

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS PELA LEVEDURA
Meyerozyma guilliermondii BI281A UTILIZANDO RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS
COMO SUBSTRATO**

MARIANA FENSTERSEIFER FABRICIO

PORTO ALEGRE, 2018.

MARIANA FENSTERSEIFER FABRICIO

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS PELA LEVEDURA
Meyerozyma guilliermondii BI281A UTILIZANDO RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS
COMO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador:

Prof. Phd. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientadora:

Profa. Dra. Patricia Valente

PORTO ALEGRE, 2018.

CIP - Catalogação na Publicação

Fabricio, Mariana

Produção de ácidos graxos poli-insaturados pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* BI281A utilizando resíduos agro-industriais como substrato / Mariana Fabricio. -- 2018.

51 f.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub.

Coorientador: Patricia Valente.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. óleo microbiano. 2. lipídeos. 3. glicerol residual. 4. permeado de soro de queijo. I. Antônio Záchia Ayub, Marco, orient. II. Valente, Patricia, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a defesa de Dissertação de Mestrado, cujo projeto intitulado “Produção de ácidos graxos poli-insaturados pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* BI281A utilizando resíduos agro-industriais como substrato” elaborada por Mariana Fensterseifer Fabricio, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comissão Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Daniele Misturini Rossi

Prof^ª. Dr^ª Simone Hickmann Flores

Prof. Dr^ª. Alexandre José Macedo

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Marco Antônio Záchia Ayub, por todo conhecimento e atenção durante o desenvolvimento do trabalho.

À minha co-orientadora, Patrícia Valente, pela ajuda e orientação.

À minha mãe, pelo exemplo, apoio, carinho e esforço para que eu chegasse até aqui.

Ao meu pai, pela força e por acreditar sempre em mim.

À minha irmã pela dedicação, atenção e ajuda.

Aos meus colegas de laboratório, por toda ajuda, suporte e amizade.

Aos meus amigos, que me incentivaram e ajudaram ao longo desta caminhada.

Aos bolsistas Nathan Cadore e Matheus Guilherme da Costa, que acompanharam e ajudaram muito no desenvolvimento do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), seu corpo docente, direção e administração pela oportunidade de realização de trabalhos em minha área de pesquisa.

Às agências de fomento CAPES e FAPERGS, pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta caminhada.

LISTA DE ABREVIACÕES

SCO – Single Cell Oil

TAG - Triacilglicerol

AGPI - Ácidos graxos poli-insaturados

AMP – adenosina monofosfato

ALA – ácido α -linolênico

EPA - Ácido eicosapentanóico

DHA - Decosaexaenóico

CLAE – Cromatografia de alta eficiência

CG – Cromatografia gasosa

C/N – Razão carbono/nitrogênio

CoA – Coenzima A

FAME – Fatty acid methyl ester (metil éster de ácidos graxos)

FID – Flame ionization detector (detector por ionização de chama)

CPS - Concentrado proteico de soro

RESUMO

Leveduras oleaginosas possuem a capacidade de sintetizar grande quantidade de lipídeos em suas células, gerando produtos de alto valor agregado através de um processo sustentável. Um perfil de ácidos graxos poli-insaturados é de grande interesse por parte das indústrias alimentícia e farmacêutica e têm sido alvo de diversos estudos em relação à sua produção e efeitos benéficos à saúde. O presente trabalho teve como objetivo produzir ácidos graxos poli-insaturados pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* BI281 utilizando glicose, glicerol residual e permeado de soro de queijo como fontes de carbono. Avaliou-se o metabolismo da levedura em meios de cultivo com diferentes composições (“meio A” e “base YM”) e comparou-se o seu desempenho em razões C/N 100: 1 e 50:1. A levedura foi capaz de metabolizar todos os substratos testados e o meio de cultivo “A” com glicerol residual e razão C/N 50:1 mostrou-se o mais adequado, obtendo valores de 5,67 g.L⁻¹ de biomassa e 1,04 g.L⁻¹ de lipídeos, representando aproximadamente 18 % do peso da massa seca de biomassa. Esta condição foi escalonada para biorreator de 2 L, onde condições de aeração e controle de pH puderam ser avaliadas, apresentando quantidade semelhante de lipídeos (1,08 g.L⁻¹) e uma maior produção de biomassa (7,05 g.L⁻¹). Os ácidos graxos sintetizados apresentaram em sua composição ácido láurico (C_{12:0}), ácido mirístico (C_{14:0}), ácido palmítico (C_{16:0}), ácido pantoico (C_{16:1}), ácido esteárico (C_{18:0}), ácido oleico (C_{18:1 n-9}), ácido linoleico (C_{18:2 n-6}) e ácido linolênico (C_{18:3 n-3}).

Palavras-chave: óleo microbiano, lipídeos, glicerol residual, permeado de soro de queijo.

ABSTRACT

Oleaginous yeasts are able to synthesize high amounts of lipids in their cells, producing high added-value products through a sustainable process. Food and pharmaceutical companies have great interest in polyunsaturated fatty acids depending on their profiles and many studies related to their production and health benefits have been carried out. The aim of this study was to produce polyunsaturated fatty acids by the yeast *Meyerozyma guilliermondii* BI281A using glucose, crude glycerol, and cheese whey permeate as carbon sources. Yeast metabolism was evaluated in different compositions of culture media ("A" and "YM") and at different C/N ratios (100:1 and 50:1). The yeast was able to assimilate all substrates tested, and medium "A" with crude glycerol as carbon source at a C/N ratio of 50:1 had the most efficient result with biomass production of 5.67 g.L⁻¹ and lipid production of 1.08 g.L⁻¹, which represented 18 % of dry cell weight. This composition was scaled-up to a 2 L bioreactor, where it was possible to measure pH and aeration conditions, and showed similar lipid production (1.08 g.L⁻¹) and higher biomass production (7.05 g.L⁻¹). Fatty acids profile obtained was composed by lauric acid (C_{12:0}), myristic acid (C_{14:0}), palmitic acid (C_{16:0}), palmitoleic acid (C_{16:1}), stearic acid (C_{18:0}), oleic acid (C_{18:1}), linoleic acid (C_{18:2 n-6}), and linolenic acid (C_{18:3 n-3}).

