycerol, the main co-product generated during the process. The use of glycerol from the manufacture of biodiesel as a substrate for biotechnology products is an alternative to proper disposal of this co-product. Microbial lipids can be used as substitutes for oil sources used as raw material for biodiesel production, reducing their cost of production and making the process sustainable. Considering the study of wild yeasts isolated from different Brazilian biomes, the objective was to utilize the residual glycerol from biodiesel as a carbon source in the cultivation of these microorganisms for the production of microbial lipids. Five yeast strains were pre-selected by the Sudan Black B staining method as potential producers of lipids: LEB-M3, LEB-AAN1, LEB-AQ5, LEB-AAI4 and LEB-AJ10. These yeasts were grown in pure glycerol and crude glycerol accompanying cell growth and glycerol consumption during the cultivation and lipids at the end of fermentation. The strain LEB-M3, isolated from the Pantanal, reached in 192 hours of culture $11,86 \pm 0,08$ g/L and $16,12 \pm 0,91$ g/L of biomass and lipid yields $7,57 \pm 0,19$ e $33,67 \pm 4,67\%$ for pure glycerol and crude glycerol, respectively. The lipid content of the cells was $56,58 \pm 5,62\%$ (dry weigh basis) for the cultivation on biodiesel glycerol selected among the others, according to the Tukey test, and genetically identified by *Candida* sp. The lipid profile showed a predominance of oleic acid (C18:1) for grows in pure glycerol, 57,03% and linoleic acid (C18:2) for cultivation in crude glycerol, 44,62%. The influence of environmental conditions for cultivation of LEB-M3 yeast in the production of lipids was investigated using a Plackett-Burman factorial design where it was shown the temperature as one of the most important variables. Therefore a experimental set was carried out in order to study the influence of temperature on the production of lipids and fatty acid profile. The concentration of lipids in a temperature of 23°C was significantly higher and fatty acid profile was more distributed, with a predominance of C18:2 as well as for the other temperatures, with substantial amounts of gamma linolenic acid (C18:3).

Keywords: glycerol, biodiesel, microbial lipids, fatty acids.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Biodiesel	5
3.2 Glicerol	6
3.3 Glicerol como Substrato em Cultivos Microbianos	9
3.4 Lipídeos Microbianos	11
3.5 Micro-organismos Produtores de Lipídeos	12
3.6 Produção de Lipídeos por Leveduras do Gênero <i>Candida</i>	14
3.7 Biossíntese de Lipídeos	15
3.8 Leveduras Silvestres.....	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO II	26
SELEÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES OLEAGINOSAS CULTIVADAS EM GLICEROL PURO E GLICEROL DO BIODIESEL	27
RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Micro-organismos	29
2.2 Glicerol	30
2.3 Pré-seleção de Leveduras Oleaginosas.....	30
2.4 Seleção de Leveduras Oleaginosas em Cultivos Submersos.....	31
2.4.1 Preparo do Inóculo.....	31
2.4.2 Cultivos em Frascos Agitados.....	31
2.5 Identificação da Levedura	32

2.6 Metodologia Analítica.....	32
2.6.1 Crescimento Celular	32
2.6.2 Determinação da Concentração de Glicerol.....	32
2.6.3 Determinação de Lipídeos	32
2.6.4 Determinação dos Ácidos Graxos.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Pré-seleção de Leveduras Oleaginosas.....	33
5.2 Seleção de Leveduras Oleaginosas em Cultivos Submersos.....	35
5.3 Identificação da Levedura	40
5.4 Perfil de Ácidos Graxos.....	41
6. CONCLUSÃO.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
CAPÍTULO III	46
INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POR <i>Candida</i> sp. UTILIZANDO GLICEROL PROVENIENTE DA SÍNTESE DE BIODIESEL	47
RESUMO	47
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 Micro-organismo	49
2.2 Glicerol	50
2.3 Análise Experimental para Seleção de Variáveis (Plackett - Burman).....	50
2.3.1 Preparo do Inóculo.....	50
2.3.2 Cultivos em Frascos Agitados.....	51
2.4 Influência da Temperatura na Produção de Lipídeos	52
2.4.1 Cultivos em Frascos Agitados.....	52
2.5 Metodologia analítica	52
2.5.1 Crescimento Celular	52
2.5.2 Determinação da Concentração de Glicerol.....	52

2.5.3 Determinação de Lipídeos	53
2.5.4 Medida de pH	53
2.5.5 Determinação dos Ácidos Graxos	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1 Seleção das Variáveis para a Produção de Lipídeos	54
3.2 Influência da Temperatura na Produção de Lipídeos	58
3.3 Perfil de Ácidos Graxos.....	59
4. CONCLUSÃO	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CONCLUSÕES GERAIS	66
APÊNDICE	67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO, OBJETIVOS, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Esquema da reação de transesterificação na produção de biodiesel. 5

Figura 2: Fórmula estrutural do glicerol..... 6

Figura 3: Esquema da via de degradação do glicerol para formação de lipídeo..... 16

CAPÍTULO II

SELEÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES OLEAGINOSAS CULTIVADAS EM GLICEROL PURO E GLICEROL DO BODIESEL

Figura 1: Crescimento celular das leveduras em glicerol (a) puro e (b) bruto, consumo de glicerol das leveduras em glicerol (c) puro e (d) bruto para (●) LEB-M3, (■) LEB-AAN1, (◆) LEB-AQ5, (+) LEB-AAI4 e (▲) LEB-AJ10 ao longo do cultivo..... 35

Figura 2: Micrografia e microscopia da levedura *Candida* sp. LEB-M3. 40

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POR *Candida* sp. UTILIZANDO GLICEROL PROVENIENTE DA SÍNTESE DE BODIESEL

Figura 1: Crescimento celular de *Candida* sp. nas temperaturas de (●) 23°C, (■) 25°C e (◆) 27°C..... 58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO, OBJETIVOS, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Composição da glicerina proveniente da produção de biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas..... 9

Tabela 2: Produtos obtidos a partir do glicerol por via biotecnológica..... 10

CAPÍTULO II

SELEÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES OLEAGINOSAS CULTIVADAS EM GLICEROL PURO E GLICEROL DO BIODIESEL

Tabela 1: Regiões de coleta das leveduras utilizadas para *screening* isoladas por (MAUGERI e HERNALSTEENS, 2007) 30

Tabela 2: Desempenho dos micro-organismos das diferentes regiões quanto à coloração..... 34

Tabela 3: Análise qualitativa* em leveduras através de coloração com Sudan Black B. 34

Tabela 4: Médias e desvios padrões para a biomassa, consumo de glicerol e Y_x/s , e análise estatística dos dados* 37

Tabela 5: Média e desvio padrão para conteúdo lipídico, concentração de lipídeos e rendimento de lipídeos, e análise estatística dos dados* 38

Tabela 6: Perfil de ácidos graxos dos lipídeos da levedura LEB-M3 em meios de cultivo contendo glicerol puro e glicerol bruto 41

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POR *Candida* sp. UTILIZANDO GLICEROL PROVENIENTE DA SÍNTESE DE BIODIESEL

Tabela 1: Composição do ágar GYMP.....	49
Tabela 2: Variáveis estudadas no Plackett-Burman (valores reais e codificados).	50
Tabela 3: Composição do meio de cultivo do inóculo.....	51
Tabela 4: Matriz do planejamento Plackett-Burman (valores codificados) e respostas em conteúdo lipídico (%) concentração de lipídeos (g/L) e rendimento (%) ao final do cultivo.	54
Tabela 5: Efeitos estimados para o conteúdo lipídico (%).	55
Tabela 6: Efeitos estimados para a concentração de lipídeos (g/L).	56
Tabela 7: Efeitos estimados para o rendimento de lipídeos (%).	56
Tabela 8: Média e desvios padrões para conteúdo lipídico e concentração de lipídeos (g/L), e análise estatística dos dados*.	59
Tabela 9: Perfil de ácidos graxos dos lipídeos da biomassa de <i>Candida</i> sp. cultivada em meios de cultivo contendo glicerol de biodiesel em diferentes temperaturas.....	60

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é a principal fonte de energia utilizada no mundo, porém sua utilização oferece riscos ambientais e sua disponibilidade se tornará cada vez mais limitada. Com a atual preocupação relacionada ao aquecimento global e a escassez de petróleo, associada às novas legislações de controle do meio ambiente torna constante a busca por alternativas para substituição dos combustíveis fósseis. A tecnologia de biocombustíveis utiliza fontes de energia renováveis, que substituem esses combustíveis, reduzindo ainda, a emissão de gases de efeito estufa (RIVALDI et al., 2008).

A busca por fontes de energia renováveis e que assegurem o desenvolvimento sustentável levou a implantação do biodiesel na matriz energética brasileira como combustível alternativo (BARBOSA, 2009). O governo brasileiro lançou em dezembro de 2004 o marco regulatório que estabeleceu as condições legais para a introdução do biodiesel no país. A lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, estabelece como obrigatória a adição de um percentual mínimo de 5% de biodiesel ao óleo diesel (B5) comercializado a partir de 2013, em qualquer parte do território nacional. No entanto, esta mesma lei confere poderes ao Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) para reduzir os prazos de adição de percentual de biodiesel. Assim, de janeiro a junho de 2008 a porcentagem de adição de biodiesel ao óleo diesel passou a ser de 2% (B2). Em julho do mesmo ano, o CNPE elevou para 3% a adição de biodiesel ao diesel mineral, com antecipação da mistura B5 para 2010 (NACHILUK e FREITAS, 2009).

Os processos atuais de produção de biodiesel estão baseados na reação de transesterificação, de óleo vegetal ou gordura animal, com metanol ou etanol, na presença de catalisadores. Nessa reação são gerados como produto principal ésteres, o biodiesel, e como principal subproduto deste processo grandes quantidades de glicerol (BORSCHIVER, 2006) também conhecido como glicerina (THOMPSON e HE, 2006). A produção de 10 kg de biodiesel de óleo vegetal gera cerca de 1 kg de glicerol bruto (MEESTERS, HUIJBERTS e EGGINK, 1996), ou seja, o glicerol é o principal subproduto gerado no processo, correspondendo a aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido (EASTERLING et al., 2009), o qual é impuro e de baixo valor econômico (CHI et al., 2007).

Uma vez que os mercados tradicionais não conseguirão absorver esta nova oferta de produto, a busca por alternativas tecnológicas de aproveitamento do glicerol torna-se importante e necessária. Entre as novas estratégias que vem sendo exploradas visando o aproveitamento deste subproduto está a sua bioconversão em produtos de alto valor agregado através de processos fermentativos utilizando micro-organismos capazes de metabolizar o glicerol (SILVA, MACK e CONTIERO, 2009).

A biotransformação do glicerol à lipídeos de origem microbiana, obtidos a partir de leveduras oleaginosas, está entre uma das promissoras formas de aproveitamento deste subproduto, capacitando a síntese de um produto final de maior valor agregado através da ação destes micro-organismos. Os lipídeos produzidos biotecnologicamente podem contribuir para o aumento da demanda de óleos e gorduras, visto que em geral, a estrutura e composição destes são similares aos óleos vegetais comuns podendo ser utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel (LI, ZHAO e BAI, 2007). Os lipídeos microbianos podem também apresentar perfil de ácidos graxos com importantes características nutricionais (RATLEDGE, 1994).

Muitos micro-organismos presentes na natureza apresentam potencial capacidade de acumular lipídeos, representando uma alternativa. Devido à grande biodiversidade brasileira, espécies de micro-organismos pertencentes à fauna e flora não são conhecidas em sua totalidade sendo importante seu melhor aproveitamento. Atualmente, há um grande interesse em micro-organismos não catalogados que sejam produtores de insumos interessantes à indústria em geral (HERNALSTEENS e MAUGERI, 2010).

O grande desafio da biotecnologia de produção de lipídeos é identificar formas economicamente viáveis de aplicação desta tecnologia na indústria de alimentos (CORDEIRO, 1997). Para que a produção de lipídeo microbiano seja competitiva é necessário que o custo de sua produção seja baixo, o que pode ser feito com fontes de carbono alternativas, de forma a diminuir o custo do meio de cultivo.

Com isso torna-se importante estudar a capacidade de micro-organismos silvestres em metabolizar o glicerol para a produção de lipídeos, bem como as condições de cultivo para maior produção e melhor aproveitamento deste subproduto, evitando assim, futuros problemas ambientais provenientes de seu acúmulo e tornando a produção de biodiesel sustentável e competitiva.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Utilizar o glicerol bruto proveniente da síntese de biodiesel para o cultivo de leveduras silvestres coletadas em diversas regiões do país, visando produzir lipídeos microbianos e contribuindo para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do biodiesel.

2.2 Objetivos Específicos

- Pré-selecionar leveduras silvestres potencialmente produtoras de lipídeos utilizando a técnica de coloração Sudan Black B;
- Selecionar a levedura oleaginosa mais promissora para a produção de lipídeos em cultivos submersos utilizando meio contendo glicerol puro ou glicerol proveniente da síntese do biodiesel;
- Identificar geneticamente a levedura selecionada;
- Verificar a influência da utilização do glicerol bruto proveniente da síntese do biodiesel no perfil dos ácidos graxos;
- Selecionar através da análise dos efeitos as variáveis mais influentes do processo de produção de lipídeos através de um planejamento experimental Plackett-Burman.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biodiesel

A utilização de fontes alternativas de energia é atualmente uma das grandes prioridades, que vem contribuir significativamente para contornar os graves problemas ocasionados pelo desenvolvimento tecnológico. A preocupação com a redução da poluição e a crise energética tem estimulado o mercado mundial de biocombustíveis e a demanda por energia limpa e recursos renováveis encontra-se em contínuo aumento (BILGEN et al., 2008). O etanol e o biodiesel estão entre as mais promissoras fontes para substituição dos combustíveis fósseis (SILVA, MACK e CONTIERO, 2009).

O biodiesel apresenta características físicas semelhantes às do óleo diesel, podendo ser utilizado em motores de ciclo diesel sem nenhuma adaptação (CASTRO, MENDES e SANTOS 2004). Este biocombustível destaca-se por ser obtido a partir de matérias-primas ricas em ácidos graxos. Os processos atuais de produção de biodiesel estão concentrados na reação de transesterificação, conforme Figura 1, de óleo vegetal ou gordura animal; com álcool, metanol ou etanol, na presença de catalisadores, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio (PAPANIKOLAOU et al., 2002; BORSCHIVER, 2006).

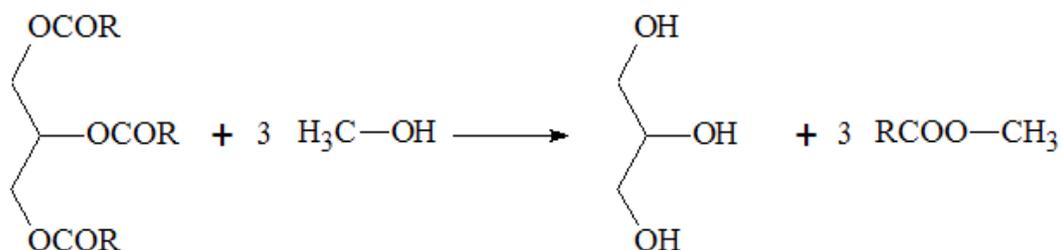


Figura 1: Esquema da reação de transesterificação na produção de biodiesel.

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de biodiesel, por duas razões: o uso de álcool como combustível em carros tem longa tradição na cultura brasileira e as condições para cultivo de plantas oleaginosas são favoráveis em diversas áreas (SILVA, MACK e CONTIERO, 2009). As principais matérias-primas vegetais oleaginosas utilizadas no processo de produção do biodiesel no Brasil são originárias de soja, dendê, girassol, babaçu, mamona e pinhão manso (ANP, 2010), já as matérias-primas de origem animal são obtidas do sebo bovino, suíno e de aves (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2008).

Como o biodiesel é obtido a partir de fontes renováveis, sua utilização proporciona uma redução de cerca de 70% no ciclo de emissões de dióxido de carbono, comparado ao óleo diesel convencional (BOURNAY et al., 2005). Algumas estratégias são utilizadas por alguns países para estimular o uso de combustíveis renováveis como dar uma compensação financeira para os produtores ou a eliminação de impostos que incidem sobre os combustíveis (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2008).

O biodiesel produzido a partir de óleos vegetais de grau alimentício apresenta baixa viabilidade econômica em relação ao diesel de petróleo, devido ao alto custo da matéria-prima, que constitui entre 76 e 85% do custo total de produção (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2008). Ao mesmo tempo em que o biodiesel é uma fonte de energia renovável e ambientalmente segura, para sua produção, as fontes oleaginosas requerem energia e áreas de terras cultiváveis, ou ainda, para disponibilidade da gordura animal, é necessário fornecer alimentos, tornando o processo restrito sob o aspecto econômico, devido ao custo dessas matérias-primas oleaginosas (ANTOLIN et al., 2002).

3.2 Glicerol

O glicerol, 1,2,3-propanetriol, Figura 2, é um álcool que se apresenta como líquido viscoso, inodoro, incolor e com sabor doce. É abundante na natureza, em vegetais, sendo sua estrutura encontrada na forma de lipídeos. Também é largamente produzido em resposta à redução da atividade de água extracelular durante a regulação osmótica em leveduras (WANG et al., 2001), considerado um composto fundamental dentro do sistema metabólico de micro-organismos, onde atua como precursor de numerosos compostos, e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (LAGES, SILVA-GRAÇA e LUCAS, 1999).

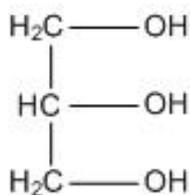


Figura 2: Fórmula estrutural do glicerol

O glicerol, na forma pura, possui inúmeras aplicações na indústria de alimentos, química e farmacêutica. Devido às características como não toxicidade e ausência de cor e odor, o glicerol apresenta uma ampla aplicação na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes e emolientes para cremes e pomadas, antibióticos e anti-sépticos, atua como umectante em pastas de dente, cremes de pele, loções pós-barba, desodorantes, batons e maquiagens. Na indústria de alimentos é utilizado em preparos de molhos, sobremesas geladas e como umectante, também para conservar bebidas e alimentos tais como refrigerantes, balas, bolos, pastas de queijo e carne, ração animal seca. Na indústria têxtil é utilizada para amaciar e flexibilizar as fibras, e na indústria de tintas para a produção de resinas ou como reticulante (FAIRBANKS, 2009; SILVEIRA, 2010; MORRISON, 1994).

Por outro lado o glicerol resultante da transesterificação de triglicerídeos para a produção de biodiesel apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que lhe conferem um baixo custo (RIVALDI et al., 2008). O uso intensivo deste co-produto é essencial para a sustentabilidade econômica da indústria de biodiesel no país. Além disso, o aumento da produção de biodiesel já apresenta grande impacto na redução de preço do glicerol refinado (EASTERLING et al., 2009).

A composição do glicerol bruto varia de acordo com a matéria-prima utilizada na produção do biodiesel e com os processos de produção (THOMPSON e HE, 2006). A Tabela 1 mostra alguns exemplos. Os processos para a purificação da glicerina incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para a remoção principalmente de K⁺ e Na⁺ utilizados como catalisadores (YONG et al., 2001). No entanto, os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando conseqüentemente os problemas e riscos ambientais (RIVALDI et al., 2008).