Keywords: microbial oil, lipids, crude glycerol, cheese whey permeate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da acumulação lipídica em microrganismos oleaginosos.	16
Figura 2. Representação esquemática da bioquímica do processo de acúmulo de lipídeos.....	17
Figura 3. Biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados.	18
Figura 4. Fluxograma da produção de queijo e subprodutos.....	20
Figura 5. Composição soro de queijo e permeado de soro de queijo.	21
Figura 6. Representação esquemática dos meios de cultura utilizados no presente trabalho...24	
Figura 7. Experimento preliminar para avaliação do comportamento da levedura através de cinética em meio contendo glicose como fonte de carbono.	27
Figura 8. Experimento preliminar para avaliação do comportamento da levedura através de cinética em meio contendo glicerol residual como fonte de carbono.....	28
Figura 9. Experimento preliminar para avaliação do comportamento da levedura através de cinética em meio contendo permeado de soro de queijo como fonte de carbono..	28
Figura 10. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “A” contendo glicose como fonte de carbono.	30
Figura 11. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “A” contendo glicerol residual como fonte de carbono e razão C/N 100:1.....	31
Figura 12. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “A” contendo glicerol residual como fonte de carbono e razão C/N 50:1.....	31
Figura 13. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “A” contendo permeado de soro de queijo como fonte de carbono e razão C/N 100:1.....	33
Figura 14. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “A” contendo permeado de soro de queijo como fonte de carbono e razão C/N 50:1.....	33
Figura 15. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “Base YM” contendo glicerol como fonte de carbono e razão C/N 100:1.....	36
Figura 16. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “Base YM” contendo glicerol como fonte de carbono e razão C/N 50:1.....	36
Figura 17. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em biorreator contendo glicerol como fonte de carbono e razão C/N 50:1.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo lipídico (%) e perfil de ácidos graxos de plantas e microrganismos oleaginosos.	13
Tabela 2. Composição dos meios de cultivo utilizados nos experimentos preliminares.....	22
Tabela 3. Composição centesimal (base úmida) (%) do glicerol residual e do permeado de soro de queijo	23
Tabela 4. Resultados obtidos nas cinéticas com meio a utilizando diferentes fontes de carbono como substrato.	35
Tabela 5. Perfil de ácidos graxos produzidos em biorreator com glicerol como fonte de carbono.	39

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	11
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Óleo microbiano	13
2.2 Condições do acúmulo de lipídeos	15
2.3 Resíduos agro-industriais como matéria-prima para a produção de ácidos graxos ...	19
2.3.1 Glicerol residual	19
2.3.2 Permeado de soro de queijo.....	20
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Microrganismos e manutenção celular	22
3.2 Experimentos preliminares para avaliar o metabolismo da levedura	22
3.3 Meios de cultivo.....	23
3.4 Produção de ácidos graxos em frascos agitados	24
3.5 Produção de ácidos graxos em biorreator	24
3.6 Determinação de biomassa	25
3.7 Extração de lipídeos.....	25
3.8 Determinação do consumo de substrato	25
3.9 Análise do perfil lipídico	26
3.10 Análise estatística	26
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Experimentos preliminares para avaliar condições de cultivo da levedura	27
4.2 Produção de ácidos graxos com “meio A”	29
4.3 Produção de ácidos graxos com “base YM”.....	35
4.4 Produção de ácidos graxos em biorreator de cultivo submerso.....	38
4.5 Perfil dos ácidos graxos produzidos em biorreator.....	39
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO.....	42
CAPÍTULO 6 - PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Óleos microbianos, conhecidos como Single Cell Oils (SCO), são os lipídeos armazenados de forma intracelular e compostos por triacilgliceróis (TAG). Os microrganismos oleaginosos, capazes de acumular mais de 20 % de sua biomassa em lipídeos, têm sido utilizados como fontes alternativas para produção de óleos (RATLEDGE, 2010). Dependendo do microrganismo utilizado, o perfil lipídico pode variar fazendo com o que o óleo produzido tenha diversas aplicações industriais. Bactérias acumulam óleos de interesse para biocombustíveis, visto que estes normalmente não são apropriados para o consumo humano. Já microrganismos eucarióticos, como leveduras, produzem óleos comestíveis e que possuem composição similar a óleos e gorduras encontrados em plantas ou animais (RATLEDGE, 2010).

Os fatores para avaliação do potencial dos microrganismos oleaginosos são a capacidade de utilização de substratos econômicos, a qualidade e a quantidade do óleo produzido (THEVENIEAU E NICAUD, 2013). Estudos sobre a utilização de substratos de baixo custo têm sido desenvolvidos utilizando resíduos das indústrias agro-alimentares e do biodiesel, como soro de queijo (AKPINAR-BAYIZIT et al., 2014), casca de arroz (ECONOMOU, CH N. et al., 2011), xilose e glicerol (PAPANIKOLAOU E AGGELIS, 2002; FAKAS et al., 2009). Além do material utilizado como substrato, a qualidade do óleo produzido pelos microrganismos também é uma característica de grande importância. Recentes estudos têm demonstrado que o consumo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), como ômega 3, trazem vários benefícios à saúde. O estudo do metabolismo de microrganismos capazes de sintetizar AGPI vem crescendo, pois o consumo regular de alguns deles auxilia na prevenção de doenças crônicas, como diabetes, obesidade, artrite reumatoide, depressão, asma, doenças auto-imunes e cardiovasculares (SIMOPOULOS, 2006). Dentre os AGPI, destacam-se o ácido linolênico (ALA), o ácido eicosapentanóico (EPA) e o decosaenóico (DHA). Estudos indicam que a ingestão de DHA auxilia no desenvolvimento do cérebro e dos olhos em bebês, além de auxiliar na saúde do coração (WARD E SINGH, 2005).