A possibilidade de purificação depende da disponibilidade de métodos viáveis e, geralmente, plantas de pequenos e médios portes não são capazes de purificar, com baixo custo, a glicerina destinada a aplicações mais nobres, como nas indústrias alimentícias, farmacêutica e de cosméticos (PACHAURI e HE, 2006). Algumas empresas

de biodiesel vendem a glicerina no mercado interno a preços que variam de 0,10 a 0,50 R\$/kg, outras indústrias a queimam para produzir energia e, em locais com alta concentração de indústrias de biodiesel, algumas empresas estocam o material, sem dar o destino específico ao mesmo (BATISTA, 2008). As indústrias produtoras de biodiesel, principalmente os pequenos produtores, não sabem o que fazer com este subproduto, e algumas plantas já estão tendo que diminuir a sua produção por não ter um destino pré-estabelecido para este resíduo (SILVEIRA, 2010).

Se o glicerol do biodiesel não for direcionado à mercados específicos, poderá causar efeitos mais drásticos nos preços e levar indústrias químicas a abandonar a produção de glicerol. Não há legislação específica no Brasil para o descarte da glicerina, sendo as duas formas de descarte possíveis: tanto a queima como o despejo nos rios. De um modo geral, essas duas formas de descarte geram problemas ambientais, uma vez que este resíduo apresenta alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e sua queima libera compostos carcinogênicos como a cloreína (BATISTA, 2009).

A rentabilidade de vários processos químicos depende em parte, da venda dos subprodutos, permitindo a redução dos custos de produção e conseqüentemente, do preço final do produto. Dessa forma, existe um grande interesse na purificação do glicerol ou no seu reaproveitamento direto, sem tratamento, o que proporcionará à viabilização do processo de produção de biodiesel, permitindo que este se torne competitivo no crescente mercado de biocombustíveis (RIVALDI et al., 2008).

O glicerol bruto contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que são factíveis de serem utilizados por micro-organismos para o seu crescimento durante processos fermentativos (THOMPSON e HE, 2006). A glicerina bruta apresenta impurezas inerentes a matéria-prima e geralmente contém em torno de 50% de glicerol (NAE, 2005).

A bioconversão do glicerol adiciona significativo valor à produtividade da indústria de biodiesel. Através deste papel, exemplos de possíveis processos de produção biotecnológica baseados em glicerol demonstram que esta é uma nova fonte de carbono abundante e promissora para a indústria microbiológica (SILVA, MACK e CONTIERO, 2009). A bioconversão de glicerol através de processos biotecnológicos em produtos de

maior valor agregado como biomassa e biomoléculas, é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel (ITO et al., 2005).

Tabela 1: Composição da glicerina proveniente da produção de biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas.

Composição (ppm)	Óleos utilizados na fabricação do biodiesel					Óleo de fritura
	Mostarda (Ida Gold)	Mostarda (Pac Gold)	Canola	Soja	Crambe	
Ca	11,7	23,0	19,7	11,0	163,3	nd
K	nd	nd	nd	nd	216,7	nd
Mg	3,9	6,6	5,4	6,8	126,7	0,4
P	25,3	48,0	58,7	53,0	136,7	12
S	21,0	16,0	14,0	nd	128,0	19
Na	1,17	1,23	1,07	1,2	1,10	1,4
Gorduras (%)	2,03	1,11	13,91	7,98	13,1	7,98
Proteínas (%)	0,14	0,18	0,06	0,05	0,44	0,23
Fonte de carbono (%)	82,8	83,8	75,2	76,2	78,6	26,9
Calorias (kJ/kg)	14,6	14,5	17,5	15,8	16,3	27,2
Cinzas (%)	2,80	1,90	0,65	2,73	0,25	5,5

nd: não detectado

Fonte: THOMPSON e HE, 2006.

3.3 Glicerol como Substrato em Cultivos Microbianos

Devido à ampla ocorrência do glicerol na natureza, muitos micro-organismos conhecidos podem utilizar naturalmente o glicerol como fonte de carbono e energia. Esses micro-organismos têm atraído atenção para potencial utilização na bioconversão da abundante quantidade de glicerol resultantes da produção de biodiesel (SILVA, MACK e CONTIERO, 2009). Com isso o glicerol pode substituir tradicionais carboidratos, tais como sacarose, glicose e amido, em processos fermentativos.

É significativo salientar que a glicerina é assimilada por algumas leveduras do gênero *Candida* e *Saccharomyces* e pela bactéria *Clostridium pasteurianum* (ARRUDA, RODRIGUES e FELIPE, 2006). De acordo com BABEL e HOFMANN (1982), cinquenta cepas de leveduras dos gêneros *Candida*, *Lodderomyces*, *Endomycopsis*,

Saccharomyces, *Hansenula*, *Pichia* e *Torulopsis* foram investigadas com respeito à sua capacidade de crescer em metanol, glicerol e glicose como únicas fontes de carbono e energia. CHI et al. (2007), estudaram a produção de ácido docosahexaenóico (DHA) da alga *Schizochytrium limacinum* SR21 utilizando o glicerol bruto obtido do biodiesel produzido a partir de óleo de soja, e obteve rendimento de 4,91 g/L com condições otimizadas.

A glicerina tem sido muito utilizada como substrato alternativo por vários micro-organismos para produção de metabólitos de interesse comercial, como 1,3 propanediol por *Clostridium butyricum* (PAPANIKOLAOU et al., 2008). Ácidos orgânicos como o ácido cítrico, têm sido produzidos por linhagens de leveduras utilizando também a glicerina como substrato (LEVINSON, KURTZMAN e KUO, 2007). A Tabela 2 apresenta exemplos de produtos obtidos a partir do glicerol por via biotecnológica.

Tabela 2: Produtos obtidos a partir do glicerol por via biotecnológica.

Produto	Referências
1,3 propanodiol	PAPANIKOLAOU et al., 2008; PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2003; XIU et al., 2004
Lipídeo	EASTERLING et al., 2009; MEESTERS, HUIJBERTS e EGGINK, 1996; PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002
Hidrogênio	ITO et al., 2005
Ácido cítrico	PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2003; LEVINSON, KURTZMAN e KUO, 2007
β -caroteno	MANTZOURIDOU, NAZIRI e TSIMIDOU, 2008

FAKAS et al. (2009), estudando o comportamento bioquímico dos fungos oleaginosos *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabelina* cultivados em glicerol bruto e puro não reportaram diferenças no acúmulo de lipídeos, crescimento celular e consumo de substrato por estes micro-organismos sob as duas fontes de carbono estudadas separadamente. Evidenciando que as impurezas do glicerol bruto não apresentaram nenhum impacto prejudicial no metabolismo destes micro-organismos. No entanto, em geral os estudos abordam a utilização de glicerol puro como substrato e não o subproduto da síntese do biodiesel (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002).

3.4 Lipídeos Microbianos

Lipídeos microbianos são considerados fontes alternativas de óleos e principalmente de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) que são compostos orgânicos alifáticos com função ácido e mais de uma dupla ligação na cadeia. Ácidos graxos de cadeia curta (C:14:0 e C12:0) e cadeia longa (C20:0 e C22:0) são produzidos em pequenas quantidades. Entre os PUFAs muitos são reconhecidos como essenciais na dieta normal para prevenção de doenças relacionadas à nutrição. Os principais PUFAs essenciais são o ácido linoléico, α -linolênico, γ -linolênico e araquidônico (ALONSO e MAROTO, 2000; CORDEIRO, 1997), que podem ser produzidos de forma microbiana.

O ácido γ -linolênico (C18:3, ω -6, GLA) é necessário para síntese do ácido araquidônico e prostaglandinas. Nos seres humanos, o GLA é sintetizado a partir do ácido linoléico proveniente da dieta, mas fontes extras desse ácido graxo são necessárias para compensar a deficiência da síntese induzida por doenças ou envelhecimento (DUBACQ e QUOC, 1993).

Os lipídeos desempenham papéis importantes como estruturais, de armazenamento e também são importantes intermediários metabólicos nos organismos oleaginosos (LEHNINGER, NELSON e COX, 1993). Os lipídeos são acumulados em quase todos os organismos eucarióticos em algum momento durante o ciclo vital. Em leveduras e bactérias, por exemplo, tem-se observado que o acúmulo de lipídeos ocorre quando o organismo está em condições de estresse (quando há alta relação carbono nitrogênio no meio de cultivo) (MURPHY, 1991).

O ácido docosahexaenóico (DHA) é um importante ácido graxo poliinsaturado (ω -3) produzido por micro-organismos e que vem sendo utilizado em medicamentos terapêuticos contra doenças cardiovasculares, câncer e Alzheimers, assim como outros ω -3 (SIMOPOULOS, 1999). Este ácido graxo é importante também para a formação do cérebro infantil (INNIS, 2007). Atualmente existe um aumento no interesse de utilizar estes ácidos graxos como suplemento na alimentação humana ou até ração animal. Mais de 90% das comidas infantis vendidas nos Estados Unidos são formulados e fortificados com ácidos graxos ω -3 (PYLE, 2008). GUTIERREZ e SILVA (1993) comentam que há necessidade de suplementação de ácidos graxos essenciais, como o

ácido linoléico, em alimentação animal e que leveduras podem constituir uma fonte importante de suplementação destes nutrientes em formulações de rações.

Lipídeos microbianos têm uma potencial aplicação no mercado de nutracêuticos, farmacêuticos e de ingredientes para alimentos (LEWIS, NICHOLS e MCMEEKIN, 2000). Estudos vêm sendo realizados para isolar estes lipídeos e otimizar sua produção por cepas oleaginosas, porém o alto custo de produção é a maior barreira para sua comercialização (RATLEDGE, 2004). Para a redução dos custos de produção, subprodutos baratos têm sido utilizados em cultivos (PENG e CHEN, 2008). Dois processos básicos vêm sendo desenvolvidos para produção de ácidos graxos: cultivo em estado sólido e submerso. Entretanto, devido a problemas técnicos tais como dificuldades de controle de contaminação e extração dos lipídeos, o cultivo em estado sólido tem recebido menos atenção que o cultivo submerso (ZHU, 2002).

3.5 Micro-organismos Produtores de Lipídeos

O acúmulo de óleos em micro-organismos ocorre principalmente em espécies de fungos, poucas bactérias produzem lipídeos capazes de serem extraídos com fins comestíveis. Algumas algas também foram identificadas como produtoras de altas quantidades de lipídeo (RATLEDGE, 2005).

Leveduras oleaginosas são micro-organismos unicelulares definidos por acumularem lipídeos atingindo valores acima de 20% do total de sua biomassa. Além dos lipídeos constituintes de sua membrana eles apresentam a capacidade de acumulá-los na forma de triacilgliceróis (TAG) (GILL, HALL e RATLEDGE, 1977). Lipídeos microbianos podem vir a contribuir para a produção de óleos, visto que em geral sua estrutura é similar aos óleos vegetais comuns. Além disso, os micro-organismos oleaginosos apresentam a capacidade de converter numerosos materiais brutos em produtos de maior valor (RATLEDGE, 1994).

A levedura *Yarrowia lipolytica* se mostrou promissora para a produção de lipídeos a partir de diversas fontes de carbono (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002). As leveduras *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cândida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Corynebacterium glutamicum* foram estudadas quanto à produção de lipídeos por CAZETTA e CELLIGOI (2005), sendo reportado um acúmulo de apenas 6% de lipídeos

na massa bacteriana; já as leveduras apresentaram mais que o dobro do acúmulo de lipídeos da bactéria.

EASTERLING et al. (2009), reportam acúmulo de 38% da biomassa em lipídeo para o cultivo da levedura *Rhodotorula glutinis* utilizando o glicerol como substrato, e o ácido graxo esteárico mostrou-se presente em maior porcentagem no estudo do perfil dos lipídeos produzidos, seguido por ácido palmítico, oléico e linoléico. Enquanto PAPANIKOLAOU et al. (2004), estudando o perfil de ácidos graxos no cultivo de *Mortierella isabellina* reportam o predomínio do ácido oléico, representando mais de 50% dos ácidos graxos presentes, seguido pelo ácido palmítico e linoléico.

Na seleção de cepas de leveduras a *Rhodosporidium toruloides* se destacou pelo seu grande crescimento celular com acúmulo de alto conteúdo de lipídeos utilizando glicose como fonte de carbono em meio com nitrogênio limitante; com condições de cultivo otimizadas a levedura acumulou mais de 60% de lipídeos baseados na massa seca (MA et al., 2008). A produção de lipídeos pela levedura *Rhodosporidium toluroides* Y4 também foi reportada por LI, ZHAO e BAI (2007).

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

ZHU, ZONG e WU (2008) estudaram os efeitos dos componentes do meio e das condições de cultivo na produção de biomassa e lipídeos por *Trichosporon fermentans*. Ao otimizar as condições de pH em 6,5 e 25°C obtiveram 28,1 g/L de biomassa e 62,4% de lipídeos em sete dias de cultivo em melaço. Similar aos óleos vegetais o perfil de lipídeos obtidos foi na maioria ácido palmítico, esteárico, oléico e linoléico, sendo em torno de 64% de ácidos graxos insaturados.

Muitas substâncias hidrofóbicas têm sido utilizadas como substrato para a produção de lipídeo microbiano, tais como óleos vegetais (AGGELIS e SOURDIS, 1997),

óleos brutos (FÜCHTENBUCH, WULLBRANDT e STEINBÜCHEL, 2000), sabão (MONTET et al., 1985) e gordura animal que é um subproduto de frigoríficos e foi investigada por PAPANIKOLAOU et al. (2002), para a produção de lipídeos por *Yarrowia lipolytica* valorizando este subproduto industrial.

A demanda por óleos e gorduras vem aumentando tanto para a indústria de alimentos quanto para propósitos não comestíveis. O interesse em micro-organismos produtores de lipídeos como substituintes para a gordura de origem animal e vegetal resulta em numerosas investigações, uma vez que lipídeos de micro-organismos têm importantes características. Estes micro-organismos podem crescer razoavelmente bem em substratos de baixo custo como subprodutos da indústria de alimentos e agroindústria (CORDEIRO, 1997). Segundo MEESTERS, HUIJBERTS e EGGINK (1996) leveduras oleaginosas apresentam habilidade de crescer em glicerol com um curto período de geração e pouca exigência de nutrientes.

3.6 Produção de Lipídeos por Leveduras do Gênero *Candida*

O acúmulo de lipídeos por *Candida* sp. 107 foi estudado em função da natureza do nutriente limitante: nitrogênio, carbono, fósforo e magnésio atingindo o maior conteúdo lipídico de 37% para o nitrogênio. A limitação por nitrogênio é mais comumente utilizada para induzir o acúmulo de lipídeos e resultou em um maior rendimento de conversão atingindo 22%, utilizando glicose como substrato (GILL e RATLEDGE, 1972).

EVANS e RATLEDGE (1983) estudando o acúmulo de lipídeos por *Candida curvata* em meio contendo xilose como fonte de carbono e nitrogênio limitante obtiveram um conteúdo lipídico de 49% (m/m). CAZETTA e CELLIGOI (2005) estudaram a produção de lipídeos por *Candida lipolytica* em meios contendo vinhaça e melaço e relatam 21,16 e 25,59% de conteúdo lipídico, respectivamente.

CORDEIRO (1997) isolou de amostras de vísceras de peixe de água salgada sendo selecionada para a produção de lipídeos e identificada uma das cepas por *Candida fabianii* apresentando 1,60% de conteúdo lipídico.

3.7 Biossíntese de Lipídeos

Muitos fatores incluindo componentes do meio, tais como fonte carbono, fonte de nitrogênio e relação C/N, bem como as condições de cultivo (temperatura e pH) apresentam influência no crescimento celular e no acúmulo de lipídeos por micro-organismos oleaginosos (PAPANIKOLAOU et al., 2007).

O típico perfil de acúmulo de lipídeos em micro-organismos oleaginosos ocorre somente quando o nitrogênio é esgotado do meio. Este deve ser formulado com uma relação C/N de forma a garantir que o nitrogênio seja todo consumido enquanto outros nutrientes, incluindo o carbono permaneçam em excesso no meio de cultivo. A relação C/N mais adequada na maioria dos processos compreende a faixa de 40 a 50, embora a relação ótima necessária possa ser determinada para cada tipo de micro-organismo (RATLEDGE, 2005). A limitação de nitrogênio tem sido bastante utilizada para criar um ambiente que conduza o armazenamento de lipídeos (MEESTERS, HUIJBERTS e EGGINK, 1996).

FAKAS et al. (2009), estudando o comportamento bioquímico dos fungos oleaginosos *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabelina* cultivados em glicerol bruto e puro observaram que após aproximadamente 50 horas de inoculação, a fonte de nitrogênio foi consumida do meio de cultivo, o que levou ao aumento da produção de lipídeos e também que a altas relações C/N. O acúmulo de lipídeos foi mais elevado atingindo 53,2% (3,3 g/L) a uma relação C/N de 285 e em 264 horas de fermentação com a levedura *Mortierella isabelina*.

Durante a produção celular a concentração de nitrogênio e carbono é mantida na mesma proporção no meio de cultivo, esta fase de comportamento balanceado de crescimento continua até a máxima densidade celular que é alcançada antes da fase de início do acúmulo de lipídeos (RATLEDGE, 2005). Os lipídeos intracelulares são produtos que estão disponíveis em uma grande quantidade de células microbianas e que podem chegar até 65% da biomassa seca em algumas espécies de leveduras (CORDEIRO, 1997).

Em geral, o glicerol sofre a ação das enzimas glicerol quinase e glicerol-3-fosfato dehidrogenase. O produto formado pela primeira, glicerol-3-fosfato, pode ser utilizado

como precursor para a biossíntese de lipídeo ou para a conversão em dihidroxiacetona fosfato que pode também ser transformado a glicerol-3-fosfato pela enzima triose fosfato isomerase no centro da via metabólica ou pode servir como substrato para a síntese de outros metabólitos. Através dessas reações forma-se o piruvato que é então convertido a acetil-Coa, que unida ao oxaloacetato produz malonil-Coa e, em seguida, ácido graxo, um dos precursores para a síntese de lipídeos (WANG et al., 2001). A Figura 3 mostra o esquema da via de degradação do glicerol.

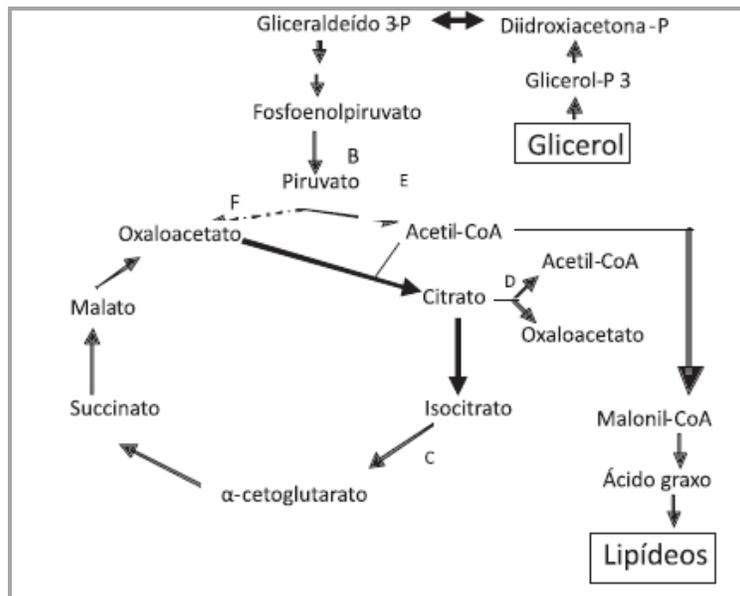


Figura 3: Esquema da via de degradação do glicerol para formação de lipídeo.

3.8 Leveduras Silvestres

Estima-se que menos de 5% dos micro-organismos existentes na Terra, tenham sido descritos. Isso porque os esforços dos centros de pesquisa estão focados principalmente nos macro-organismos, resultando no conhecimento de 80 a 90% destes seres. No entanto os micro-organismos, mesmo exercendo funções vitais nos ecossistemas e na biosfera em geral foram pouco estudados, tanto devido à falta de interesse quanto à dificuldade na pesquisa destes seres invisíveis a olho nu (HERNALSTEENS, 2006).

É importante notar também os imensos avanços científicos e econômicos obtidos a partir de estudos de micro-organismos, resultando não somente na biotecnologia

moderna, como em melhorias na qualidade de vida dos seres humanos. Com o advento da biologia molecular e outras técnicas avançadas de estudo de micro-organismos, a atenção dos pesquisadores está se voltando para estes organismos. Estas pesquisas estão começando a dar uma idéia da grandeza deste mundo desconhecido, sabendo-se que sua diversidade fisiológica, metabólica e genética não encontra paralelo em nenhuma outra classe de seres vivos (HAWKSWORTH, 2002).

O Brasil tem uma área de 8,5 milhões de quilômetros quadrados, possuindo várias zonas climáticas que incluem o trópico úmido, o semi-árido e áreas temperadas. As diferenças climáticas contribuem para as diferenças ecológicas formando zonas biogeográficas distintas (biomas). A variedade de biomas reflete a riqueza da flora e fauna brasileira, tornando-as as mais diversas do mundo (HERNALSTEENS, 2006). Estima-se que o Brasil detenha cerca de 20% da biodiversidade mundial (ZANOTTO et al., 2007).

Ambientes tropicais estão entre uma das grandes fontes de diversos tipos de organismos vivos, incluindo leveduras (fungos unicelulares), com distribuição em quase todos os ecossistemas. O Brasil apresenta quatro regiões de grande biodiversidade: Floresta Amazônica, Floresta Atlântica (que se estende por toda a costa brasileira mostrando a diversidade e um exemplo da mistura de vegetação), Cerrado e Pantanal (o mais úmido do mundo) (MAUGERI e HERNALSTEENS, 2007).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP. AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>, acessada em novembro 2010.

AGGELIS, G.; SOURDIS, J. Prediction of lipid accumulation-degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 72, p. 159-165, 1997.

ALONSO, D.; MAROTO, F. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 481-497, 2000.

ANTOLIN, G.; TINAUT, F.V.; BRICENO, Y.; CASTANO, V.; RAMIEZ, A.I. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 111-114, 2002.

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

BABEL, W.; HOFMANN, K. H. The relation between the assimilation of methanol and glycerol in yeasts. **Archives of Microbiology**, v. 132, p. 179-184, 1982.

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

BATISTA, F. Brasil não tem destino certo para glicerina gerada por biodiesel. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/brasil-destino-certo-glicerina-gerada-biodiesel-05-06-07.htm>, acessado em novembro de 2009.

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

BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ, K. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: A case study in Turkey. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, p. 372-396, 2008.

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

BOURNAY, L.; CASANAVE, D.; DELFORT, B.; HILLION, G.; CHODORGE, J. A. New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. **Catalysis Today**, v. 106, p. 190-192, 2005.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

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

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1537-1545, 2007.

CORDEIRO, E. F. Efeito das condições de cultivo na composição de ácidos graxos produzidos pelas leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae*. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1997.

DUBACQ, J. P.; QUOC, K. P. Biotechnology of *Spirulina* lipids: a source of gamma-linolenic acid. In: *Spiruline*, algue de vie. **Bulletin de l'Institut Océanographique**, v. 12, p. 59-64, 1993.

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

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, v. 18, p. 9-9, 1983.

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

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

FÜCHTENBUSCH, B.; WULLBRANDT, D.; STEINBÜCHEL, A. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 167-172, 2000.

GILL, C. O., RATLEDGE C. Effect of n-alkanes on the transport of glucose in *Candida* sp. strain 107. **Biochemical Journal**, v.127, p. 59-60, 1972.

GILL, C.O.; HALL, M.J.; RATLEDGE, C. Lipid accumulation in oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in a single stage continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, p. 235-239, 1977.

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

HAWKSWORTH, D.I. (2002) Why study tropical fungi? In: WATLING, R.; FRANKLAND, M.; AINSWORTH, A. M.; ISAAC, S.; ROBINSON, C. H. **Tropical mycology vol.2: Micromycetes**, Cambridge: Cabi Publishing.

HERNALSTEENS, S. Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2006.

HERNALSTEENS, S.; MAUGERI, F. Synthesis of fructooligosaccharides using extracellular enzymes from *Rhodotorula* sp. **Journal of Food Biochemistry**, v.34, p. 520-534, 2010.

INNIS, S.M. Fatty acids and early human development. **Early Human Development**, v. 83, p. 761-766, 2007.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 260-265, 2005.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, v. 145, p. 2577-2585, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (1993). Principles of biochemistry (2nd ed.). New York, NY: Worth.

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

LEWIS. T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, p. 107-116, 2000.

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

MA, B.; LI, Q.; NIWA, T.; OURA T.; DU, W.; LIU, D.; KAJIWARA, S. Improvement of lipid accumulation in an oleaginous yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 136 p. 402-459, 2008.

MANTZOURIDOU, F.; NAZIRI, E.; TSIMIDOU, M. Z. Industrial Glycerol as a Supplementary Carbon Source in the Production of β -Carotene by *Blakeslea trispora*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2668-2675, 2008.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production. **Fuel Processing Technology**, v. 89, p. 740-748, 2008.

MAUGERI, F.; HERNALSTEENS, S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 43-49, 2007.

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

MONTET, D.; RATOMAHENINA, R.; GALZY, P.; PINA, M.; GRAILLE, J. A study of the influence of the growth media on the fatty acid composition in *Candida lipolytica* DIDDENS and LODDER. **Biotechnology Letters**, v. 7, p. 733-736, 1985.

MORRISON, L. R. Glycerol. In: Encyclopedia of Chemical Technology, New York: Wiley, 1994, v.11, p. 921-932.

MURPHY, D. Storage lipid bodies in plants and other organisms. **Progress in Lipid Research**, v. 29, p. 299-324, 1991.

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

NAE (Núcleos de Assuntos Estratégicos da Presidência da República). Glicerol: mercados e perspectivas. In: Biocombustíveis, 2005, p. 105-106.

PACHAURI, N.; HE, B. Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities. In: ASABE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, 2006, Portland, Oregon. p. 9-12.

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

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

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 5, p. 542-547, 2003.

PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 287-291, 2004.

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

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

PENG, X., CHEN, H. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3885-3889, 2008.

PYLE, D. J. Use of biodiesel-derived crude glycerol for the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids by the microalga *Schizochytrium limacinum*. Thesis (Master of Science in Biological Systems Engineering) Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, 2008.

RATLEDGE, C. 1994. Yeasts moulds algae and bacteria as sources of lipids. In: Kamel, B.S., Kakuda, Y. (Eds.), *Technological Advances in Improved and Alternatives Sources of Lipids*. Blackie academic and professional, London, p. 235-291.

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

RATLEDGE, C.; COHEN, Z. 2005. *Single Cell Oils*. AOCS Press, Illinois Champaign (Eds), USA, p. 2-3.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel - Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 37, p. 44-51, 2008.

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

SILVEIRA, L. Glicerina gerada na produção do biodiesel terá novos usos. Biodieselbr online. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com>, acessado em dezembro de 2010.

SIMOPOULOS, A.P. Essential Fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, p. 560-569, 1999.

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

XIU, Z. L.; SONG, B. H.; WANG, Z. T.; SUN, L. H.; FENG, E. M.; ZENG, A. P. Optimization of dissimilation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* in one and two-stage anaerobic cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v.19, p. 189-197, 2004.

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

ZANOTTO, S. P.; LISBÔA, L. U. S.; NASCIMENTO, M. G.; CAVALLAZZI, J. R. P.; MARTINS, M. K.; PEREIRA, J. O. Seleção de fungos isolados de plantas da região

amazônica, fornecedores de lipases para biotransformações. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007.

ZHU, H. Utilization of rice bran by *Pythium irregular* for lipid production. Thesis (Master of Science in Biological and Agricultural Engineering) Louisiana State University, 2002.

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

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

CAPÍTULO II

SELEÇÃO DE LEVEDURAS SILVESTRES OLEAGINOSAS CULTIVADAS EM GLICEROL PURO E GLICEROL DO BIODIESEL

Susan Hartwig Duarte e Francisco Maugeri Filho

RESUMO

A atual preocupação relacionada ao aquecimento global e a escassez de petróleo, ocasionou o aumento da produção de biodiesel. No processo de síntese deste biocombustível são gerados cerca de 10% de glicerol com baixo valor agregado devido a sua impureza. Visando encontrar um destino para este co-produto o presente trabalho visou selecionar leveduras silvestres, isoladas de diversos ambientes naturais brasileiros, com potencial para converter glicerol em lipídeo microbiano e investigou-se a capacidade das leveduras selecionadas em metabolizar o glicerol gerado na síntese do biodiesel. Cinco cepas oleaginosas mais promissoras foram selecionadas pela técnica de coloração com Sudan Black B: LEB-M3, LEB-AAN1, LEB-AQ5, LEB-AAI4 e LEB-AJ10, que foram posteriormente cultivadas em dois diferentes meios de cultivos submersos com glicerol puro ou glicerol de biodiesel. A cepa LEB-M3, isolada do Pantanal, atingiu em 192 horas de cultivo $11,86 \pm 0,08$ e $16,12 \pm 0,91$ g/L de biomassa e rendimentos de lipídeos de $7,57 \pm 0,19$ e $33,67 \pm 4,67\%$ utilizando glicerol puro e glicerol bruto, respectivamente. Esta cepa foi identificada como *Candida sp.* e apresentou um conteúdo de lipídeos de $56,58 \pm 5,62\%$ em relação a massa celular (base seca) para o cultivo em glicerol do biodiesel, destacando-se com um perfil de ácidos graxos poliinsaturados de 8,90% de ácido linoléico (C18:2) e 57,35% de ácido oléico (C18:1) para o cultivo em glicerol puro e para o cultivo em glicerol do biodiesel 46,0% de ácido linoléico 33,6% de ácido oléico.

Palavras-chave: glicerol, biodiesel, lipídeos, ácidos graxos, Sudan Black B.

1. INTRODUÇÃO

Devido aos problemas ambientais e reserva limitada de petróleo no mundo, se torna cada vez mais difícil e arriscado explorar os combustíveis fósseis. Atualmente estes problemas têm se tornado mais intensos e a preocupação com a redução da poluição e a crise energética estimulou o mercado mundial de biocombustíveis, com isso a demanda por energia limpa e recursos renováveis encontra-se em contínuo aumento (BILGEN et al., 2008).

O biodiesel é uma das alternativas de biocombustível que apresenta características físicas semelhantes às do óleo diesel, podendo ser utilizado em motores do ciclo diesel sem nenhuma adaptação (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004). Este biocombustível é obtido a partir de matérias-primas ricas em ácidos graxos através da reação de transesterificação, de óleo vegetal ou gordura animal, com álcool, na presença de catalisadores (BORSCHIVER, 2006).

A produção de biodiesel encontra-se acelerada, uma vez que o governo brasileiro estabeleceu a obrigatoriedade, desde julho de 2008, da adição de um percentual mínimo de 2% de biodiesel (B2) ao óleo diesel comercializado em qualquer parte do território nacional, mediante a lei 11097/2005. A quantidade de biodiesel a ser adicionado ao diesel foi aumentada para 5% (B5) do volume total de diesel, no ano de 2010 (ANP, 2010). A previsão é de que o Brasil produza ao final do ano de 2010, 267 milhões de litros de glicerina (BIODIESEL BR, 2010).

A produção de 10 kg de biodiesel de óleo vegetal gera cerca de 1 kg de glicerina bruta (MEESTERS, HUIJBERTS e EGGINK, 1996), ou seja, o glicerol é o principal co-produto gerado no processo, correspondendo a aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido (EASTERLING et al., 2009), o qual é impuro e de baixo valor econômico (CHI et al., 2007). Uma vez que os mercados tradicionais não conseguirão absorver a nova oferta deste produto, alternativas de aproveitamento do glicerol tornam-se necessárias, entre elas a exploração visando sua bioconversão em produtos de alto valor agregado através de processos fermentativos utilizando micro-organismos capazes de metabolizar o glicerol (SILVA, MACK e CONTIERO, 2009).

Lipídeos microbianos são produzidos por micro-organismos oleaginosos que apresentam a habilidade de acumular mais de 20% de sua biomassa em lipídeos. Esses micro-organismos podem transformar diversos substratos em lipídeos intracelulares, que podem ser utilizados como matéria-prima na produção de biodiesel (MA et al., 2008).

A utilização de novas fontes de lipídeos para a produção de biodiesel é interessante principalmente quando é produzido por micro-organismos, que oferecem muitas vantagens por apresentarem lipídeos com estrutura e composição similar aos óleos vegetais comuns (RATLEDGE, 2004), além de fornecerem um menor custo de produção. A composição química do biodiesel obtido por transesterificação de lipídeos microbianos é similar à composição do biodiesel de óleo vegetal, matéria-prima comumente utilizada (DAI et al., 2007).

Cada vez mais pesquisas estão sendo realizadas para a produção de biodiesel a partir de algas e leveduras oleaginosas obtendo resultados satisfatórios e estimulando novos estudos (MIAO e WU, 2006; DAI et al., 2007; LIU e ZHAO, 2007; VIJAYARAGHAVAN e HEMANATHAN, 2009). Tendo em vista o exposto acima este trabalho visou selecionar uma levedura silvestre oleaginosa capaz de utilizar o co-produto da produção do biodiesel para a produção de lipídeos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

Neste estudo foram utilizadas 129 leveduras silvestres isoladas por HERNALSTEENS, (2006) de amostras de solo, caules, frutos e flores coletadas em diversas regiões brasileiras: Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Floresta Amazônica, conforme Tabela 1. As culturas permaneceram armazenadas a 5°C em tubos inclinados contendo o meio GYMP composto por (g/L): 20,0 glicose; 5,0 extrato de levedura; 10,0 extrato de malte; 2,0 KH_2PO_4 ; 20,0 ágar, pH 5,5.

Tabela 1: Regiões de coleta das leveduras utilizadas para *screening*, isoladas por (MAUGERI e HERNALSTEENS, 2007).

Região	Vegetação de isolamento
Mata Atlântica (SP)	I- Litorânea II- Serra do Mar
Cerrado (GO)	“Chapada dos Veadeiros”
Pantanal (MT)	Ciliar e de várzeas do Rio Paraguai
Floresta Amazônica (AM)	Manaus

2.2 Glicerol

Como fonte de carbono foram utilizados nos experimentos glicerol comercial (Sinthy) e glicerol bruto, co-produto da síntese de biodiesel, contendo 42,4% (m/v) de glicerol, obtido através da transesterificação de óleo de soja com metanol, sem nenhum tratamento prévio, sendo gentilmente fornecido pela empresa SP-BIO (Sumaré-SP). A quantidade a ser adicionada de glicerol bruto no meio de cultivo foi determinada considerando-se calcular a concentração desejada do substrato.

2.3 Pré-seleção de Leveduras Oleaginosas

A pré-seleção das cepas de leveduras com potencial capacidade de assimilar o glicerol e acumular lipídeos foi detectada através da técnica de Sudan Black B. Os microorganismos foram inoculados em placas de Petri com meio de cultivo proposto por EVANS e RATLEDGE (1983) composto por (g/L): 30,0 glicerol P.A.; 7,0 KH_2PO_4 ; 2,0 Na_2HPO_4 ; 1,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 CaCl_2 ; 0,08 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,02 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8 extrato de levedura, pH 5,5; utilizando glicerol puro como fonte de carbono no preparo do meio, acrescidos com 2% de ágar. As placas foram incubadas por 96 horas a 30 °C até que as colônias atingissem aproximadamente 2-3 mm de diâmetro.

A partir das colônias das placas de Petri, foi realizada uma réplica de impressão em papel filtro Whatman nº1 e com a utilização da solução Sudan Black B, foi possível definir através da cor formada no papel, as leveduras que acumularam mais lipídeos, sendo que estas apresentaram tom de cor azulado típico de leveduras oleaginosas (EVANS, RATLEDGE e GILBERT, 1985). Com as cepas selecionadas foi realizada uma

nova triplicata do método para confirmação dos resultados e seleção do micro-organismo mais promissor.

2.4 Seleção de Leveduras Oleaginosas em Cultivos Submersos

As leveduras selecionadas como potenciais produtoras de lipídeos foram cultivadas em meio contendo glicerol puro e bruto acompanhando-se a cinética de crescimento celular e consumo de glicerol ao longo dos cultivos e a produção de lipídeos ao término do processo.

2.4.1 Preparo do Inóculo

As leveduras armazenadas a 5°C foram reativadas em ágar inclinado GYMP até desenvolvimento das colônias. Posteriormente dois tubos de cada cultura microbiana reativada foram raspados com 10 mL de água peptonada 0,1%, para remoção das células do micro-organismo e transferência para frascos Erlenmeyers contendo 180 mL de meio de cultivo. O meio de cultivo utilizado para obtenção do inóculo foi proposto por PAPANIKOLAOU e AGGELIS (2002) composto por (g/L): 30 glicerol; 7,0 KH₂PO₄; 2,5 Na₂HPO₄; 1,5 MgSO₄.7H₂O; 0,15 CaCl₂; 0,15 FeCl₃.6H₂O; 0,02 ZnSO₄.7H₂O; 0,06 MnSO₄.H₂O; 0,5 (NH₄)₂SO₄; 0,5 extrato de levedura, pH 6,0. O inóculo foi cultivado a 28°C em frascos agitados a 185 rpm, a concentração celular foi acompanhada por contagem em câmara de Neubauer até atingir aproximadamente 1x10⁸ células/mL.

2.4.2 Cultivos em Frascos Agitados

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultivo composto por (g/L): 30 glicerol; 7 KH₂PO₄; 2,5 Na₂HPO₄; 1,5 MgSO₄.7H₂O; 0,15 CaCl₂; 0,15 FeCl₃.6H₂O; 0,02 ZnSO₄.7H₂O; 0,06 MnSO₄.H₂O; 0,5 (NH₄)₂SO₄; 0,5 extrato de levedura, pH 6,0 (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002). Os frascos foram inoculados com 10% v/v de inóculo ao meio de cultivo, sendo mantidos em agitador rotatório a 28°C e 185 rpm, com retiradas de amostras em tempos pré-estabelecidos. Os ensaios foram realizados em triplicata, para tratamento dos dados por análise de variância e teste de Tukey, a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as leveduras estudadas, e entre os dois tipos de glicerol, a 95% de confiança (p ≤ 0,05), selecionando desta forma a levedura e o substrato mais promissor para a produção de lipídeos.