Em virtude da importância do consumo de AGPI, as indústrias de alimentos demandam grande quantidade destes lipídeos para fortificação e/ou suplementação de alimentos (BELLOU et al., 2016). Em comparação a outros microrganismos, as leveduras e os fungos oleaginosos acumulam maior quantidade de lipídeos ricos em ácidos graxos poli-

insaturados (RATLEDGE, 1994). O interesse na utilização destes microrganismos para este fim se torna ainda maior porque as fontes convencionais de ácidos graxos poli-insaturados são principalmente óleos oriundos de peixes. O uso deste óleo como suplemento possui limitações naturais e sensoriais, pois promovem a redução da população de peixes, possuem odor indesejável e a presença de metais pesados (BELLOU et al., 2016). Outra questão que favorece a utilização de ácidos graxos oriundos de microrganismos é o fato destes não competirem com a cadeia produtiva de alimentos, visto que a sua produção é independente de mudanças climáticas e sazonalidade e não utiliza terras aráveis (OCHSENREITHER et al., 2016).

O rápido crescimento populacional e a busca por alimentos mais nutritivos demandam da indústria uma utilização cada vez maior de AGPI. Devido à necessidade em encontrar-se fontes alternativas e econômicas para produção destes óleos, o presente projeto de pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico do emprego da levedura *Meyerozyma guilliermondii* BI281A, recentemente isolada no Rio Grande do Sul, para a produção de ácidos graxos poli-insaturados, utilizando diferentes resíduos agro-industriais como substrato. A escolha deste microrganismo baseou-se no fato de, além de ter demonstrado potencial em estudo realizado anteriormente, ainda desconhece-se seu metabolismo quanto a síntese de lipídeos e foi pouco estudada na literatura quanto à produção de óleo.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar a capacidade de síntese de ácidos graxos poli-insaturados pela *Meyerozyma guilliermondii* BI281A;
2. Avaliar os resíduos permeado de soro de queijo (agroindustrial) e glicerol (produção de biodiesel) como substratos para a produção de óleo microbiano;
3. Escalonar o processo de produção de óleo em biorreatores de bancada;
4. Avaliar o perfil lipídico dos ácidos graxos produzidos através de cromatografia gasosa.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÓLEO MICROBIANO

Todos os organismos vivos sintetizam uma quantidade mínima de gordura para manutenção de suas funções, no entanto apenas um pequeno número de microrganismos é capaz de acumular mais que 20 % de sua biomassa em lipídeos (RATLEDGE, 2004). Os óleos produzidos por estes microrganismos, conhecidos como Single Cell Oils (SCO), são uma alternativa aos óleos vegetais e à gordura animal (Tabela 1) (RATLEDGE, 2010). Além disso, possuem grande potencial como matéria prima para a produção de biocombustíveis e óleos comestíveis, pois são renováveis, possuem alta taxa de crescimento e não sofrem influências climáticas (LI et al., 2008; ZHU et al., 2008; BELLOU et al., 2016). A quantidade e a composição dos lipídeos produzidos variam de acordo com a espécie da levedura, as condições de cultivo, a disponibilidade de nutrientes e a fonte de carbono (EASTERLING et al., 2009).

Tabela 1. Conteúdo lipídico (%) e perfil de ácidos graxos de plantas e microrganismos oleaginosos.

	Conteúdo lipídico (%)	C14:10	C16:10	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Oleaginosas								
Amendoim	50		11	0	2	48	32	
Girassol	45		7		5	19	68	1
Soja	20		11		4	24	54	7
Frutos de árvores								
Coco	50	18	9		3	6	2	
Oliva	15 -35		13	1	3	71	10	
Palma	50	1	14		4	38	10	
Microrganismos								
Leveduras								
<i>Cryptococcus albidus</i>	60		12	1	3	73	12	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63		34	6	5	51	3	

Tabela 1. Conteúdo lipídico (%) e perfil de ácidos graxos de plantas e microrganismos oleaginosos (continuação).

	Conteúdo lipídico (%)	C14:10	C16:10	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	66		18	3	3	66		
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72		37	1	3	47	8	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36		11	6	1	28	51	
Fungos								
<i>Mortirella isabelina</i>	50		29		3	55	3	3 (n-6)
<i>Mucor circinelloides</i>	25		22		5	38	10	15 (n-6)
<i>Aspergillus terreus</i>		2	23		traço	14	40	
Bacteria								
<i>Rhodococcus opacus</i>	19-26				3-19	6-74		
Microalgas								
<i>Chlorella sp</i>	28-32		7-19	10,9	1-4	8-9	1-14	16-19
<i>Chlorella zofingiensis</i>	28-32		23	2	2	36	18	8
<i>Chatocerus muelleri</i>	31-68	18-40	5-40		0-25	0-4	0-5	0-5

Fonte: Adaptado de Thevenieau e Nicaud (2013).

O interesse em óleos produzidos por microrganismos para o consumo humano cresceu com o surgimento de evidências de que ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa são importantes para a saúde (RATLEDGE, 2010). Os principais compostos produzidos por microrganismos oleaginosos são ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) (FEI et al., 2011).

As leveduras destacam-se em relação aos outros microrganismos para a produção de Single Cell Oils pela sua morfologia e condições de cultivo, que facilitam o manejo em larga escala (PAPANIKOLAOU E AGGELIS, 2011a). Além disso, possuem vantagem em relação

à particularidade dos lipídeos produzidos, que podem substituir ácidos graxos de alto valor comercial encontrados em plantas e no reino animal (PAPANIKOLAOU, 2011). Algumas espécies de leveduras estudadas são *Yarrowia lipolytica*, *Candida 107*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Cryptococcus curvatus*, *Trichosporon pullulan* e *Lipomyces lipofer* (LAMERS et al., 2016).

A espécie *Yarrowia lipolytica* é uma das mais relatadas na literatura, tendo seu metabolismo extensamente estudado e que serve de exemplo para as demais leveduras oleaginosas (PAPANIKOLAOU E AGGELIS, 2002; 2011b; TSIGIE et al., 2011). Além disso, diversos estudos foram realizados avaliando condições de cultivo e através de modificações genéticas nesta espécie, com intuito de alcançar altos teores de lipídeos intracelulares e perfis de ácidos graxos poli-insaturados (MATTANNA et al., 2014; POLI et al., 2014; XIE et al., 2015; BELLOU et al., 2016).