2.5 Identificação da Levedura

A caracterização genotípica do micro-organismo foi realizada pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 do gene codificador da subunidade 26S do DNA ribossômico. Uma colônia isolada do micro-organismo LEB-M3 foi repicada em 40 mL de caldo YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose, pH 6,0) e crescida sob agitação, por 16h a 30°C. O DNA foi extraído com clorofórmio: fenol: álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com acetato de sódio 3 M e etanol absoluto (AUSUBEL, 1998). Após extração, o DNA foi congelado a -20°C e enviado ao Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foi amplificado e sequenciado. As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com as sequências depositadas no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

2.6 Metodologia Analítica

2.6.1 Crescimento Celular

As amostras foram centrifugadas a 785 x g e as células lavadas duas vezes com água. Posteriormente suspendeu-se as células em volume de água que resultasse na leitura espectrofotométrica dentro da faixa de leitura do espectrofotômetro (0,2-0,8) e leu-se a 600nm. Converteu-se o valor de absorbância em concentração (g/L) através de uma curva padrão de biomassa baseado no método descrito por LONGHI et al., (2004).

2.6.2 Determinação da Concentração de Glicerol

As amostras foram previamente diluídas e filtradas a 0,22 µm. A análise de glicerol foi realizada em HPLC utilizando-se uma coluna HPX-87H, fase móvel de H₂SO₄ 0,005 N pH 2,6. Utilizou-se 20 µL de amostra, fluxo de 0,6 mL/min e a detecção foi feita por índice de refração. Para a quantificação da amostra foi construída uma curva padrão com glicerol P.A.

2.6.3 Determinação de Lipídeos

A concentração de lipídeos foi realizada através do método BLIGH e DYER (1959), com modificações. A biomassa seca foi primeiramente tratada com solução de HCl 2M para rompimento da parede celular, posteriormente foi centrifugada a 785 x g e

descartado o sobrenadante. A biomassa foi misturada com metanol, clorofórmio e água para a extração dos lipídeos, seguidos de centrifugação a 785 x g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido para a extração dos lipídeos remanescentes na amostra. Com a mistura formaram-se três fases onde os lipídeos encontravam-se na fase inferior dissolvidos em clorofórmio que foi evaporado e os lipídeos medidos em peso seco.

As respostas para a produção de lipídeos foram calculadas em termos de conteúdo lipídico (g de lipídeo/ 100g de biomassa), concentração de lipídeos (g/L) e rendimento de lipídeo (g lipídeo/g de glicerol inicial x 100).

2.6.4 Determinação dos Ácidos Graxos

Para determinação de ácidos graxos, a fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil-ésteres dos ácidos graxos, segundo metodologia proposta por METCALFE, SCHMITZ e PELKA (1966), com modificações.

A identificação e quantificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (GC/FID), em cromatógrafo a gás Varian com injeção manual de 1 µL e detector por ionização em chama (FID). A coluna cromatográfica utilizada foi uma Carbowax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições de temperatura da análise foram injetor 230 °C, detector 250 °C, temperatura inicial da coluna 140 °C, 140 °C por 20 min, 2,5 °C/min até 220 °C e 10 min em 220 °C. Vazão do gás de arraste (N₂) de 1,6 mL/min, razão de *split* 1:100; vazão dos gases no detector: 30/30/300 N₂/H₂/ar sintético. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação direta dos tempos de retenção com padrões (Sigma-Aldrich), e quantificados por normalização de áreas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pré-seleção de Leveduras Oleaginosas

Das 129 leveduras estudadas na primeira etapa, selecionaram-se 42 leveduras, entre os três ecossistemas estudados, totalizando 32,5% dos micro-organismos. Na segunda etapa, os micro-organismos pré-selecionados, foram novamente estudados, em triplicata, a fim de comparar quantitativa e qualitativamente as leveduras que apresentaram coloração azul, selecionando assim aquelas mais promissoras para a produção de lipídeos, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Desempenho dos micro-organismos das diferentes regiões quanto à coloração.

Região	Total	Coloriu	Não Coloriu
Mata Atlântica I	40	5	35
Mata Atlântica II	23	6	17
Cerrado	47	19	28
Pantanal	12	6	6
Floresta Amazônica	7	6	1
Total	129	42	87

Embora essa técnica não permita uma visão precisa do conteúdo celular lipídico, fornece parcialmente as informações sobre a capacidade de acúmulo lipídico das leveduras testadas. Essas leveduras foram caracterizadas quanto a intensidade da cor, conforme apresenta a Tabela 3.

Tabela 3: Análise qualitativa* em leveduras através de coloração com Sudan Black B.

Micro-organismo	Coloração azul (média)	Intensidade da cor
LEB-M3 (PA)	17	+++ / +++ / +++
LEB-AQ5 (FA)	16	++ / +++ / +++
LEB-AJ10 (FA)	20	++ / +++ / +++
LEB-AAN1 (CER)	14	++ / ++ / +++
LEB-AAI4 (CER)	20	+++ / +++ / +

*As diferentes intensidades de coloração das colônias foram indicadas de maneira qualitativa por: + fraco; ++ médio; +++ forte para cada uma das triplicatas. PA-Pantanal, FA-Floresta Amazônica, CER-Cerrado.

De acordo com os resultados da Tabela 3 é possível observar que existe uma distribuição de micro-organismos com características de organismo oleaginoso no ecossistema brasileiro, destacando-se as leveduras isoladas do Cerrado, Floresta Amazônica e Pantanal. Estudos de isolamento e seleção de micro-organismos, presentes em ambientes naturais, com potencial para produção de lipídeos vêm sendo realizados. DAI et al. (2007) isolaram leveduras de flores coletadas na China e selecionaram, utilizando Sudan Black B, oito que apresentavam potencial para produzir lipídeos, estudando a xilose como substrato. CORDEIRO, (1997), isolou 625 micro-organismos de vísceras de peixe de água salgada para estudo da produção de lipídeos.

5.2 Seleção de Leveduras Oleaginosas em Cultivos Submersos

A Figura 1 apresenta a cinética do crescimento celular e o consumo de glicerol ao longo do cultivo das leveduras LEB-M3, LEB-AAN1, LEB-AQ5, LEB-AAI4 e LEB-AJ10 em meio contendo glicerol puro e bruto.

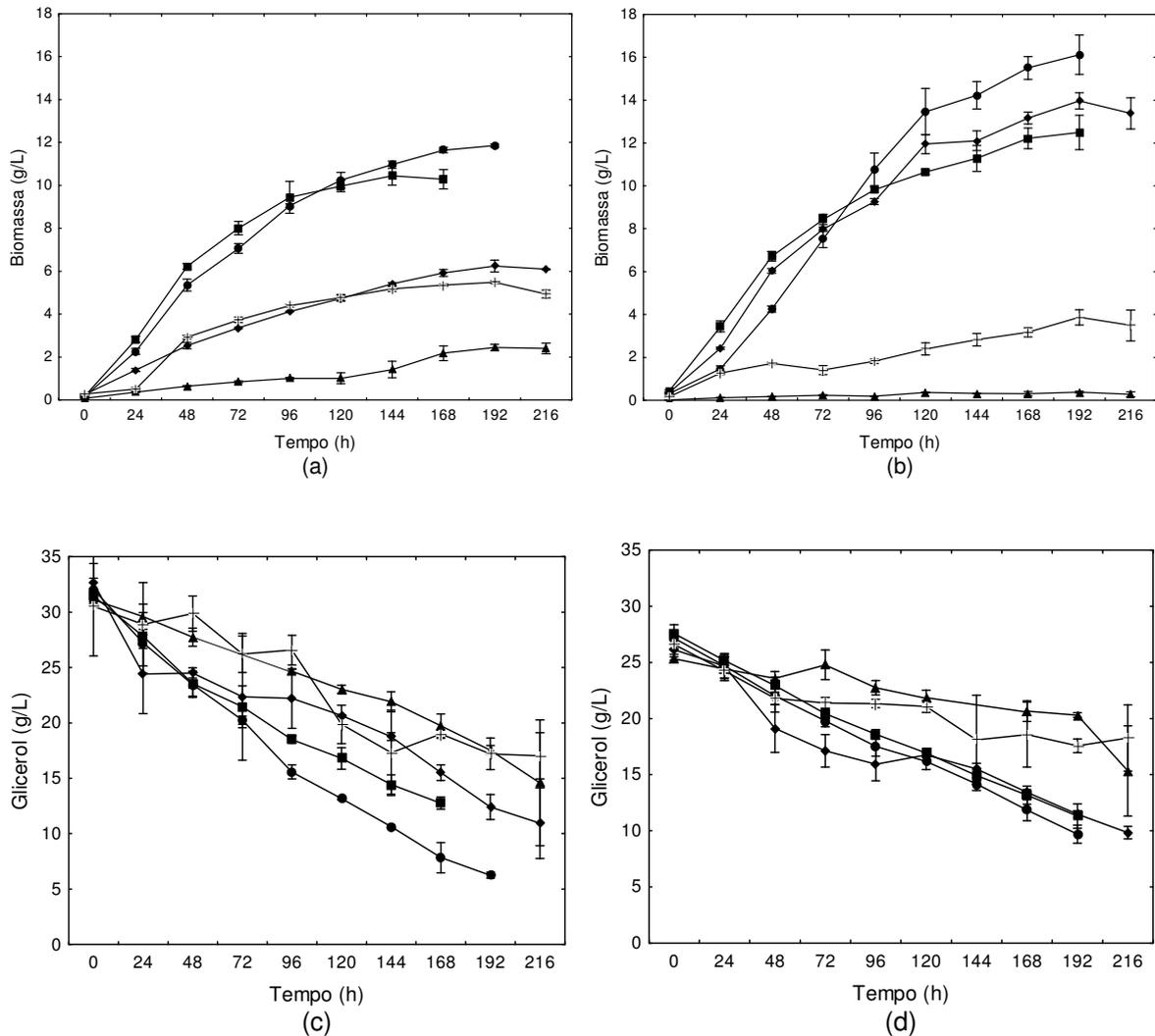


Figura 1: Crescimento celular das leveduras em glicerol (a) puro e (b) bruto, consumo de glicerol das leveduras em glicerol (c) puro e (d) bruto para (●) LEB-M3, (■) LEB-AAN1, (◆) LEB-AQ5, (+) LEB-AAI4 e (▲) LEB-AJ10 ao longo do cultivo.

Através da Figura 1 (a) e (b) verifica-se que os dois substratos utilizados possibilitaram o crescimento celular ao longo do cultivo, atingindo o estado estacionário, para a maioria das leveduras, em torno de 144 e 168 horas de cultivo para o glicerol puro e 168 e 192 horas no cultivo em glicerol bruto, mostrando também que ao utilizar meio contendo glicerol bruto ocorreu maior multiplicação celular para a maioria das leveduras estudadas. Este resultado pode estar relacionado principalmente com as impurezas presentes no co-produto do biodiesel tais como elementos nutricionais que são utilizados por micro-organismos durante o processo fermentativo como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio, sódio e ácidos graxos livres (THOMPSON e HE, 2006).

Observa-se que a cepa LEB-M3 destacou-se das demais atingindo $11,86 \pm 0,08$ e $16,12 \pm 0,91$ g/L de biomassa durante 192 horas de cultivo, para o glicerol puro e bruto, respectivamente. A cepa LEB-AJ10 foi a que menos cresceu e se adaptou ao meio de cultivo sendo possivelmente inibida pelas impurezas presentes no co-produto industrial atingindo $2,41 \pm 0,24$ e $0,27 \pm 0,11$ g/L de biomassa para o glicerol puro e bruto, respectivamente, em 216 horas de cultivo.

O crescimento celular não foi inibido mesmo com o aumento das concentrações iniciais de glicerol industrial no cultivo de *Yarrowia lipolytica* em estudo realizado por PAPANIKOLAOU e AGGELIS, (2002). Porém em outro estudo similar a levedura *Cryptococcus curvatus* apresentou crescimento celular restrito quando as concentrações de glicerol foram superiores a 64 g/L (MEESTERS, HUIJBERTS e EGGINK, 1996). Diferentes tolerâncias ao glicerol bruto têm sido observadas durante o crescimento de várias bactérias em altas concentrações deste substrato (PAPANIKOLAOU et al., 2000; WITTLICH, THEMANN e VORLOP, 2001).

CHI et al. (2007), ao estudarem glicerol puro e glicerol bruto para o cultivo da alga *Schizochytrium limacinum* obtiveram maior crescimento celular no meio contendo glicerol bruto. Segundo o autor a alta biomassa obtida comparando-se o glicerol bruto ao puro pode ter ocorrido devido ao sabão residual contido no glicerol do biodiesel indicando que este pode ser benéfico para o crescimento celular.

Através da Figura 1 (c) e (d) verifica-se que o consumo de glicerol aumentou ao longo do cultivo e o consumo foi pouco mais acentuado para o glicerol puro. A levedura LEB-M3 apresentou maior consumo de glicerol nos dois meios de cultivo sendo $80,50 \pm$

0,97% de glicerol puro e $64,31 \pm 2,53\%$ de glicerol no co-produto do biodiesel, consumidos após as 192 horas de cultivo. O menor consumo do glicerol no co-produto está possivelmente relacionado às impurezas presentes neste que são consumidas juntamente ao glicerol logo este apresentou um consumo mais lento. O consumo de glicerol apresentou-se proporcional à produção de biomassa, sendo este utilizado inicialmente para o crescimento celular que é mais acelerado no início do cultivo, já ao final o crescimento de biomassa diminui devido à falta de nutrientes no meio.

A Tabela 4 apresenta a média e o desvio padrão para a biomassa, consumo de glicerol e fator de conversão de substrato em células (Y_x/s) do cultivo das leveduras estudadas, em glicerol puro e bruto ao final do tempo de cultivo de cada levedura.

Tabela 4: Médias e desvios padrões para a biomassa, consumo de glicerol e Y_x/s , e análise estatística dos dados*.

Micro-organismo	Biomassa (g/L)		Consumo de Glicerol (%)		Y_x/s	
	Puro	Bruto	Puro	Bruto	Puro	Bruto
M3	$11,86 \pm 0,08^{ab}$	$16,12 \pm 0,91^{aA}$	$80,50 \pm 0,97^{aA}$	$64,31 \pm 2,53^{ab}$	$0,45 \pm 0,01^{ab}$	$0,61 \pm 0,03^{bA}$
AAN1	$10,30 \pm 0,45^{bA}$	$12,50 \pm 0,80^{bA}$	$59,49 \pm 1,10^{abA}$	$58,90 \pm 4,26^{aA}$	$0,54 \pm 0,02^{ab}$	$0,64 \pm 0,04^{abA}$
AQ5	$6,10 \pm 0,03^{cB}$	$13,38 \pm 0,73^{bA}$	$65,97 \pm 5,49^{abA}$	$62,37 \pm 1,77^{aA}$	$0,27 \pm 0,01^{abB}$	$0,80 \pm 0,06^{aA}$
AAI4	$4,95 \pm 0,18^{dA}$	$3,49 \pm 0,72^{cB}$	$42,75 \pm 14,97^{bA}$	$31,23 \pm 12,04^{bA}$	$0,41 \pm 0,22^{abA}$	$0,27 \pm 0,13^{cB}$
AJ10	$2,41 \pm 0,24^{eA}$	$0,27 \pm 0,11^{dB}$	$49,01 \pm 14,47^{bA}$	$39,43 \pm 16,02^{abA}$	$0,16 \pm 0,03^{bA}$	$0,03 \pm <0,01^{dB}$

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha ($p < 0,05$).

De acordo com a Tabela 4 verifica-se que a levedura LEB-M3 apresentou a maior produção de biomassa ($11,86 \pm 0,08$ e $16,12 \pm 0,91$ g/L) quando cultivada em meio contendo glicerol puro e glicerol proveniente da síntese do biodiesel, respectivamente, diferindo-se estatisticamente das demais leveduras estudadas. Verificou-se que o emprego do glicerol bruto proveniente da síntese do biodiesel no meio de cultivo apresentou produção de biomassa significativamente superior quando comparado ao glicerol puro.

Verificou-se que as leveduras LEB-M3, LEB-AAN1 e LEB-AQ5 apresentaram maior consumo de glicerol não diferindo-se significativamente entre si, quando cultivadas em glicerol puro e em glicerol proveniente do biodiesel, apenas a levedura LEB-AAI4 diferiu-se das demais com menor consumo de glicerol. Ao comparar os dois substratos observou-se que o emprego do glicerol puro no meio de cultivo ocasionou o maior consumo de glicerol apenas para a LEB-M3, para as demais culturas não houve diferença significativa no consumo de glicerol, entre os dois substratos, ao longo do cultivo.

Para o fator de conversão de substrato em células (Y_x/s) verificou-se que as leveduras LEB-M3, LEB-AAN1, LEB-AQ5 e LEB-AAI4 apresentaram maior fator de conversão e não diferiram-se significativamente entre si, quando cultivadas em glicerol puro. Para o cultivo em glicerol proveniente da síntese do biodiesel observou-se que as leveduras LEB-AAN1 e LEB-AQ5 apresentaram maior fator de conversão e não diferiram significativamente entre si. Ao comparar os dois substratos observou-se que o emprego do glicerol proveniente do biodiesel no meio de cultivo ocasionou o maior fator de conversão de glicerol em célula para as mesmas leveduras.

A Tabela 5 apresenta a média e o desvio padrão para conteúdo lipídico, concentração e rendimento lipídico das leveduras estudadas em glicerol puro e glicerol bruto ao final do tempo de cultivo de cada micro-organismo.

Tabela 5: Média e desvios padrões para conteúdo lipídico, concentração de lipídeos e rendimento de lipídeos, e análise estatística dos dados*.

Micro-organismo	Conteúdo lipídico (%)		Concentração (g/L)		Rendimento (%)	
	Puro	Bruto	Puro	Bruto	Puro	Bruto
M3	20,46±0,64 ^{aB}	56,58±5,62 ^{aA}	2,43±0,09 ^{aB}	9,14±1,28 ^{aA}	7,57±0,19 ^{aB}	33,67±4,67 ^{aA}
AAN1	10,71±0,84 ^{bB}	37,73±7,22 ^{bcA}	1,10±0,05 ^{bB}	4,70±0,82 ^{bA}	3,50±0,18 ^{bB}	17,12±3,53 ^{bA}
AQ5	7,04±0,73 ^{cB}	28,84±4,07 ^{bcA}	0,43±0,05 ^{cB}	3,84±0,38 ^{bA}	1,32±0,19 ^{cB}	14,7±1,39 ^{bcA}
AAI4	11,69±0,25 ^{bB}	40,96±3,68 ^{bA}	0,29±0,05 ^{cB}	0,81±0,07 ^{cA}	0,97±0,21 ^{cB}	3,06±0,24 ^{cA}
AJ10	5,95±1,22 ^{cB}	23,97±4,75 ^{cA}	0,28±0,02 ^{cA}	0,10±0,04 ^{cB}	0,90±0,08 ^{cA}	0,43±0,14 ^{cB}

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na coluna e letras maiúsculas iguais representam que não há diferenças significativas na linha ($p < 0,05$).

Comparando-se o conteúdo lipídico mostrado na Tabela 5 observou-se que as leveduras diferiram entre si significativamente, e apresentaram maior conteúdo lipídico em glicerol bruto, sendo que a levedura LEB-M3 apresentou resultados superiores atingindo maior produção de lipídeos, tanto em meio contendo glicerol puro $20,46 \pm 0,64$ % como em glicerol proveniente da produção de biodiesel $56,58 \pm 5,62$ %, em 192 horas de cultivo. Quando comparado o conteúdo lipídico das leveduras cultivadas nos dois substratos, verificou-se que todas as leveduras estudadas diferiram significativamente sendo superiores os valores obtidos quando cultivadas em glicerol proveniente do biodiesel.

Verificou-se que a levedura LEB-M3 apresentou maior concentração de lipídeos ($2,43 \pm 0,09$ e $9,14 \pm 1,28$ g/L) quando cultivada em meio contendo glicerol puro e glicerol proveniente da síntese de biodiesel, respectivamente, diferindo-se significativamente das demais leveduras estudadas. O emprego do glicerol bruto proveniente da síntese do biodiesel no meio de cultivo proporcionou maior rendimento quando comparado ao glicerol puro, exceto para a levedura LEB-AJ10.

As leveduras LEB-M3 apresentou maior rendimento de lipídeos quando cultivada em meio contendo glicerol puro e em glicerol bruto, diferindo-se significativamente das demais leveduras. Verificou-se que o emprego do glicerol bruto proveniente da síntese do biodiesel no meio de cultivo apresentou rendimento de lipídeos superior quando comparado ao glicerol puro, exceto para a levedura LEB-AJ10.

O crescimento celular da levedura LEB-AJ10 foi possivelmente inibido pelas impurezas presentes no co-produto do biodiesel, provocando um estresse que levou ao acúmulo de alta quantidade de lipídeo, mesmo assim esta levedura apresentou baixa concentração e rendimento lipídico. Ao final do cultivo quando o crescimento é menos acelerado ocorre o acúmulo dos lipídeos, pois este inicia quando o nitrogênio se torna limitante no meio, com isso a síntese de outros compostos diminui e a produção de lipídeos predomina. Além disso, as mudanças no metabolismo celular após um período de tempo promovem uma maior eficiência na produção de lipídeos devido ao aumento na síntese de enzimas que convertem o carbono (DYAL e NARINE, 2005).

Os resultados das tabelas acima mostram que as leveduras manifestaram, entre elas, variações no crescimento e na capacidade de acumular lipídeos. Não houve uma relação consistente entre o crescimento celular e o conteúdo lipídico para as cepas

estudadas, porém a levedura LEB-M3 apresentou a maior biomassa final e também maior acúmulo de lipídeos para os dois substratos, obtendo-se com esta levedura o maior rendimento com $33,67 \pm 4,67$ g/L em glicerol do biodiesel após 192 horas de cultivo. DAI et al. (2007), selecionaram entre leveduras isoladas de flores da China a mais promissora para a produção de lipídeos atingindo 5,55 g/L de rendimento e foi identificada como *Rhodotorula glutinis*.

Os resultados deste trabalho indicam que a levedura LEB-M3, isolada do Pantanal, apresenta grande potencial de crescimento e acúmulo de lipídeos utilizando glicerol oriundo da produção de biodiesel, indicando que a utilização deste co-produto pode ser utilizado como substrato para produção de lipídeos com alto rendimento.

5.3 Identificação da Levedura

A sequência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA foi comparada com os dados disponíveis no *GenBank* utilizando a ferramenta BLAST. O fragmento de 454 pb obtido apresentou alta similaridade com linhagens do gênero *Candida*, sendo 98% de identidade com a linhagem *Candida* sp. ST-358 (DQ404510.1). Devido a esta semelhança filogenética, o micro-organismo LEB-M3 foi classificado como *Candida* sp.

A Figura 2 mostra a micrografia e a observação microscópica da levedura identificada como *Candida* sp.



Figura 2: Micrografia e microscopia da levedura *Candida* sp. LEB-M3.

5.4 Perfil de Ácidos Graxos

A Tabela 6 apresenta a composição de ácidos graxos da fração de lipídeos da biomassa da levedura LEB-M3, cultivada em meio contendo glicerol puro e glicerol bruto como fonte de carbono.

Tabela 6: Perfil de ácidos graxos dos lipídeos da levedura LEB-M3 em meios de cultivo contendo glicerol puro e glicerol bruto.

Ácidos graxos	Glicerol Puro (%)	Glicerol Bruto (%)
Ácidos graxos saturados		
C16:0	14,8	13,5
C18:0	2,21	3,04
Ácidos graxos monoinsaturados		
C16:1	8,88	0,51
C18:1	57,35	33,6
C18:1 trans	7,42	0,61
Ácidos graxos poliinsaturados		
C18:2	8,90	46,0
γ C18:3	0,48	2,69

De acordo com a Tabela 6 pode-se observar que para o cultivo em glicerol puro a proporção de ácidos graxos saturados obtida para a LEB-M3 foi de 17,01%, destacando-se o ácido palmítico. O conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados foi de 73,65% destacando-se o ácido oléico com 57,35%. O conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados representou 9,38%, sendo 8,90% de ácido linoléico e 0,48% de ácido gama linolênico (ômega-6).

Para o cultivo em glicerol de biodiesel a proporção de ácidos graxos saturados foi de 16,54%, ácido monoinsaturado 34,72% e ácidos poliinsaturados de 48,69%, destacando-se o ácido linoléico com 46,0% e o ácido gama linolênico (ômega-6) com 2,69%. Verificou-se que o efeito no lipídeo microbiano produzido por cultivo em glicerol gerado na síntese do biodiesel foi positivo para a produção de ácidos graxos poliinsaturados, visto que a composição de ácidos graxos se assemelha à composição dos óleos vegetais normalmente utilizados para a produção de biodiesel (EASTERLING et

al., 2009). Além disso, contém apreciável quantidade de são ácidos graxos essenciais não produzidos pelo organismo humano.

PAPANIKOLAOU e AGGELIS (2002) utilizaram o glicerol do biodiesel como substrato no cultivo de *Yarrowia lipolytica* e reportam o acúmulo de 43% de lipídeos, sendo o perfil de ácidos graxos composto principalmente por ácido oléico (C18:1) $47 \pm 4\%$, ácido linoléico (C18:2) $21 \pm 3\%$, além de baixas quantidades de ácido esteárico (C18:0) e palmítico (C16:0), com $13 \pm 2\%$ e $15 \pm 3\%$, respectivamente. PAPANIKOLAOU et al. 2008, utilizando glicerina residual como fonte de carbono, obtiveram biomassa de *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109, contendo 6-14% de lipídeos com 20,2% de ácido linoléico e 44,9% de ácido oléico.

6. CONCLUSÃO

As leveduras LEB-M3, LEB-AAN1, LEB-AQ5, LEB-AAI4 e LEB-AJ10 foram pré-selecionadas como potenciais produtoras de lipídeos através da técnica de coloração com Sudan Black B. No cultivo dessas leveduras em glicerol puro e glicerol de biodiesel para a produção de lipídeos a levedura LEB-M3, isolada do Pantanal, diferiu-se significativamente das demais, sendo selecionada como levedura oleaginosa mais promissora com $20,46 \pm 0,64$ e $56,58 \pm 5,62\%$ para conteúdo lipídico (base seca), em glicerol puro e glicerol bruto, respectivamente. A identificação genotípica da levedura LEB-M3 indicou que a cepa é uma *Candida* sp.

O perfil lipídico mostrou o predomínio do ácido oléico (C18:1) para o cultivo em glicerol puro, 57,35% e ácido linoléico (C18:2) para o cultivo em glicerol bruto com 46,0%, sendo a maior quantidade dos ácidos graxos produzidos para o cultivo em glicerol de biodiesel, os poliinsaturados. Os dois lipídeos produzidos apresentaram composição semelhante à de óleos vegetais comuns podendo ser destinados tanto para a produção de biodiesel quanto à indústria de alimentos como suplemento de ácidos graxos essenciais, adicionando valor agregado ao produto e tornando a produção de biodiesel sustentável.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP. AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel>, acessada em novembro 2010.

AUSUBEL, F. M.; BRENT R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G., SMITH, A. J.; STRUHL, K. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York.

BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ, K. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: A case study in Turkey. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, p. 372-396, 2008.

BIODIESEL BR. <http://biodieselbr.com>, acessada em dezembro de 2010.

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

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

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1537-1545, 2007.

CORDEIRO, E. F. Efeito das condições de cultivo na composição de ácidos graxos produzidos pelas leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae*. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1997.

DAI, C. C.; TAO, J.; XIE, F.; DAI, Y. J.; ZHAO, M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2130-2134, 2007.

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

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

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, v. 18, p. 9, 1983.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C.; GILBERT, S. C. A rapid screening method for lipid-accumulating yeast using a replica-printing technique. **Journal of Microbiological Methods**, v. 4, p. 203-210, 1985.

LIU, B.; ZHAO, Z. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 775-780, 2007.

LONGHI, L. G. S.; LUVIZETTO, D. J.; FERREIRA, L. S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; SECCHI, A. R. A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 35-40, 2004.

MA, B.; LI Q.; NIWA, T.; OURA T.; DU, W.; LIU, D.; KAJIWARA, S. Improvement of lipid accumulation in an oleaginous yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 136 p. 402-459, 2008.

MAUGERI, F.; HERNALSTEENS, S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 43-49, 2007.

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

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

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 841-846, 2006.

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

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

PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHEZ, P.; PARISET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Journal of Biotechnology**, v. 77, p. 191-208, 2000.

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

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

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.

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

VIJAYARAGHAVAN, K.; HEMANATHAN, K. Biodiesel production from freshwater algae. **Energy and Fuels**, v.23, p. 5448-5453, 2009.

WITTLICH, P.; THEMANN, A.; VORLOP, K. D. Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a newly isolated thermophilic strain. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 463-466, 2001.

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POR *Candida* sp. UTILIZANDO GLICEROL PROVENIENTE DA SÍNTESE DE BIODIESEL

Susan Hartwig Duarte e Francisco Maugeri Filho

RESUMO

O glicerol é o maior co-produto da indústria de biodiesel, sendo que de cada 10 kg de biodiesel produzido cerca de 1 kg de glicerol são gerados. O custo de purificação deste co-produto é muito elevado, por isso os produtores de biodiesel devem buscar alternativas para o destino do glicerol bruto. A utilização do glicerol proveniente da fabricação de biodiesel como substrato para a obtenção de produtos biotecnológicos é uma alternativa promissora como forma de disposição adequada deste co-produto. O presente trabalho visou aproveitar o glicerol do biodiesel no cultivo de *Candida* sp. para a produção de lipídeo microbiano. Primeiramente foram selecionadas, através de um planejamento Plackett-Burman, as variáveis que apresentaram efeitos significativos no conteúdo lipídico, concentração e rendimento de lipídeos. As variáveis independentes glicerol, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Prodex Lac® (hidrolisado protéico que substitui o extrato de levedura reduzindo o custo do meio de cultivo) e temperatura apresentaram efeitos significativos a 95% de confiança, entre as respostas estudadas. Posteriormente com as variáveis fixadas foi realizado o estudo da influência da temperatura na produção e perfil lipídico. A concentração de lipídeos para a temperatura de 23°C foi significativamente maior e o perfil de ácidos graxos com predomínio do ácido linoléico (C18:2), assim como para as demais temperaturas, com quantidade significativa de ácido gama linolênico (C18:3).

Palavras-chave: lipídeos, Plackett-Burman, *Candida* sp., Prodex Lac®.

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel tem recebido considerável atenção nos últimos anos, por ser um combustível biodegradável, renovável e atóxico, contribuindo com o ambiente por emitir menos poluentes gasosos na atmosfera que o diesel normal (ANTOLIN et al., 2002). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de biodiesel devido a dois fatores: o uso de álcool como combustível em carros tem longa tradição na cultura brasileira e as condições para cultivo de plantas oleaginosas são favoráveis em diversas áreas (SILVA, MACK e CONTIERO, 2009).

A matéria-prima utilizada na produção tradicional de biodiesel são os óleos vegetais, devido ao alto custo desses e por serem também utilizados na alimentação torna-se uma matéria-prima de baixa viabilidade comparado ao diesel de petróleo (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2008). Com isso aumenta o interesse em explorar alternativas para a produção de lipídeos a fim de produzir biodiesel. O biodiesel produzido a partir de óleos vegetais gera aproximadamente 10% de glicerol, como principal co-produto. O excesso de glicerol gerado pode representar um problema ambiental, já que não pode ser descartado no ambiente e atualmente o mercado não absorve a totalidade da produção (SILVEIRA, 2008).

Micro-organismos oleaginosos são capazes de acumular 20% ou mais de sua biomassa em lipídeos principalmente na forma de triacilgliceróis (TAG) que podem ser utilizados na produção de biodiesel através do processo de transesterificação onde as ligações de ésteres nos TAG são quebradas levando a dois produtos: metil ésteres de ácido graxo e glicerol, este que pode ser uma barata fonte de carbono para o crescimento de micro-organismos oleaginosos (PYLE, 2008).

Os micro-organismos oleaginosos apresentam um grande potencial industrial devido à sua capacidade em estocar lipídeos com propriedades e composição muitas vezes similares a produtos de origem animal e vegetal, bem como permitindo a valorização de co-produtos agroindustriais (PAPANIKOLAOU et al., 2008). Quando se trata da utilização de glicerina residual (bruta) em meios de cultivo, sem uma prévia purificação, são observadas vantagens em relação ao tradicional uso do glicerol puro como substrato, principalmente em virtude do menor custo. Mas relativamente poucos

estudos relatam o uso deste substrato como única fonte de carbono (PAPANIKOLAOU et al., 2008).

O estudo do acúmulo de lipídeos em micro-organismos e a influência de várias condições de cultivo em sua produção são essenciais para a otimização do processo. O grande desafio da biotecnologia de produção de lipídeos é identificar formas economicamente viáveis de aplicação desta tecnologia na indústria de alimentos (CORDEIRO, 1997). Para que a produção de lipídeo microbiano seja competitiva é necessário que o custo de sua produção seja baixo e que possa ser feito com fontes de carbono alternativas, de forma a diminuir o custo do meio de cultivo.

A fim de obter uma alternativa para o destino do glicerol resultante na síntese de biodiesel bem como estudar a produção de lipídeos microbianos como alternativa para a produção de biodiesel este trabalho objetivou selecionar variáveis significativas na produção de lipídeos no cultivo de *Candida* sp. em glicerol do biodiesel, entre elas componentes e condições de cultivo, e ainda estudar a influência da temperatura na composição dos ácidos graxos. Para redução de custos do meio de cultivo foi utilizado Prodex Lac® (hidrolisado de levedura comercial) como fonte de vitaminas e nitrogênio orgânico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

A cultura de *Candida* sp. foi mantida em ágar inclinado GYMP a 5°C no banco de culturas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos-FEA/UNICAMP. Antes de cada cultivo as colônias foram reativadas em ágar inclinado GYMP (Tabela 1) com pH 5,5 incubados a 30°C, por 48 h.

Tabela 1: Composição do ágar GYMP.

Componentes	(g/L)
Glicose	20,0
Extrato de levedura	5,0
Extrato de malte	10,0
KH ₂ PO ₄	2,0
Ágar	20,0

2.2 Glicerol

Como fonte de carbono foram utilizados nos experimentos glicerol comercial (Sinthy) e glicerol bruto, co-produto da síntese de biodiesel, contendo 42,4% (m/v) de glicerol, obtido através da transesterificação de óleo de soja com metanol, sem nenhum tratamento prévio, sendo gentilmente fornecido pela empresa SP-BIO (Sumaré-SP). A quantidade a ser adicionada de glicerol bruto no meio de cultivo foi determinada considerando-se calcular a concentração desejada do substrato.

2.3 Análise Experimental para Seleção de Variáveis (Plackett - Burman)

Para selecionar as variáveis que exercem maiores efeitos na produção de lipídeo utilizando glicerol gerado na síntese de biodiesel foi realizado um delineamento Plackett-Burman (RODRIGUES e IEMMA, 2009). As variáveis independentes estudadas estão apresentadas na Tabela 2, incluindo componentes do meio, pH inicial e temperatura.

Tabela 2: Variáveis estudadas no Plackett-Burman (valores reais e codificados).

Variáveis	Variáveis codificadas	Níveis		
		- 1	0	+ 1
Glicerol (g/L)	X ₁	20,0	30,0	40,0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	X ₂	0	0,5	1,0
FeCl ₃ .6H ₂ O (g/L)	X ₃	0	0,1	0,2
MnSO ₄ .H ₂ O (g/L)	X ₄	0	0,03	0,06
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	X ₅	0,2	0,4	0,6
Prodex Lac® (g/L)	X ₆	1,0	2,0	3,0
pH inicial	X ₇	5,5	6,0	6,5
Temperatura (°C)	X ₈	25	30	35

2.3.1 Preparo do Inóculo

Dois tubos de cada cultura microbiana reativada foram raspados com 10 mL de água peptonada 0,1%, para remoção das células do micro-organismo e transferência para frascos Erlenmeyers contendo 180 mL de meio de cultivo. A composição do meio de

cultivo utilizado para obtenção do inóculo está apresentado na Tabela 3, pH 6,0. O inóculo foi cultivado em frascos agitados a 28°C a 185 rpm, a concentração celular foi acompanhada por contagem em câmara de Neubauer até atingir aproximadamente 1×10^8 células/mL.

Tabela 3: Composição do meio de cultivo do inóculo.

Componentes	(g/L)
Glicerol P.A.	30,0
KH_2PO_4	7,0
Na_2HPO_4	2,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5
CaCl_2	0,15
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,15
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,06
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5
Extrato de levedura	0,5

Fonte: (PAPANIKOLAOU e AGGELIS 2002)

2.3.2 Cultivos em Frascos Agitados

Os frascos foram inoculados com 10% v/v do meio de cultivo do inóculo sendo os frascos mantidos em incubadora rotatória na temperatura estabelecida em cada ensaio, retirando-se alíquotas em intervalos de tempo pré-estabelecidos para posteriores determinações analíticas. Para a seleção das variáveis significativas foram estudadas 8 variáveis independentes: glicerol bruto (fonte de carbono), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sais inorgânicos), hidrolisado de levedura comercial Prodex Lac® (fonte de vitaminas e nitrogênio), pH inicial do meio de cultivo e temperatura (parâmetros do cultivo), sendo testadas em diferentes níveis através de um planejamento experimental Plackett-Burman com 12 ensaios mais três repetições no ponto central.

Estimaram-se os efeitos principais de cada variável nas respostas avaliadas. As variáveis dependentes estudadas foram conteúdo lipídico, concentração de lipídeos e rendimento. O nível de significância foi determinado através do teste *t* de *Student*.

2.4 Influência da Temperatura na Produção de Lipídeos

A partir dos resultados da seleção de variáveis (Plackett-Burman) foram determinadas as variáveis a serem fixadas a fim de estudar a influência da temperatura na produção de lipídeos.

2.4.1 Cultivos em Frascos Agitados

O inóculo utilizado foi o mesmo descrito no item 2.3.1. Utilizou-se frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 180 mL de meio de cultivo composto por (g/L): 30 glicerol bruto; 7,0 KH_2PO_4 ; 2,5 Na_2HPO_4 ; 0,15 CaCl_2 ; 0,02 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,0 Prodex Lac®, pH 6,0. Os frascos foram inoculados com 10% v/v de inóculo, sendo mantidos em agitador rotatório a 185 rpm e na temperatura estudada e, retirando-se amostras em intervalos de tempo pré-estabelecidos, para a realização das análises.

Os ensaios foram realizados em triplicata, para tratamento dos dados por análise de variância e teste de Tukey, a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as temperaturas estudadas, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

2.5 Metodologia analítica

2.5.1 Crescimento Celular

As amostras foram centrifugadas a 785 x g e as células lavadas duas vezes com água. Posteriormente suspendeu-se as células em volume de água que resultasse na leitura espectrofotométrica dentro da faixa de leitura do espectrofotômetro (0,2-0,8) e leu-se a 600nm. Converteu-se o valor de absorbância em concentração (g/L) através de uma curva padrão de biomassa baseado no método descrito por LONGHI et al., (2004).