A levedura *Meyerozyma guilliermondii*, conhecida anteriormente por *Pichia guilliermondii*, já foi relatada como oleaginosa (WANG, 2012), no entanto pouquíssimos estudos a respeito do seu metabolismo foram publicados e ainda há muito a se explorar. Ramírez-Castrillón e colaboradores (2017) desenvolveram experimentos anteriores, reportando a capacidade de acúmulo de lipídeos na linhagem utilizada no presente trabalho e otimizaram as condições de agitação e temperatura para a levedura *Meyerozyma guilliermondii* B281A. Além disso, também testaram diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol puro e glicerol residual) e nitrogênio (peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, triptona, NH_4NO_3 e extrato de malte).

2.2 CONDIÇÕES DO ACÚMULO DE LIPÍDEOS

Os parâmetros que influenciam a produção de óleo microbiano são temperatura, pH, aeração, substrato e a disponibilidade de nutrientes (BELLOU et al., 2016). Para que ocorra o acúmulo de lipídeos em um microrganismo oleaginoso é necessário que o meio de cultura tenha um excesso de fonte de carbono e uma quantidade de nitrogênio limitante. Desta forma, quando o microrganismo se multiplica, a fonte de nitrogênio se esgota rapidamente e a fonte de carbono continua sendo assimilada e é convertida em lipídeos intracelulares (Figura 1). Quando um microrganismo não-oleaginoso é cultivado nas mesmas condições, a multiplicação de células também cessa após o esgotamento da fonte de nitrogênio. No

entanto, se a fonte de carbono continua sendo assimilada, esta passa a ser convertida em biomassa (RATLEDGE, 2004).

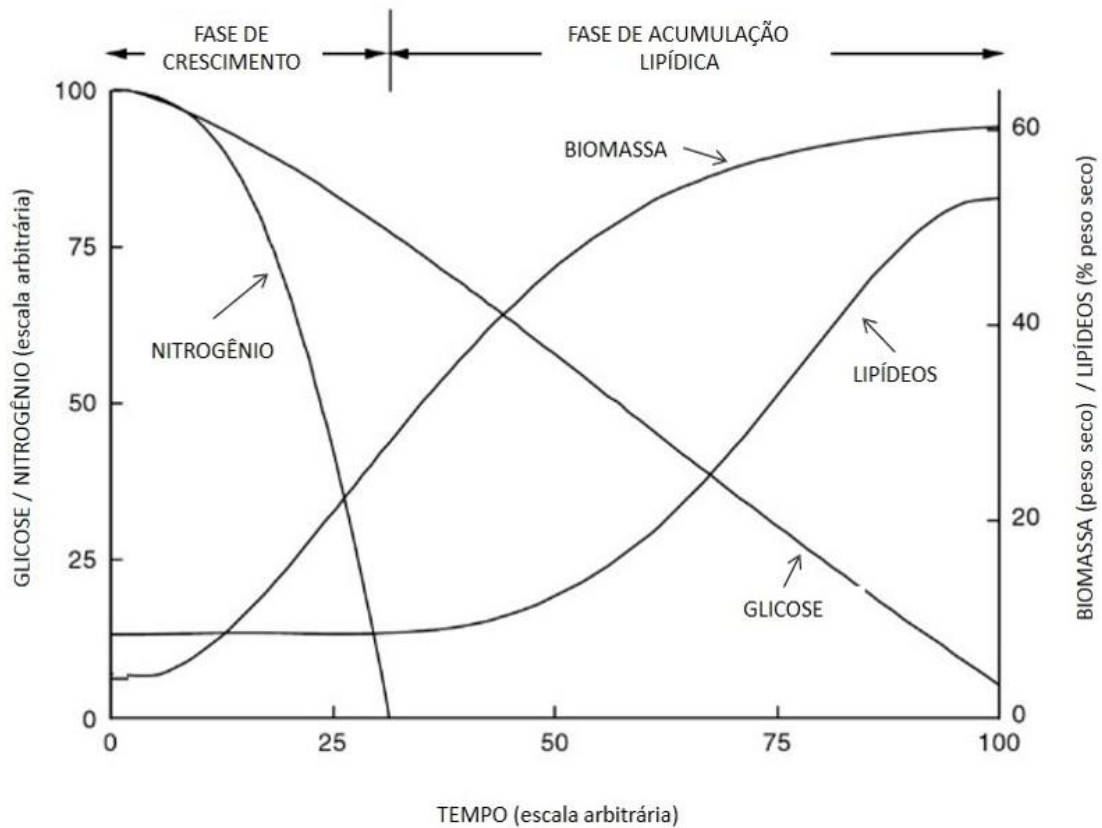


Figura 1. Representação esquemática da acumulação lipídica em microrganismos oleaginosos.

Fonte: Adaptado de Ratledge (2004).

A síntese de lipídeos pode ocorrer por duas vias metabólicas: a “*ex novo*” e a “*de novo*” (BEOPOULOS et al., 2011). Pela via “*ex novo*”, o processo de acúmulo de lipídeos ocorre quando substâncias hidrofóbicas são utilizadas como substrato. Já pela via “*de novo*”, o acúmulo ocorre quando a glicose ou outro composto hidrofílico é utilizado como substrato (PAPANIKOLAOU, 2011). Neste caso, a molécula precursora para a biossíntese de ácidos graxos é o acetil-CoA e sua formação tem sido atribuída devido à presença da enzima ATP citrato liase (ACL) (RATLEDGE, 2004). Em leveduras esta molécula provém do citrato, que se torna disponível no citosol após uma série de transformações induzidas pelas condições limitantes da fonte de nitrogênio bioquímicas (Figura 2) (BELLOU et al., 2016).