2.5.2 Determinação da Concentração de Glicerol

As amostras foram previamente diluídas e filtradas a 0,22 μm . A análise de glicerol foi realizada em HPLC utilizando-se uma coluna HPX-87H, fase móvel de H_2SO_4 0,005N pH 2,6. Utilizou-se 20 μL de amostra, fluxo de 0,6 mL/min e a detecção foi feita por índice de refração. Para a quantificação da amostra foi construída uma curva padrão com glicerol P.A.

2.5.3 Determinação de Lipídeos

A concentração de lipídeos foi realizada através do método BLIGH e DYER (1959), com modificações. A biomassa seca foi primeiramente tratada com solução de HCl 2M para rompimento da parede celular, após centrifugada a 785 x g e descartado o sobrenadante. A biomassa foi misturada com metanol, clorofórmio e água para a extração dos lipídeos, seguidos de centrifugação a 785 x g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido para a extração dos lipídeos remanescentes na amostra. Com a mistura formaram-se três fases onde os lipídeos encontravam-se na fase inferior dissolvidos em clorofórmio que foi evaporado e os lipídeos medidos em peso seco.

As respostas para a produção de lipídeos foram calculadas em termos de conteúdo lipídico (g de lipídeo/ 100g de biomassa), concentração de lipídeos (g/L) e rendimento de lipídeo (g lipídeo/g de glicerol x 100).

2.5.4 Medida de pH

O pH foi medido em potenciômetro digital modelo Mettler Toledo 320.

2.5.5 Determinação dos Ácidos Graxos

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

A identificação e quantificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa (GC/FID), em cromatógrafo a gás Varian com injeção manual de 1 μ L e detector por ionização em chama (FID). A coluna cromatográfica utilizada foi uma Carbowax (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). As condições de temperatura da análise foram injetor 230 °C, detector 250 °C, temperatura inicial da coluna 140 °C, 140 °C por 20 min, 2,5 °C/min até 220 °C e 10 min em 220 °C. Vazão do gás de arraste (N_2) de 1,6 mL/min, razão de split 1:100, vazão dos gases no detector: 30/30/300 N_2/H_2 /ar sintético. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação direta dos tempos de retenção com padrões (Sigma-Aldrich), e quantificados por normalização de áreas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção das Variáveis para a Produção de Lipídeos

A matriz com os valores reais e codificados das variáveis independentes e os resultados do planejamento experimental Plackett-Burman para as respostas conteúdo lipídico, concentração de lipídeos e rendimento estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Matriz do planejamento Plackett-Burman (valores codificados) e respostas em conteúdo lipídico (%) concentração de lipídeos (g/L) e rendimento (%) ao final do cultivo.

Ensaio	Variáveis independentes*								Respostas		
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	Conteúdo (%)	Concentração (g/L)	Rendimento (%)
1	+	-	+	-	-	-	+	+	47,68	5,53	16,90
2	+	+	-	+	-	-	-	+	53,18	6,28	17,27
3	-	+	+	-	+	-	-	-	28,1	3,83	20,38
4	+	-	+	+	-	+	-	-	41,16	7,70	23,13
5	+	+	-	+	+	-	+	-	48,85	10,09	28,75
6	+	+	+	-	+	+	-	+	51,37	8,43	22,01
7	-	+	+	+	-	+	+	-	37,84	7,64	43,24
8	-	-	+	+	+	-	+	+	31,18	4,34	21,02
9	-	-	-	+	+	+	-	+	40,37	6,05	32,19
10	+	-	-	-	+	+	+	-	55,02	13,14	38,69
11	-	+	-	-	-	+	+	+	33,61	5,62	25,92
12	-	-	-	-	-	-	-	-	47,70	6,35	32,34
13	0	0	0	0	0	0	0	0	21,74	3,48	10,91
14	0	0	0	0	0	0	0	0	22,81	3,86	12,16
15	0	0	0	0	0	0	0	0	19,59	3,14	9,62

*x₁=glicerol, x₂=MgSO₄.7H₂O, x₃=FeCl₃.6H₂O, x₄=MgSO₄.7H₂O, x₅=(NH₄)₂SO₄, x₆=Prodex Lac®, x₇=pH inicial, x₈=temperatura.

De acordo com a Tabela 4 a maior produção de lipídeos observada foi no ensaio 10, com 55,02% de conteúdo lipídico, concentração lipídica de 13,14 g/L e rendimento de 38,69%, onde os parâmetros concentração de glicerol, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Prodex Lac® e pH inicial apresentavam os maiores níveis de faixa investigada e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e temperatura, menores níveis. Os menores valores de conteúdo lipídico, concentração de lipídeos e rendimento foram obtidos nos ensaios dos pontos centrais seguido do ensaio 3, para as duas primeiras respostas, onde os parâmetros glicerol, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Prodex Lac®, pH inicial e temperatura apresentavam os menores níveis.

A Tabela 5 apresenta os efeitos estimados para a resposta conteúdo lipídico (%) obtidos para o planejamento Plackett-Burman.

Tabela 5: Efeitos estimados para o conteúdo lipídico (%).

Fator	Efeito (%)	Erro padrão	<i>t</i> (5)	<i>p</i> -valor
Glicerol	13,0767	3,699482	3,53473	0,016656
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-1,6933	3,699482	-0,45772	0,666355
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-6,9000	3,699482	-1,86513	0,121170
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-1,8167	3,699482	-0,49106	0,644177
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-1,0467	3,699482	-0,28292	0,788575
Prodex Lac®	0,4467	3,699482	0,12074	0,908601
pH inicial	-1,2833	3,699482	-0,34690	0,742793
T (°C)	-0,2133	3,699482	-0,05767	0,956248

De acordo com a Tabela 5 apenas a variável glicerol apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) para a resposta conteúdo lipídico.

A Tabela 6 apresenta os efeitos estimados para a resposta concentração de lipídeos (g/L) obtidos para o planejamento Plackett-Burman.

Tabela 6: Efeitos estimados para a concentração de lipídeos (g/L).

Fator	Efeito (g/L)	Erro padrão	<i>t</i> (5)	<i>p</i> -valor
Glicerol	2,89000	0,612318	4,71977	0,005244
MgSO ₄ .7H ₂ O	-0,20333	0,612318	-0,33207	0,753304
FeCl₃.6H₂O	-1,67667	0,612318	-2,73823	0,040878
MnSO ₄ .H ₂ O	-0,13333	0,612318	-0,21775	0,836230
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,12667	0,612318	1,84000	0,125147
Prodex Lac®	2,02667	0,612318	3,30983	0,021244
pH inicial	1,28667	0,612318	2,10130	0,089605
T (°C)	-2,08333	0,612318	-3,40237	0,019202

Conforme observado na Tabela 6, as variáveis FeCl₃.6H₂O e temperatura apresentaram efeito significativo negativo na concentração de lipídeos, ou seja, na faixa estudada, ao passar do nível -1 para o +1 essas variáveis ocasionariam uma redução na concentração de lipídeos. As variáveis independentes glicerol e Prodex Lac® apresentaram efeito positivo significativo. Sendo assim, para obter maior concentração de lipídeos é necessário ampliar a faixa investigada dessas duas últimas variáveis e diminuir a faixa de FeCl₃.6H₂O e temperatura. Os demais parâmetros não apresentaram efeito significativo na concentração de lipídeos ao nível de 95% de confiança.

A Tabela 7 apresenta os efeitos estimados para a resposta rendimento de lipídeos (%) obtidos para o planejamento Plackett-Burman.

Tabela 7: Efeitos estimados para o rendimento de lipídeos (%).

Fator	Efeito (%)	Erro padrão	<i>t</i> (5)	<i>p</i> -valor
Glicerol	-4,7229	3,220070	-1,46672	0,202364
MgSO ₄ .7H ₂ O	-1,1158	3,220070	-0,34653	0,743052
FeCl ₃ .6H ₂ O	-4,7471	3,220070	-1,47423	0,200426
MnSO ₄ .H ₂ O	1,5595	3,220070	0,48430	0,648638
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,7036	3,220070	0,21850	0,835679
Prodex Lac®	8,0839	3,220070	2,51046	0,053798
pH inicial	4,5349	3,220070	1,40831	0,218077
T (°C)	-8,5385	3,220070	-2,65164	0,045337

Conforme observado na Tabela 7, apenas a temperatura apresentou efeito significativo para o rendimento de lipídeos, ao nível de 95% de confiança, indicando que ao passar do nível -1 para o +1 da temperatura ocasionaria uma redução no rendimento de lipídeos. Observando-se os dados obtidos, os maiores efeitos positivos entre as variáveis independentes foram para o Prodex Lac® e pH inicial. E o maior efeito negativo foi para a temperatura seguido de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e glicerol, sendo que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentou efeito quase nulo.

A partir destes resultados foram selecionadas as condições para o estudo da influência da temperatura na próxima etapa do trabalho. Definiram-se faixas ao redor da mínima temperatura estudada no planejamento Plackett-Burman, visto que esta variável apresentou efeito negativo para as três respostas.

A variável Prodex Lac® que apresentou efeito positivo significativo para a concentração de lipídeos foi fixada na maior concentração estudada. A variável $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ que apresentou efeito negativo significativo para a concentração de lipídeos, foi retirada do meio de cultivo assim como as variáveis $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ que não foram significativas porém apresentaram efeito negativo, visando também a redução do custo do meio de cultivo no estudo da temperatura. As variáveis pH inicial e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram fixadas no ponto central visto que os efeitos destas variáveis não foram significativos e apresentaram efeitos opostos para as respostas analisadas.

A faixa fixada para a variável glicerol no estudo da temperatura foi mantida em 30 g/L, pois nesta concentração ele foi totalmente consumido ao final das 240 horas de cultivo (dados no Apêndice), nos ensaios do ponto central, levando em consideração a importância do maior aproveitamento e consumo do glicerol presente no substrato. Assim como o Prodex Lac®, a peptona também é fonte de nitrogênio orgânico e foi estudada por ZHU, ZONG e WU (2008) juntamente com fontes de nitrogênio inorgânico onde concluíram que essa fonte de nitrogênio beneficiou a produção de lipídeos por *Trichosporon fermentans*.

3.2 Influência da Temperatura na Produção de Lipídeos

A Figura 1 apresenta a cinética de crescimento celular de *Candida* sp. em meio contendo glicerol proveniente da síntese do biodiesel nas diferentes temperaturas estudadas.

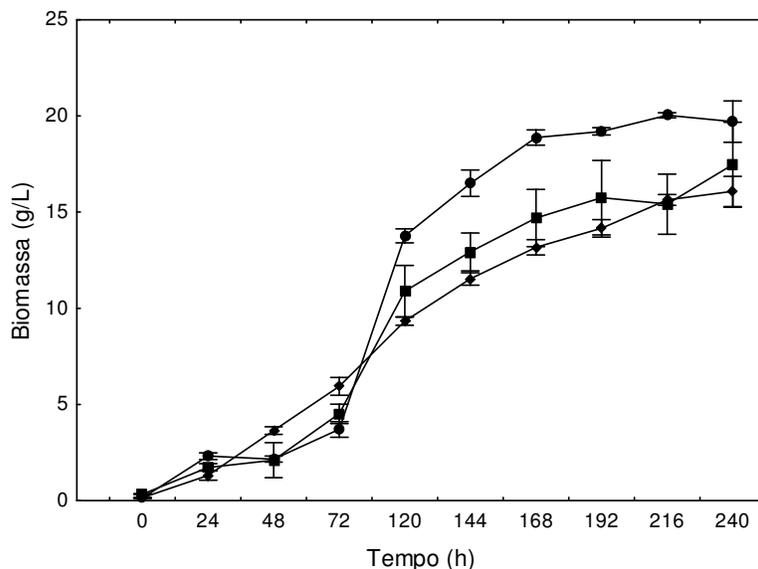


Figura 1: Crescimento celular de *Candida* sp. nas temperaturas de (●) 23°C, (■) 25°C e (◆) 27°C.

De acordo com a Figura 1 é possível observar que o crescimento celular apresentou um perfil semelhante para as três temperaturas, sendo que a 23°C atingiu-se o estado estacionário em 192 horas de cultivo, já a 25°C e 27°C não foi atingido o estado estacionário mesmo após 240 horas de cultivo. Em temperatura mais baixa (23°C) houve maior produção de biomassa, $19,7 \pm 1,07$ g/L, ao término do cultivo.

A Tabela 8 apresenta a média e o desvio padrão para conteúdo lipídico (%) e concentração de lipídeos (g/L) de *Candida* sp. para as diferentes temperaturas estudadas.

Tabela 8: Média e desvios padrões para conteúdo lipídico e concentração de lipídeos (g/L), e análise estatística dos dados*.

Temperatura (°C)	Conteúdo lipídico (%)	Concentração de lipídeo (g/L)
23	50,18 ± 2,75 ^a	9,90 ± 0,87 ^a
25	47,65 ± 3,7 ^a	7,65 ± 0,44 ^b
27	44,14 ± 1,63 ^a	7,70 ± 0,84 ^b

*Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas entre as temperaturas estudadas ($p < 0,05$).

De acordo com a Tabela 8 verificou-se que o conteúdo lipídico não apresentou diferença significativa entre as temperaturas, porém para a resposta concentração de lipídeos a temperatura de 23°C foi significativamente diferente das demais, atingindo a maior concentração, $9,90 \pm 0,87$ g/L. Este resultado se deve ao fato de que para a concentração de lipídeos é considerada também a quantidade de biomassa produzida, com isso pode-se concluir que a temperatura de 23°C beneficiou a concentração final de lipídeos da levedura *Candida* sp.

CHI et al. (2007), estudando glicerol puro e bruto, reportaram maior crescimento e produtividade de biomassa em glicerol bruto e ao otimizar as condições do meio de cultivo, a temperatura foi a variável mais significativa para a produção do ácido graxo DHA, obtendo como ótimo 19,2°C que favoreceu a maior produtividade.

O perfil dos lipídeos microbianos, quantidade, produtividade e rendimento de conversão são influenciados por várias condições do processo, como a natureza do nutriente limitante, pH, aeração e temperatura (BEOPOULOS et al., 2009).

3.3 Perfil de Ácidos Graxos

A Tabela 9 apresenta o perfil de ácidos graxos em % relativa obtidos para a levedura *Candida* sp. cultivada em meio contendo glicerol de biodiesel em diferentes temperaturas.

Tabela 9: Perfil de ácidos graxos dos lipídeos da biomassa de *Candida* sp. cultivada em meios de cultivo contendo glicerol de biodiesel em diferentes temperaturas.

Ácidos graxos	23°C	25°C	27°C
Ácidos graxos saturados			
C16:0	12,95	9,77	14,22
C18:0	3,11	3,49	1,44
Ácidos graxos monoinsaturados			
C16:1	0,60	0,42	0,51
C18:1	34,05	25,55	27,38
C18:1 trans	0,67	0,81	0,52
Ácidos graxos poliinsaturados			
C18:2	44,6	54,9	52,32
γ C18:3 n-6	2,13	5,10	3,62

De acordo com a Tabela 9 é possível observar que para o cultivo na temperatura de 23°C obteve-se um perfil de ácidos graxos totalizando 16,06% de ácidos graxos saturados com destaque para o ácido palmítico (C16:0), 35,32% de ácidos graxos monoinsaturados com destaque para o ácido oléico (C18:1). Porém a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados foi superior totalizando 46,73% do total, destacando-se o ácido graxo essencial linoléico (C18:2) com 44,6% e 2,13% de ácido gama linolênico (C18:3 n-6), também essencial.

Para o cultivo na temperatura de 25°C é possível observar que a porcentagem de ácidos graxos saturados foi de 13,26%, com destaque para o ácido palmítico (C16:0), entre os ácidos graxos monoinsaturados que totalizaram 26,78%, destacando-se o ácido oléico (C18:1). Os ácidos graxos poliinsaturados representaram 60,0% com 54,9% de ácido linoléico (C18:2) e 5,10% de ácido gama linolênico (C18:3 n-6).

Para o cultivo na temperatura de 27°C verificou-se um perfil com 15,66% de ácido graxo saturado destacando-se o ácido palmítico (C16:0), assim como o ácido oléico (C18:1) foi o destaque para os ácidos monoinsaturados que totalizaram 28,41%. Assim como para as temperaturas de 23 e 25°C os ácidos graxos poliinsaturados foram

produzidos em maior porcentagem totalizando 55,94%, com 52,32% de ácido linoléico (C18:2) e 3,62% de ácido gama linolênico (C18:3 n-6).

PAPANIKOLAOU et al. (2004) reportam a produção de lipídeo microbiano contendo 3,5% de ácido gama linoléico (GLA), correspondendo a 16-19 mg de GLA por grama de biomassa seca. Com isso o presente trabalho apresenta uma significativa produção deste ácido graxo essencial utilizando o glicerol residual do biodiesel como substrato. EVANS e RATLEDGE (1983) reportam a produção de lipídeos por *Candida curvata* em meio contendo xilose como fonte de carbono, onde o perfil de ácidos graxos apresentou-se com 15% de ácido esteárico (18:0) e o ácido linoléico (18:2) em menor quantidade com 4%.

LI et al. (2010) ao estudarem a produção de lipídeos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a utilizando amido de mandioca como substrato obtiveram um perfil de ácidos graxos compostos por 63,5% de ácido oléico e 22,3% de ácido palmítico, e apenas 5,7% de ácido linoléico, o único poliinsaturado obtido.

Comparando-se o perfil de ácidos graxos para as diferentes temperaturas estudadas verificou-se que a 25°C ocorreu maior indução a formação de ácidos graxos poliinsaturados, seguido pela temperatura de 27°C que também apresentou perfil semelhante, e a 23°C houve uma menor produção dos ácidos graxos essenciais, concluindo que temperaturas acima de 23°C são mais adequadas para a maior produção desses ácidos.

Logo o lipídeo produzido por *Candida* sp. pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel visto que a composição de ácidos graxos se assemelham à composição dos óleos vegetais normalmente utilizados para a produção de biodiesel (EASTERLING et al., 2009), e ainda como fonte de ácidos graxos essenciais.

4. CONCLUSÃO

Através de um planejamento Plackett-Burman realizado para o cultivo da levedura LEB-M3 em glicerol de biodiesel, foi possível estabelecer as variáveis com efeitos significativos na produção de lipídeos, sendo elas as concentrações de glicerol, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Prodex Lac® e temperatura. A temperatura se destacou entre as significativas com efeito negativo para as respostas analisadas e foi estudada separadamente.

Para verificar a influência da temperatura na produção de lipídeos testou-se 23°C, 25°C e 27°C de cultivo, sendo que as outras condições de fermentação estabelecidas anteriormente no planejamento Plackett-Burman (g/L): 30 glicerol bruto; 7,0 KH_2PO_4 ; 2,5 Na_2HPO_4 ; 0,15 CaCl_2 ; 0,02 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,0 Prodex Lac®, pH inicial ajustado a 6,0.

A concentração de lipídeos da levedura ao final da fermentação no cultivo à temperatura de 23°C foi significativamente maior que as demais temperaturas estudadas. O perfil de ácidos graxos apresentou semelhança para as três temperaturas com predomínio do ácido linoléico (C18:2), porém na temperatura de 23°C houve maior produção de ácido oléico (C18:1) e menor produção de linoléico quando comparada as demais temperaturas. Para as três temperaturas estudadas verificou-se quantidade significativa de ácido gama linolênico (C18:3) que, assim como o linoléico, são ácidos graxos essenciais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTOLIN, G.; TINAUT, F.V.; BRICENO, Y.; CASTANO, V.; RAMIEZ, A.I. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 111-114, 2002.