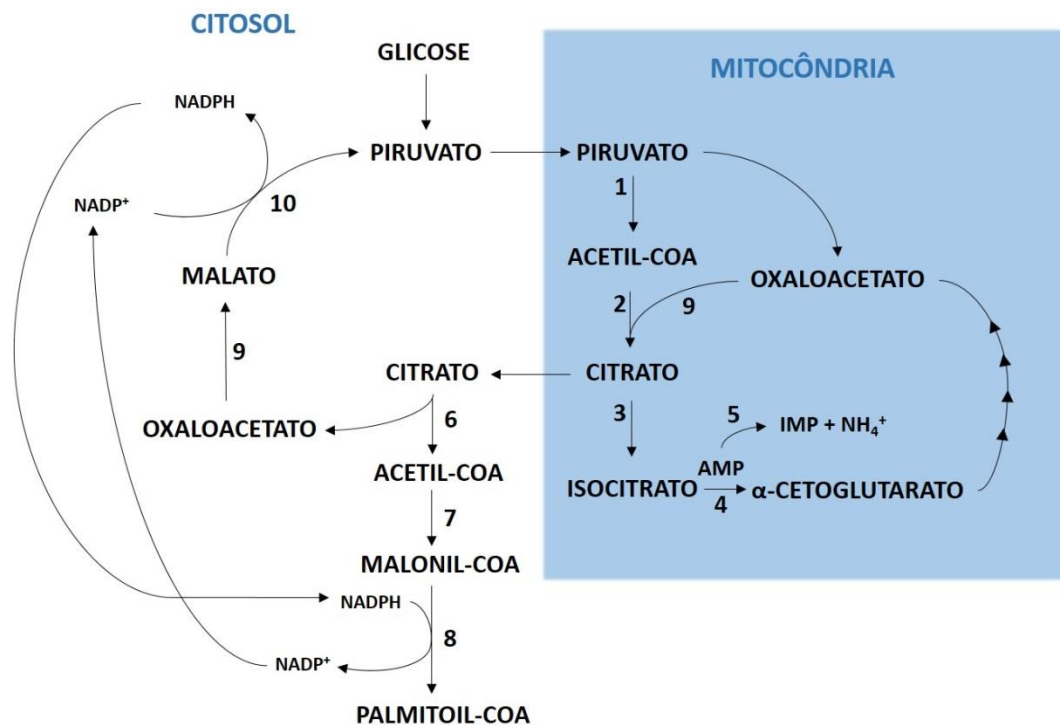


Figura 2. Representação esquemática da bioquímica do processo de acúmulo de lipídeos. Enzimas: 1, piruvato-desidrogenase; 2, citrato-sintase; 3, aconitase; 4, isocitrato-desidrogenase; 5, AMP desaminase; 6, ATP citrato liase; 7, acetil-coA carboxilase; 8, ácido graxo sintase; 9, malato desidrogenase; 10, enzima málica.

Fonte: Adaptado de Ratledge (2004).

Quando a fonte de nitrogênio começa a se esgotar, as células apresentam um aumento na atividade da AMP-desaminase em até cinco vezes. Com isso, ocorre a degradação da AMP (adenosina monofosfato) intracelular e sua diminuição na mitocôndria desativa a enzima isocitrato desidrogenase. Isto resulta no acúmulo do citrato, que entra no citoplasma em troca com o malato e é convertido em oxalacetato e acetil-CoA pela enzima ATP citrato liase. O acetil-CoA é utilizado para a biossíntese de ácidos graxos, enquanto o oxalacetato é convertido em malato (RATLEDGE, 2004).

A síntese de ácidos graxos poli-insaturados acontece a partir daqueles que possuem 16 e 18 carbonos. Estes são modificados pela ação das enzimas dessaturases, que atuam removendo dois hidrogênios para a formação de uma dupla ligação, e das alongases, que promovem a adição de dois carbonos na cadeia (Figura 3) (SARDESAI, 1992; RATLEDGE, 2004)