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

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

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1537-1545, 2007.

CORDEIRO, E. F. Efeito das condições de cultivo na composição de ácidos graxos produzidos pelas leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae*. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1997.

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

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, v. 18, p. 9, 1983.

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

LONGHI, L. G. S.; LUVIZETTO, D. J.; FERREIRA, L. S.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; SECCHI, A. R. A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 35-40, 2004.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production. **Fuel Processing Technology**, v. 89, p. 740-748, 2008.

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

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.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 287-291, 2004.

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

PYLE, D. J. Use of biodiesel-derived crude glycerol for the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids by the microalga *Schizochytrium limacinum*. Thesis (Master of Science in Biological Systems Engineering) Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2 ed. Campinas, SP: Casa de Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

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

SILVEIRA, L. Glicerina gerada na produção do biodiesel terá novos usos. Biodieselbr online. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com>, acessado em novembro de 2010.

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

CONCLUSÕES GERAIS

As leveduras LEB-M3, LEB-AAN1, LEB-AQ5, LEB-AAI4 e LEB-AJ10 foram pré-selecionadas como potenciais produtoras de lipídeos através da técnica de coloração com Sudan Black B. No cultivo dessas leveduras em glicerol puro e glicerol de biodiesel para a produção de lipídeos a levedura LEB-M3, isolada do Pantanal, diferiu-se significativamente das demais, sendo selecionada como levedura oleaginosa mais promissora com $20,46 \pm 0,64$ e $56,58 \pm 5,62\%$ para conteúdo lipídico (base seca), em glicerol puro e glicerol bruto, respectivamente. A identificação genotípica da levedura LEB-M3 indicou que a cepa é uma *Candida* sp.

O perfil lipídico mostrou o predomínio do ácido oléico (C18:1) para o cultivo em glicerol puro, 57,35% e ácido linoléico (C18:2) para o cultivo em glicerol bruto com 46,0%, sendo a maior quantidade dos ácidos graxos produzidos para o cultivo em glicerol de biodiesel, poliinsaturados.

Através de um planejamento Plackett-Burman realizado para o cultivo da levedura LEB-M3 em glicerol de biodiesel, foi possível estabelecer as variáveis com efeitos significativos na produção de lipídeos, sendo elas as concentrações de glicerol, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Prodex Lac® e temperatura. A variável temperatura se destacou entre as significativas com efeito negativo para as respostas analisadas e foi estudada separadamente. O estudo da influência da temperatura na produção de lipídeos foi realizado nas temperaturas de 23°C, 25°C e 27°C de cultivo, sendo que as outras condições de fermentação foram estabelecidas no planejamento Plackett-Burman e foram (g/L): 30 glicerol; 7,0 KH_2PO_4 ; 2,5 Na_2HPO_4 ; 0,15 CaCl_2 ; 0,02 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,0 Prodex Lac®, pH ajustado a 6,0

A concentração de lipídeos da levedura ao final do cultivo à temperatura de 23°C foi significativamente maior que para as demais temperaturas estudadas. O perfil de ácidos graxos apresentou semelhança para as três temperaturas com predomínio do ácido linoléico (C18:2), porém na temperatura de 23°C houve maior produção de ácido oléico (C18:1) e menor produção de linoléico quando comparada as demais temperaturas. Para as três temperaturas estudadas verificou-se quantidade significativa de ácido gama linolênico (C18:3) que, assim como o linoléico são ácidos graxos essenciais.

APÊNDICE

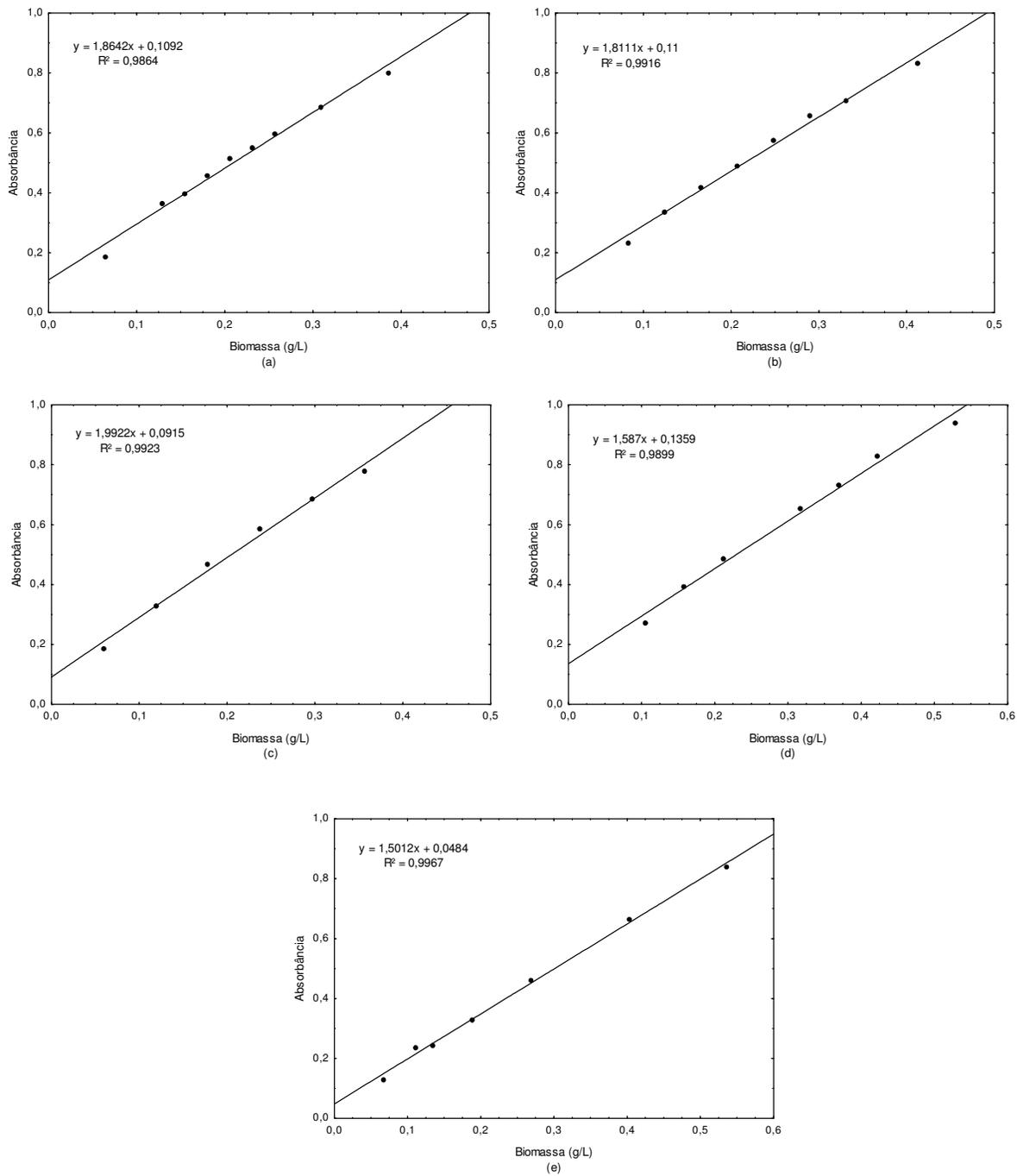


Figura 1: Curvas padrão de biomassa das leveduras (a) LEB-M3, (b) LEB-AAN1, (c) LEB-AQ5, (d) LEB-AAI4 e (e) LEB-AJ10.

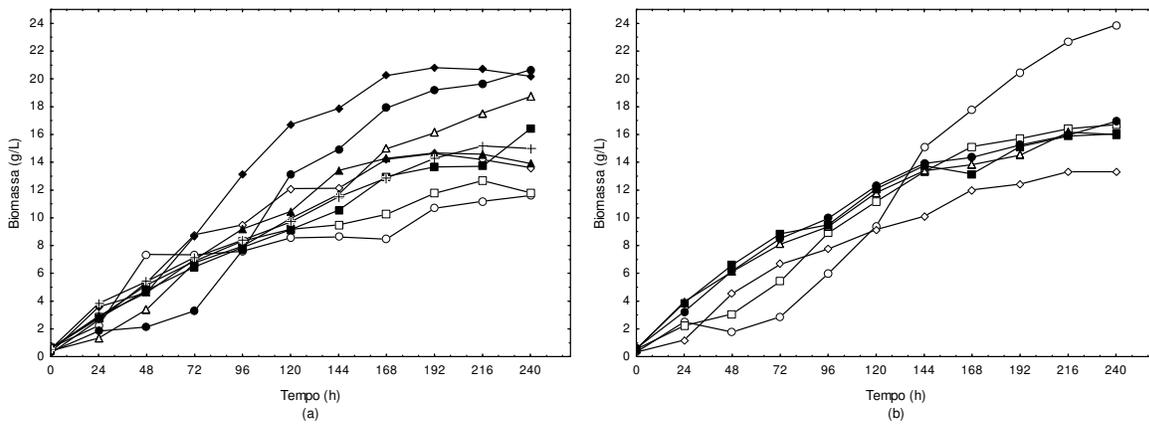


Figura 2: Acompanhamento da biomassa (a) para os ensaios (o) 1, (□) 2, (◇) 3, (Δ) 4, (●) 5, (■) 6, (◆) 7, (▲) 8, (+) 9 e (b) para os ensaios (o) 10, (□) 11, (◇) 12, (Δ) 13, (●) 14, (■) 15.

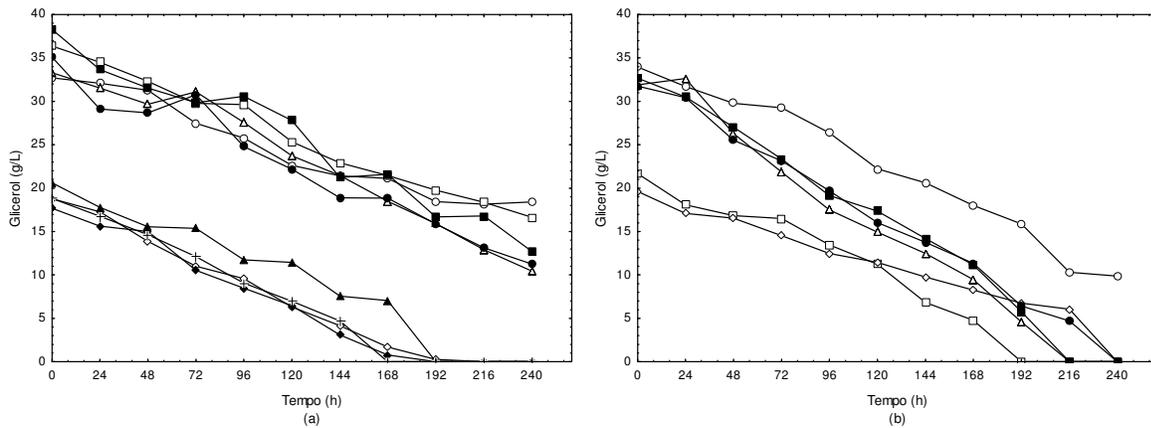


Figura 2: Acompanhamento do consumo de glicerol (a) para os ensaios (o) 1, (□) 2, (◇) 3, (Δ) 4, (●) 5, (■) 6, (◆) 7, (▲) 8, (+) 9 e (b) para os ensaios (o) 10, (□) 11, (◇) 12, (Δ) 13, (●) 14, (■) 15.

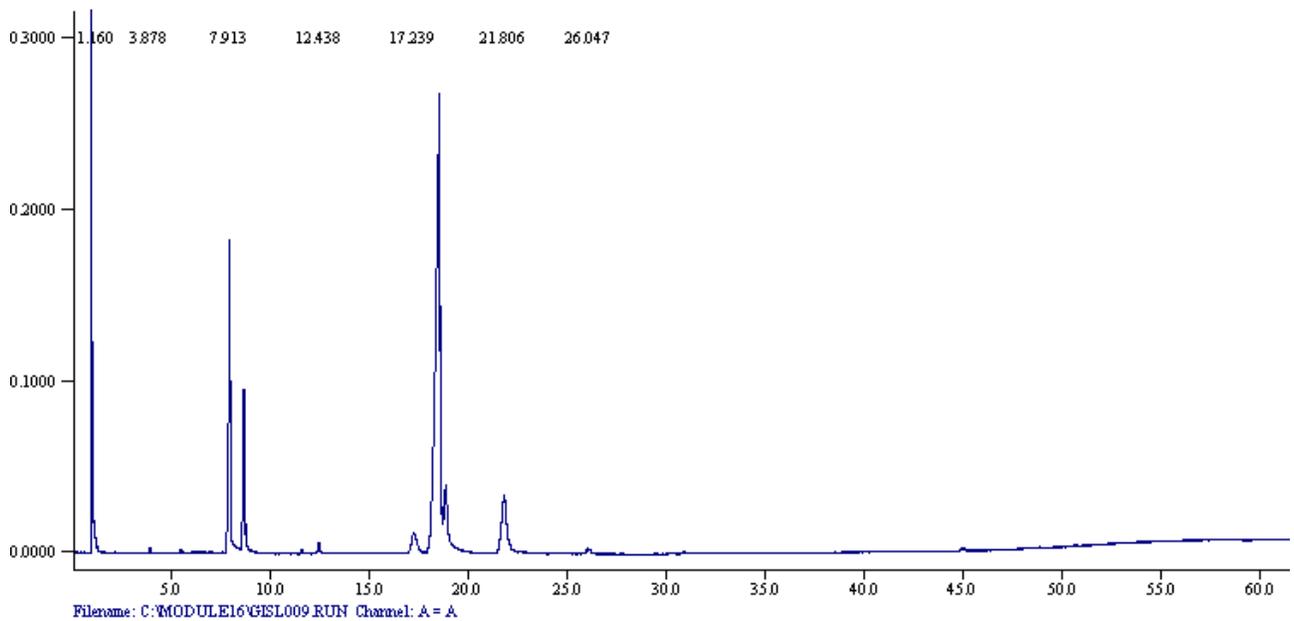
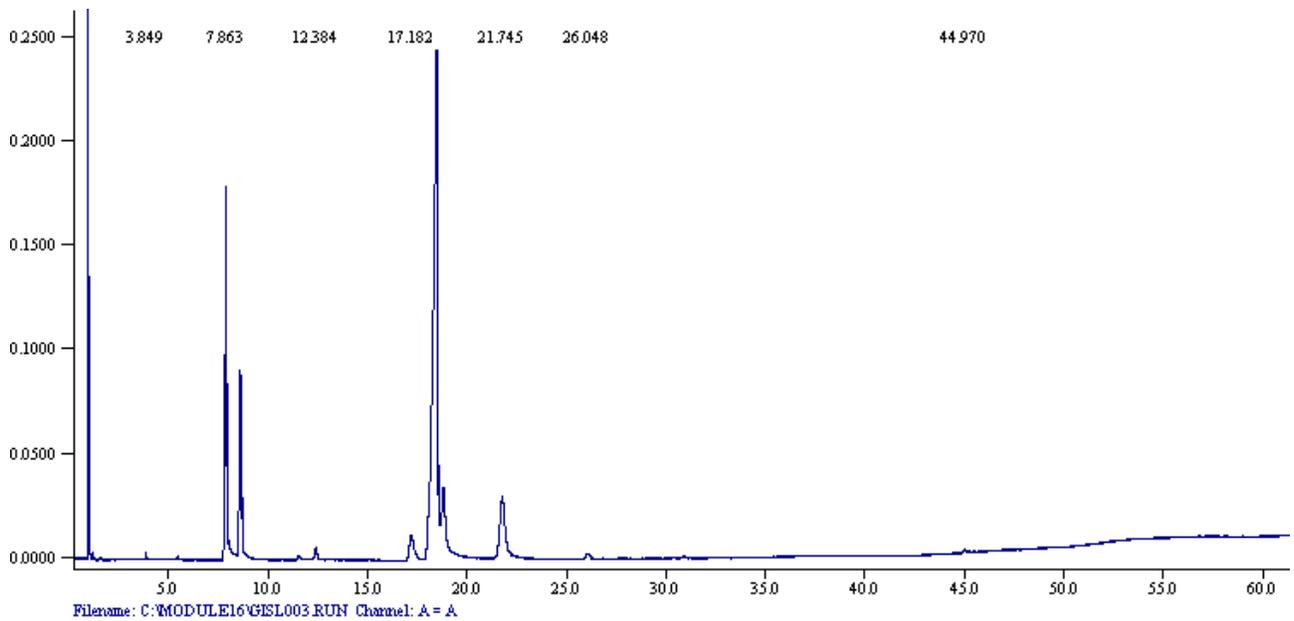


Figura 3: Cromatograma dos ácidos graxos para o cultivo em glicerol puro. Média do tempo de retenção: ácido palmítico (7,88), ácido palmitoléico (8,6), ácido esteárico (17,21), ácido oléico (18,48), ácido elaídico (18,8), ácido linoléico (21,78), ácido gama-linolênico (26,05).

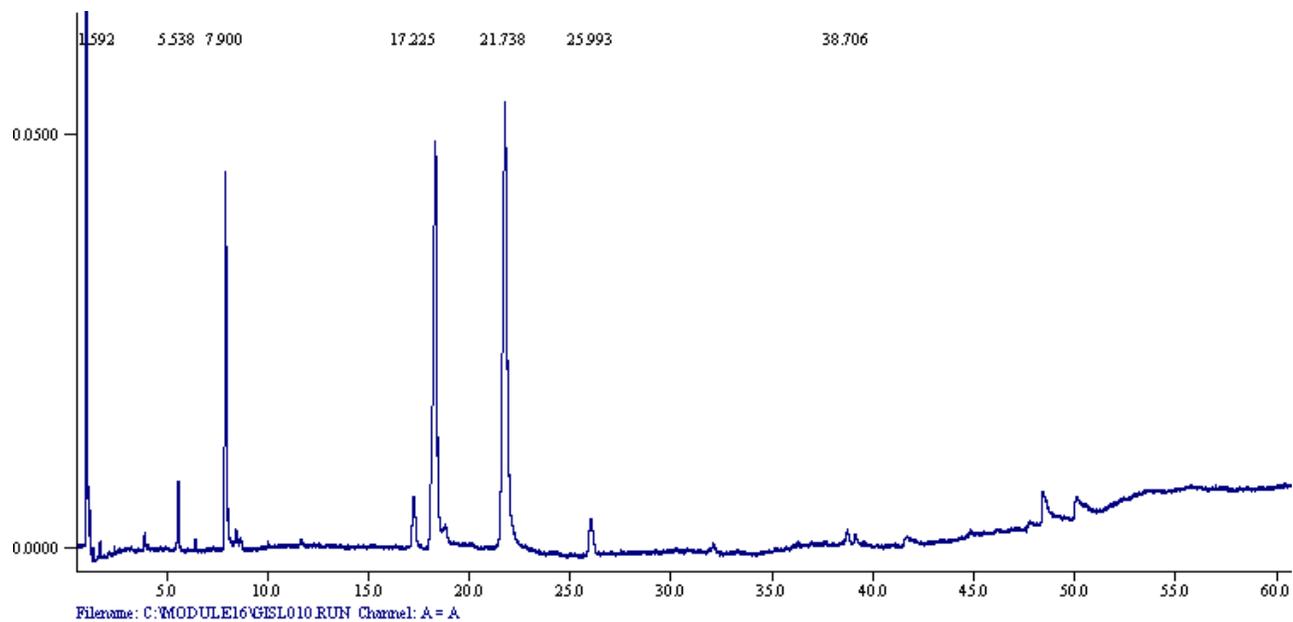
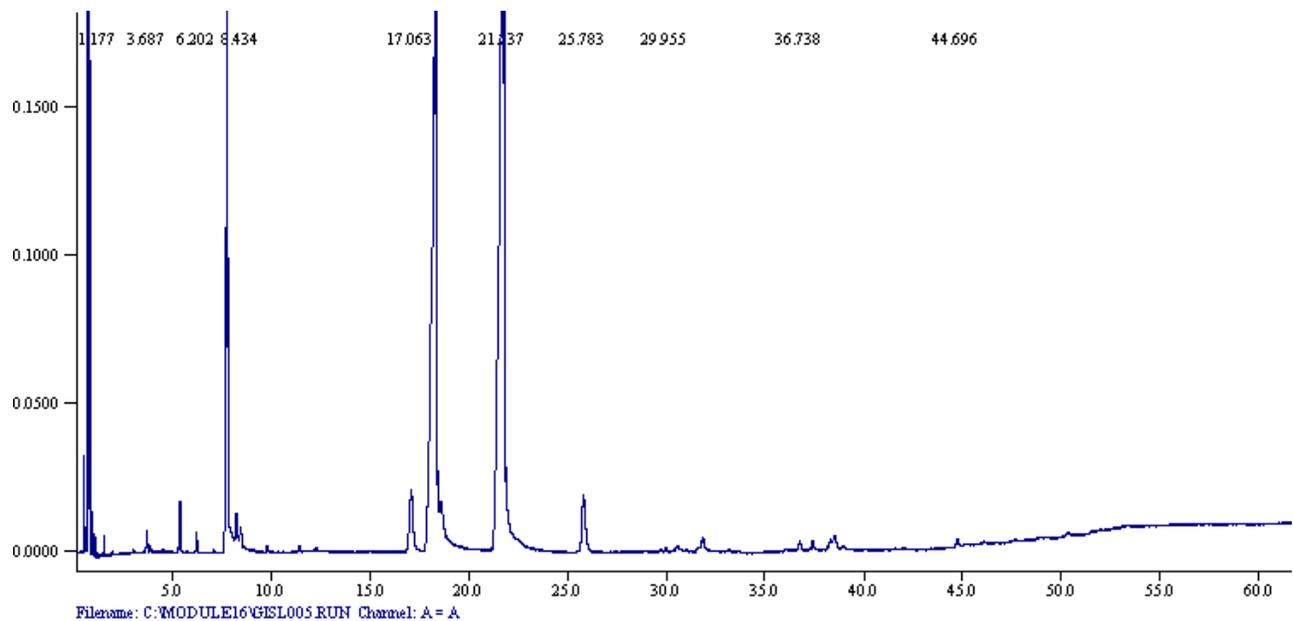


Figura 4: Cromatograma dos ácidos graxos para o cultivo em glicerol bruto. Média do tempo de retenção: ácido palmítico (7,83), ácido palmitoléico (8,31), ácido esteárico (17,14), ácido oléico (18,28), ácido elaídico (18,67), ácido linoléico (21,74), ácido gama-linolênico (25,89).

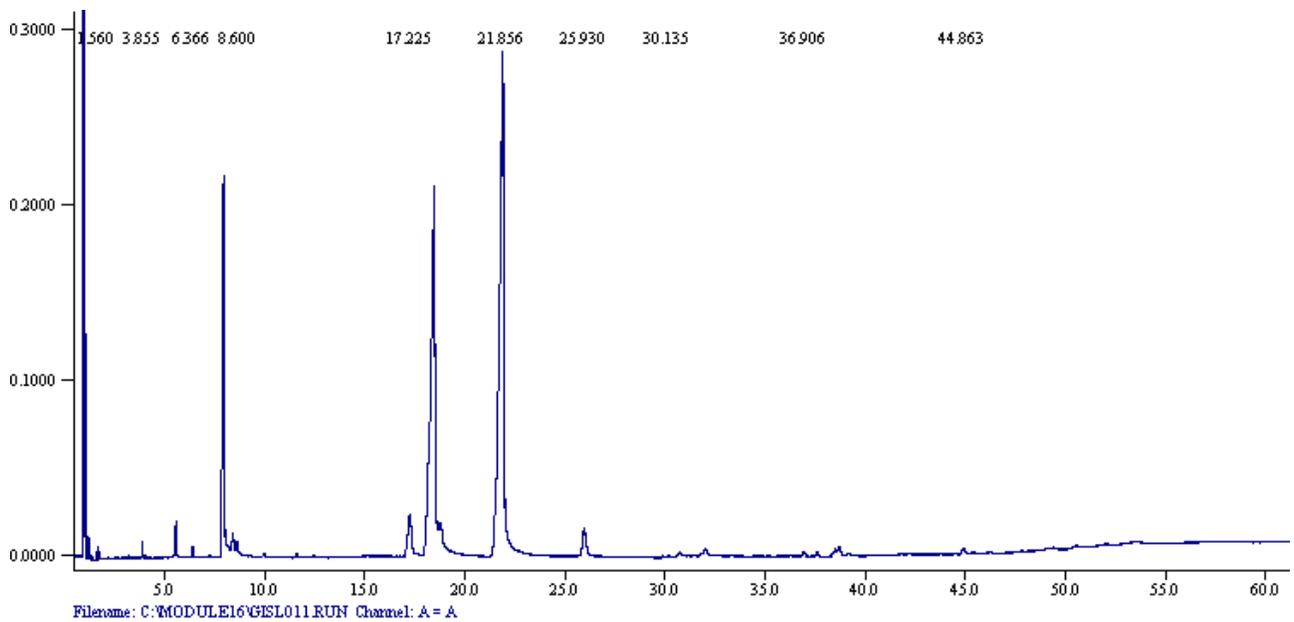
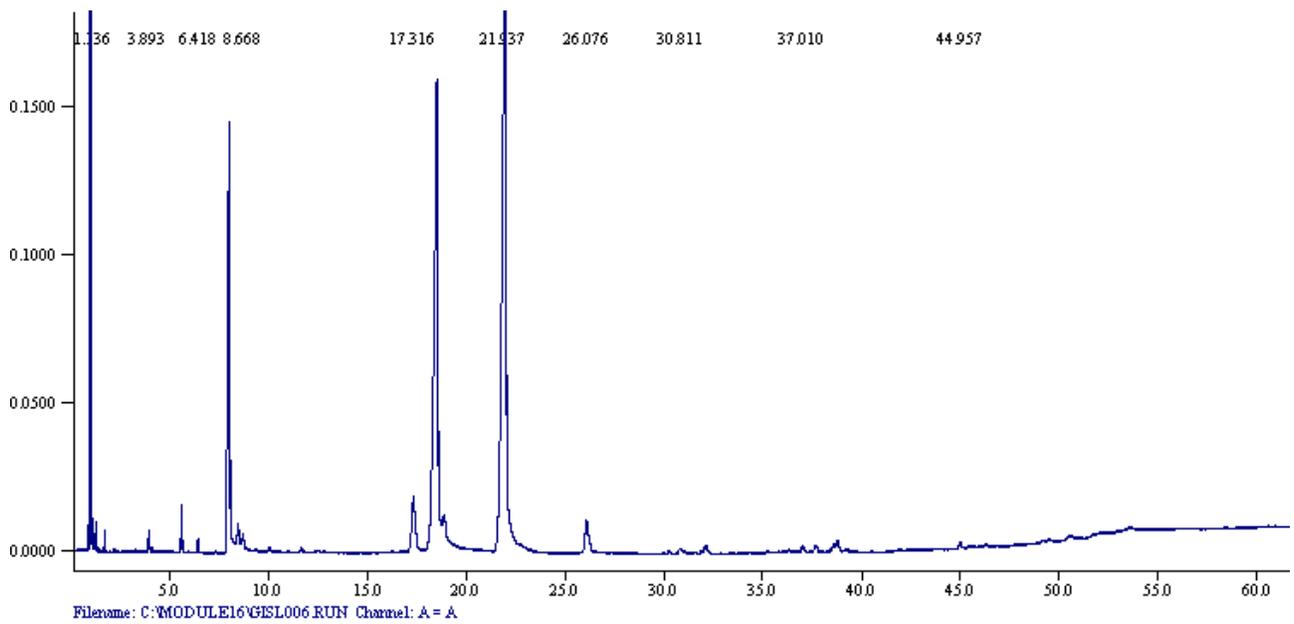


Figura 5: Cromatograma dos ácidos graxos para o cultivo à 23°C. Média do tempo de retenção: ácido palmítico (7,94), ácido palmitoléico (8,41), ácido esteárico (17,27), ácido oléico (18,45), ácido elaídico (18,79), ácido linoléico (21,9), ácido gama-linolênico (26,0).

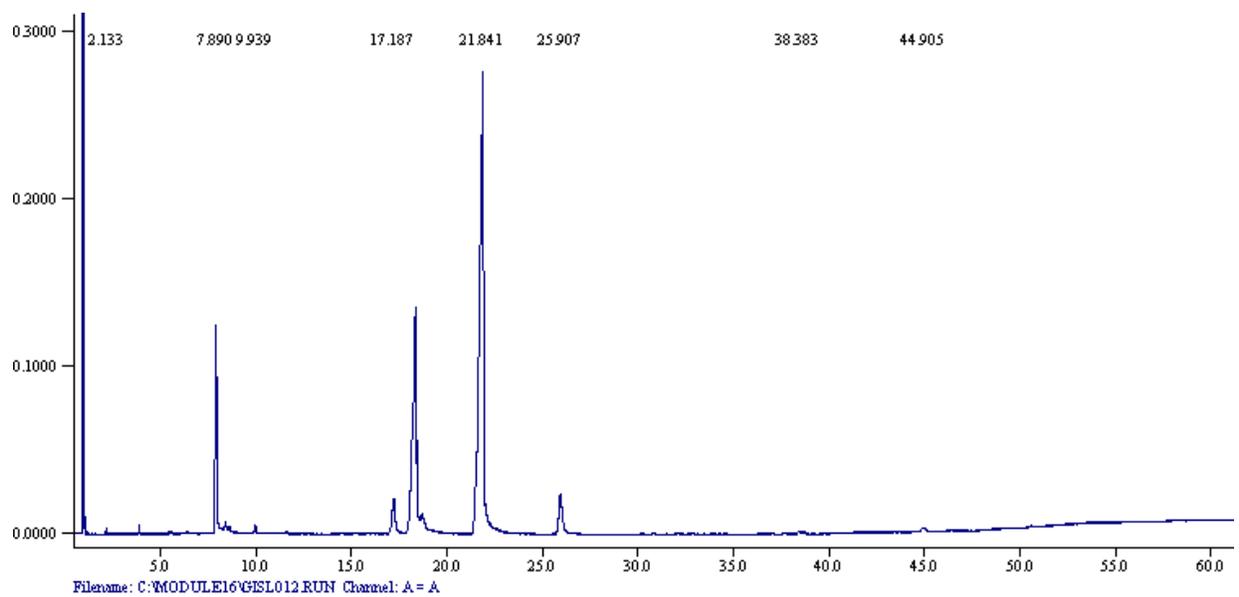
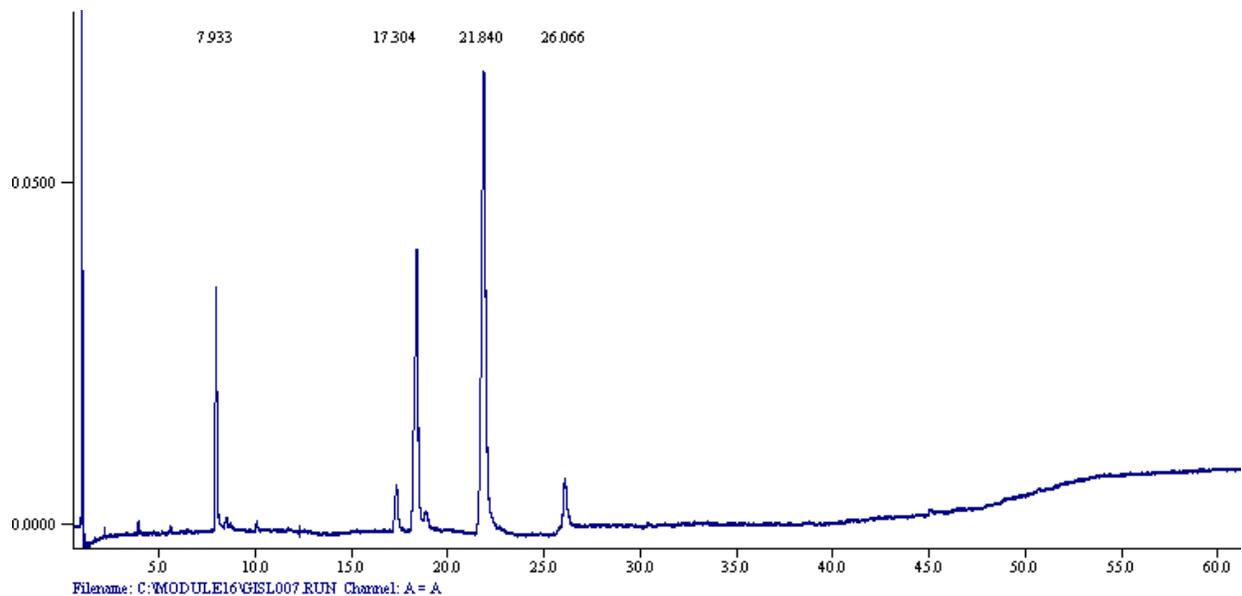


Figura 6: Cromatograma dos ácidos graxos para o cultivo à 25°C. Média do tempo de retenção: ácido palmítico (7,91), ácido palmitoléico (8,4), ácido esteárico (17,11), ácido oléico (18,32), ácido elaídico (18,76), ácido linoléico (21,84), ácido gama-linolênico (25,99).

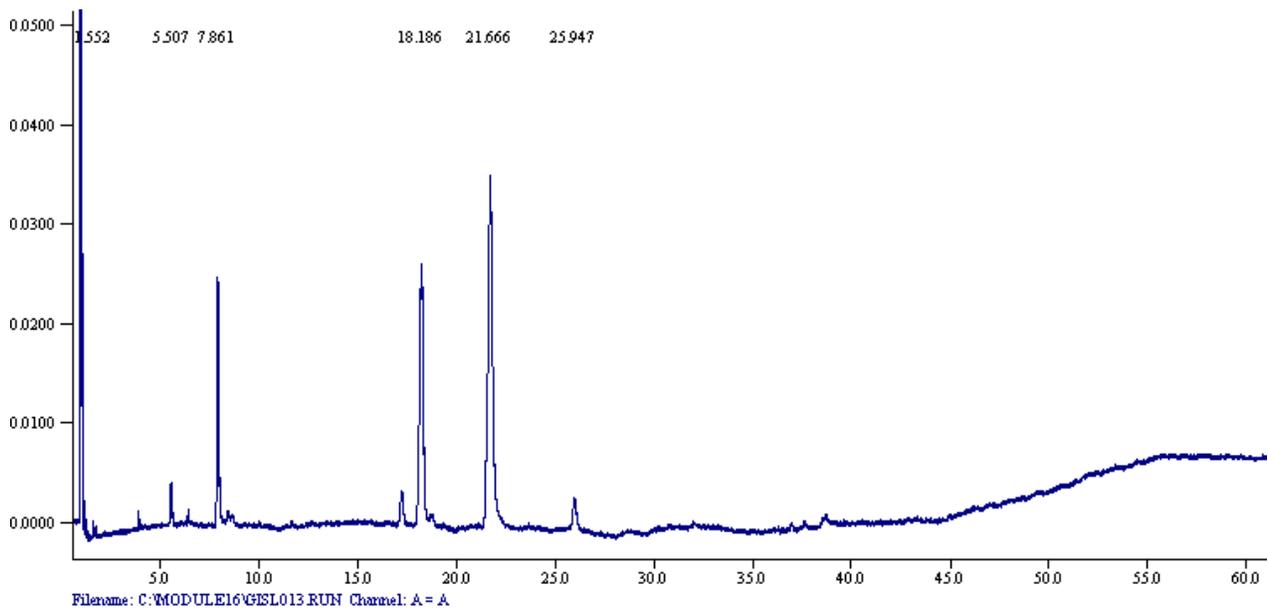


Figura 7: Cromatograma dos ácidos graxos para o cultivo à 27°C. Média do tempo de retenção: ácido palmítico (7,86), ácido palmitoléico (8,37), ácido esteárico (17,18), ácido oléico (18,19), ácido elaídico (18,69), ácido linoléico (21,67), ácido gama-linolênico (25,95).

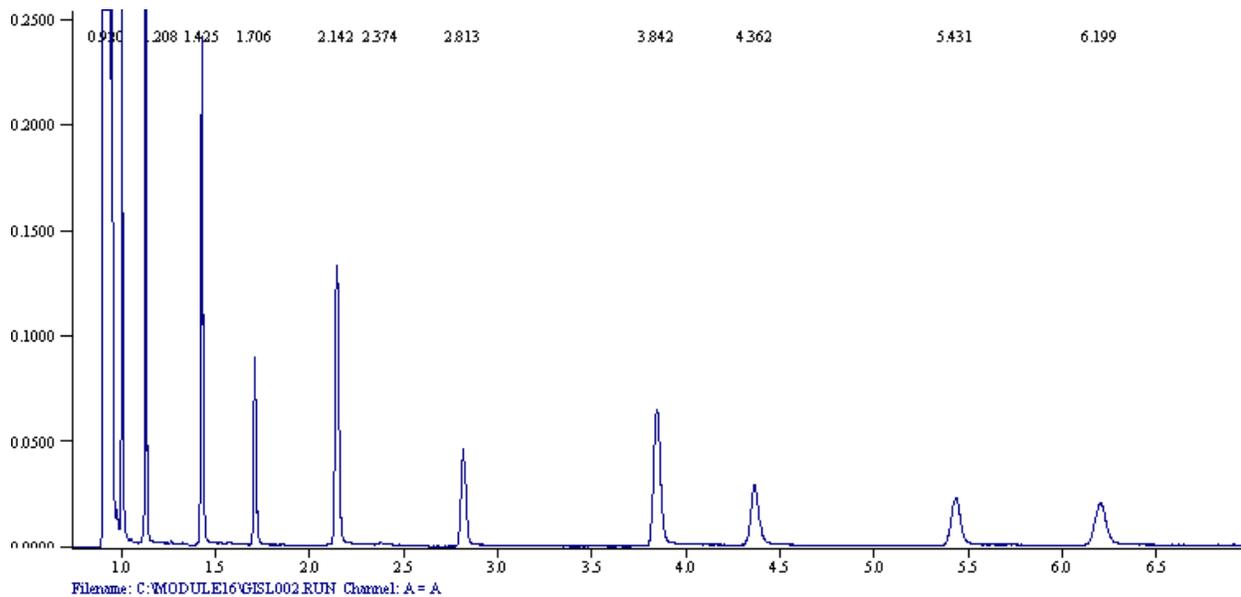


Figura 8: Cromatograma para os ácidos graxos do Padrão MIX F.A.M.E.