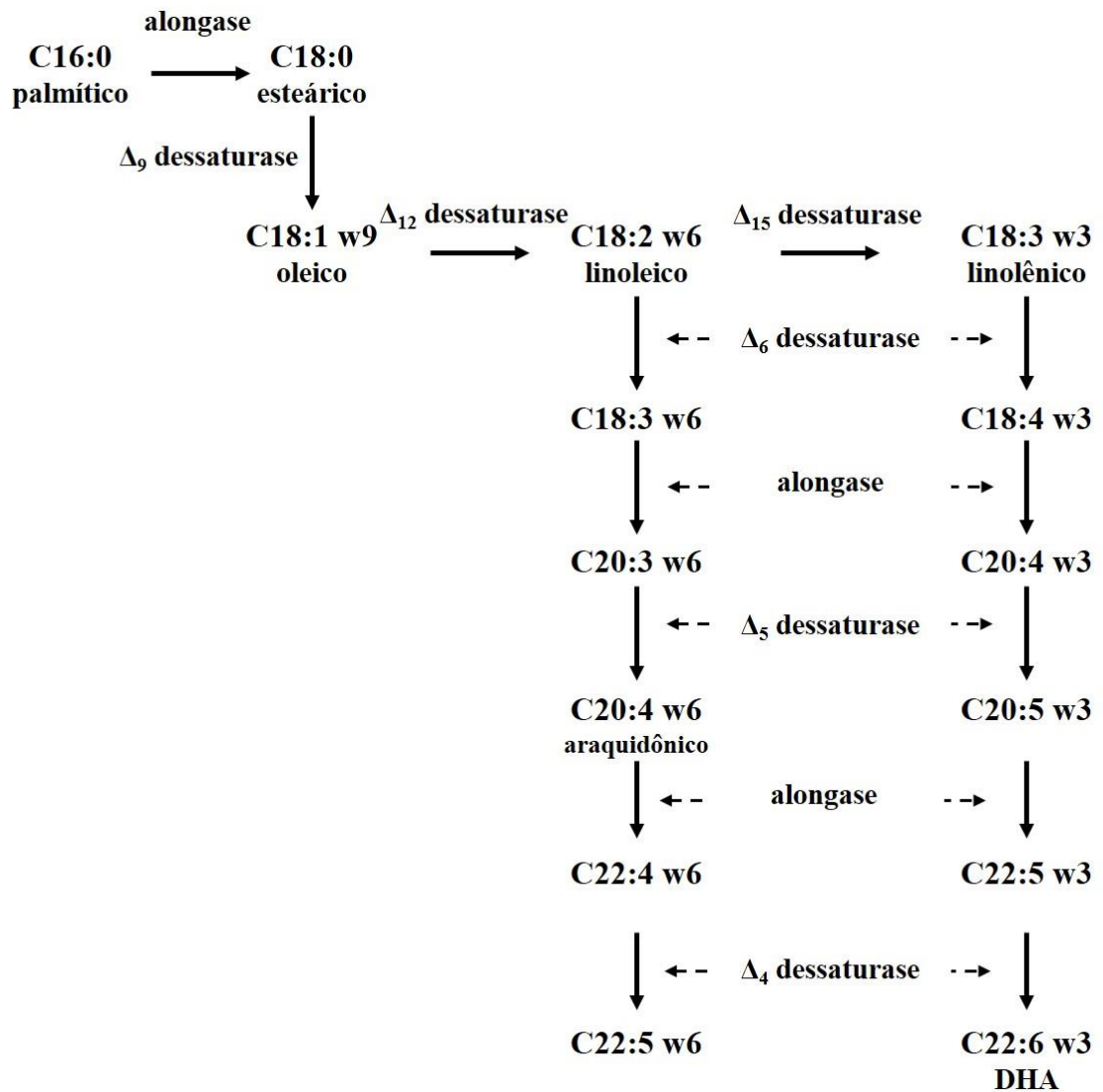


Figura 3. Biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados.

Fonte: Adaptado de Ratledge (2004).

Os ácidos graxos poli-insaturados têm sido muito estudados e seus benefícios nas funções biológicas incluem o estímulo ao crescimento, manutenção da integridade da membrana das células, da pele e do crescimento do cabelo (SARDESAI, 1992). A ingestão de ALA (C_{18:3} n-3) tem efeitos positivos em relação às doenças cardiovasculares, níveis de lipídeos no sangue, arritmia e possui propriedades anti-inflamatórias (BARCELÓ-COBLIJN E MURPHY, 2009). Além disso, o ALA é precursor dos ácidos graxos de cadeia longa EPA (C_{20:5} n-3) e DHA (C_{22:6} n-3) (Figura 3), conhecidos por seus benefícios na saúde do coração e mental, sistema imunológico e no desenvolvimento cognitivo infantil (XIE et al., 2015).

2.3 RESÍDUOS AGRO-INDUSTRIAIS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A identificação de microrganismos capazes de produzir lipídeos a partir de resíduos ou subprodutos do setor agroindustrial aumenta a viabilidade do processo e traz benefícios para o meio ambiente, pois reduzem o descarte dos mesmos (FAKAS et al., 2008).

Os óleos microbianos possuem vantagens em comparação aos óleos vegetais, no entanto, os custos de produção ainda são altos. A principal fonte de carbono utilizada é a glicose e, no meio de cultura, este composto representa em média 80 % dos custos. Para minimizar os gastos, fontes provenientes de resíduos agroindustriais, têm sido estudadas como alternativas de baixo custo (TSIGIE et al., 2011).

A principal matéria-prima para o biodiesel é o óleo vegetal, como óleo de canola ou de soja. Com o aumento do incentivo para a produção de biocombustíveis nos últimos anos, há uma crescente demanda de terras destinadas ao cultivo da matéria-prima para biodiesel, o que resulta na competição com plantações destinadas ao consumo humano e um aumento no preço dos alimentos (POLI et al., 2014). Além disso, o alto custo da matéria-prima para a produção de biodiesel ocasiona o crescimento no interesse na utilização de óleos microbianos (LI et al., 2008). Substratos de baixo custo, como resíduos agro-industriais, possuem um papel chave na industrialização destes óleos e vêm sendo estudados, tais como a casca de arroz (ECONOMOU et al., 2011), o bagaço de cana de açúcar (TSIGIE et al., 2011), o sorgo sacarino (ECONOMOU, CH N. et al., 2011), o hidrolisado de milho (CHANG et al., 2013) e o soro de queijo (AKPINAR-BAYIZIT et al., 2014; CASTANHA et al., 2014).

2.3.1 Glicerol residual

A produção de biodiesel gera em média 10 % de glicerol como subproduto. Este é conhecido como glicerol residual ou glicerol bruto e sua composição varia dependendo do tipo de catalisador utilizado na produção do biodiesel, da eficiência da transesterificação, de impurezas na matéria-prima e se o metanol é recuperado ao final do processo (YANG et al., 2012). Normalmente sua composição consiste em 60 – 80 % de glicerol (THOMPSON E HE, 2006) e contém impurezas como cinzas, sabões, ácidos graxos livres e solventes, como metanol, etanol ou água (UPRETY et al., 2017).

O glicerol bruto é um exemplo de matéria-prima sustentável e de baixo custo que pode ser utilizada como fonte única de carbono por alguns microrganismos na produção de Single Cell Oils (LIU et al., 2017). Diversas leveduras são conhecidas pela sua capacidade de utilizá-lo para a produção de lipídeos, como *Cryptococcus curvatus*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium toruloides*, *Trichosporon fermentans*, *Lipomyces starkeyi* (XU et al., 2012; TCHAKOUTEU et al., 2015; DOBROWOLSKI et al., 2016; LIU et al., 2017).

2.3.2 Permeado de soro de queijo

O permeado de soro de queijo é um resíduo agroindustrial obtido pela concentração proteica do soro de queijo oriundo das indústrias de laticínios. No processo de produção do queijo (Figura 4), após a precipitação da caseína, é gerado como resíduo uma grande quantidade de soro, que representa 85-95 % do volume de leite e retém 55 % dos nutrientes do mesmo. O soro de queijo é composto por lactose, proteínas solúveis, lipídeos e sais minerais (Figura 5) (SISO, 1996). Este subproduto é utilizado para obtenção de isolado proteico de soro, através da ultrafiltração, que gera como resíduo grandes volumes de lactose, denominado permeado de soro de queijo (SMITH, 2008).

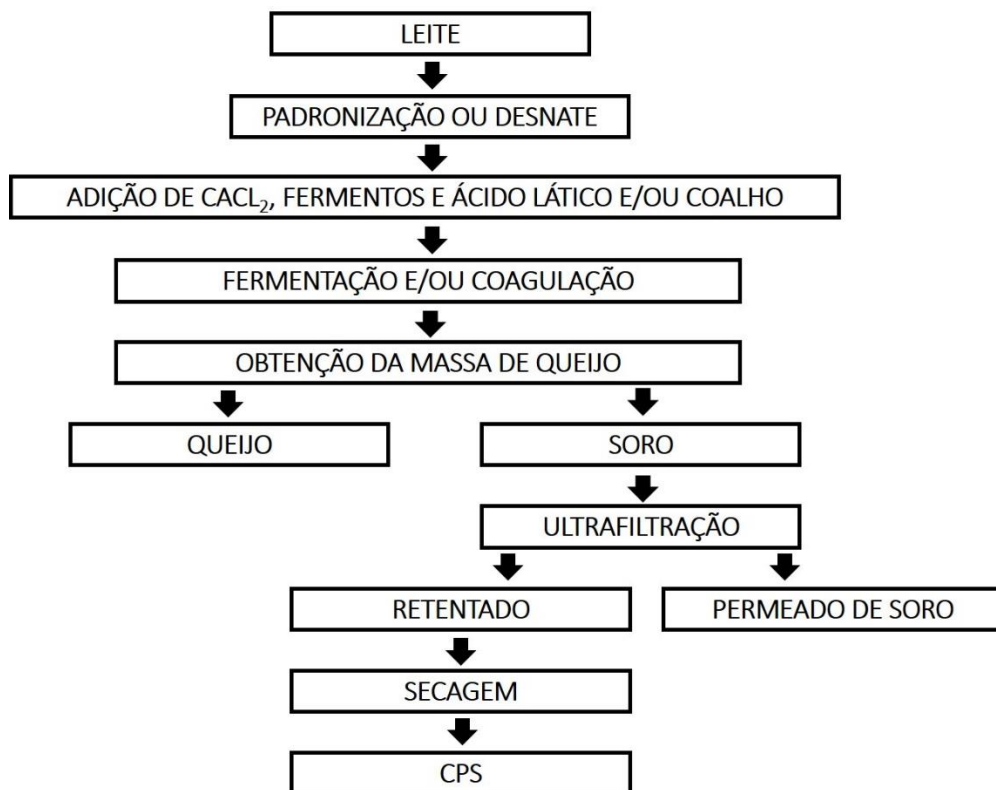


Figura 4. Fluxograma da produção de queijo e subprodutos (CPS - Concentrado proteico de soro).
Fonte: Adaptado de Zacarchenco e colaboradores (2012).

Além da lactose, sais mineirais e vitaminas também atravessam a membrana de ultrafiltração, tornando esse resíduo ainda mais interessante para usos em processos biotecnológicos (SISO, 1996; SMITH, 2008).

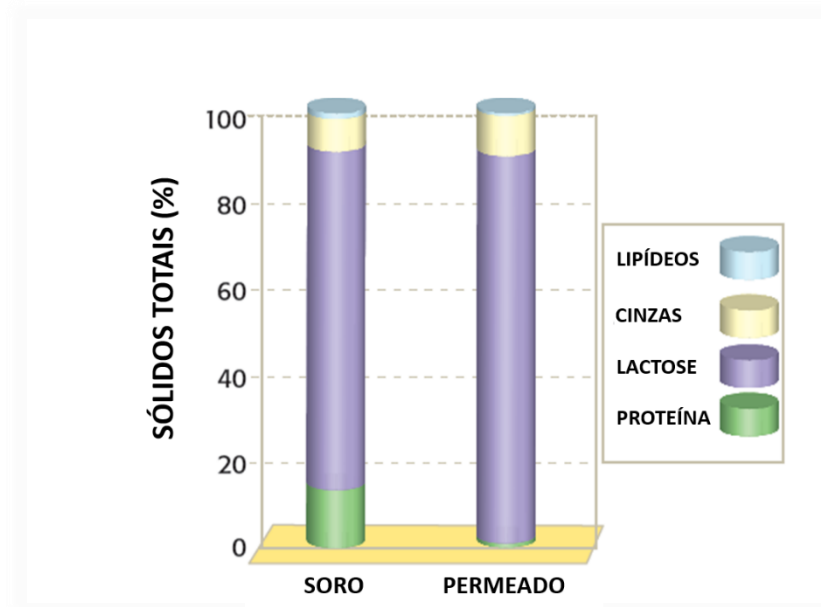


Figura 5. Composição soro de queijo e permeado de soro de queijo.
Fonte: Smith (2008).

Tanto o soro quanto o permeado de queijo causam danos ambientais se descartados sem tratamento, devido ao seu alto conteúdo de nutrientes (EL-KHAIR, 2009). O seu aproveitamento evita custos com tratamento de efluentes e oferece uma matéria-prima de baixo custo para geração de compostos de interesse em bioprocessos, o que enfatiza a importância de ampliar as possibilidades de aproveitamento destes subprodutos (ZACARCHENCO et al., 2012).

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS E MANUTENÇÃO CELULAR

A levedura oleaginosa *Meyerozyma guilliermondii* BI281A utilizada neste trabalho foi isolada de folhas de bromélias no Parque Estadual de Itapuã, RS (RAMÍREZ-CASTRILLÓN et al., 2017). Em trabalhos anteriores, esta levedura demonstrou sua capacidade de síntese de lipídeos que, no entanto, não foi estudado em detalhes (RAMÍREZ-CASTRILLÓN et al., 2017). Esta linhagem foi estocada em solução contendo 40 % de glicerol e mantida a -20°C.

Para manutenção celular durante os experimentos, a linhagem foi mantida em placas contendo meio YM (g.L⁻¹) (10 glicose, 5 peptona, 3 extrato de levedura, 3 extrato de malte, 20 ágar) renovadas a cada 30 dias. Após o repique, as placas foram incubadas por 48 h a 26 °C e posteriormente armazenadas a 4 °C. Para obtenção de biomassa metabolicamente ativa, uma colônia isolada foi transferida para 25 mL de meio de cultura YM líquido, em frascos Erlenmeyers de 125 mL, e mantida sob agitação orbital de 150 rpm a 26 °C por 12 h.

3.2 EXPERIMENTOS PRELIMINARES PARA AVALIAR O METABOLISMO DA LEVEDURA

Foram avaliados, sem repetição, os três meios de cultura apresentados na Tabela 2, com razão C/N 20:1, a fim de verificar a capacidade da levedura de metabolizar as três fontes de carbono empregadas neste estudo: glicose, glicerol residual e lactose (oriunda do permeado de soro de queijo).

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo utilizados nos experimentos preliminares.

Componentes (g.L ⁻¹)	Meio Glicose	Meio glicerol residual	Meio Lactose
Glicose	50	-	-
Glicerol residual	-	48,8	-
Permeado de soro de queijo	-	-	48,6
Extrato de levedura	3	3	3
Extrato de malte	3	3	3
Peptona	5	5	5

3.3 MEIOS DE CULTIVO

As três fontes de carbono testadas no item 3.2 foram utilizadas para o processo de acúmulo de lipídeos em diferentes composições de meios de cultura.

O glicerol residual foi fornecido por uma empresa de produção de biodiesel (Canoas, Brasil) e o permeado de soro de queijo pela empresa Sooro (Paraná, Brasil). Suas composições estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3. Composição centesimal (base úmida) (%) do glicerol residual e do permeado de soro de queijo.

Componentes	Glicerol Residual	Permeado de soro de queijo
Lactose	-	90,86
Glicerol	82,97	-
Proteína	-	3,02
Cinzas (sais mineirais)	traços	5,13
Umidade	10,62	0,99
NaCl	5,72	-
Monoacilgliceróis	0,75	-

*Fonte: Dados fornecidos pelos fabricantes;

Foram testadas duas composições de meio de cultivo, variando nelas a fonte de carbono e a razão C/N. A primeira composição foi baseada no meio indutor para o acúmulo de lipídeos (“Meio A”) proposto por Papanikolaou e Aggelis (2002), desenhado com uma razão C/N 100:1 e a seguinte composição (g.L^{-1}): 7 KH_2PO_4 , 2,5 Na_2HPO_4 , 1,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 CaCl_2 , 0,02 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 Extrato de levedura bruto, 50 Glicose; pH 6,0. Para fins de comparação das fontes de carbono, foram realizados experimentos substituindo a glicose por glicerol residual e permeado de soro de queijo. A quantidade da fonte de carbono para estes substratos foi calculada através da molaridade e das suas respectivas composições para obtenção da mesma razão C/N (100:1) e, para o glicerol residual e permeado de soro de queijo, também na razão C/N 50:1. A cinética com razão C/N 50:1 não foi realizada com glicose, pois o objetivo do trabalho visava utilizar substratos de

baixo custo e esta foi utilizada apenas para verificar o comportamento da levedura nesta condição.

A segunda composição, “base YM”, foi baseada no meio citado na Tabela 2, utilizando glicerol residual como fonte de carbono nas razões C/N 100:1 e 50:1, ajustadas através do cálculo da massa molar das fontes de nitrogênio.

Todos os meios de cultura utilizados neste estudo foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos.

A Figura 6 apresenta um diagrama exemplificando os meios de cultivo utilizados.

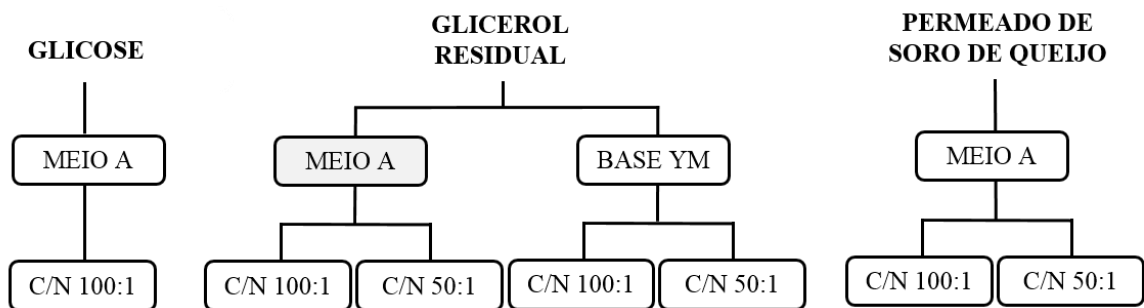


Figura 6. Representação esquemática dos meios de cultura utilizados no presente trabalho.

3.4 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM FRASCOS AGITADOS

Para a produção de ácidos graxos, o experimento foi conduzido em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura. Foram realizadas sete cinéticas, em duplicata, com os meios de cultura citados no item 3.3.

Após obtenção da biomassa metabolicamente ativa, conforme item 3.1, uma alçada do meio líquido foi transferida para o pré-inóculo contendo o mesmo meio que a posterior fermentação. Em cada frasco foi adicionado 10 % do pré-inóculo com concentração celular medida através da densidade óptica e incubou-se em agitador horizontal a 26 °C e 150 rpm, durante 120 h. Foram avaliados consumo de substrato, biomassa e lipídeos. As condições de temperatura e agitação foram otimizadas anteriormente por Ramírez-Castrillón e colaboradores (2017).

3.5 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM BIORREATOR

O meio A com razão C/N 50:1 contendo glicerol como fonte de carbono foi escalonado para biorreator de 2L BIOSTAT B2 (Braun Biotech International, Alemanha) equipado com controle de temperatura, pH, agitação e aeração. O pré-inóculo foi realizado conforme item 3.4 e 200 ml do mesmo ($DO_{600nm}=1$) foram transferidos para 1800 mL de meio de cultura. O experimento foi realizado durante 120 h e as condições de operação foram de 26 °C, agitação de 400 rpm, taxa de aeração de 6 L.min⁻¹. O pH foi mantido em 6,0, utilizando-se HCl 3 M e NaOH 3 M como soluções de ácido e base, respectivamente. As condições de agitação, aeração e pH foram padronizadas conforme Wang e colaboradores (2012). Durante o cultivo foi adicionado 0,1 g.L⁻¹ de antiespumante (Antifoam 204, Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

3.6 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA

A biomassa foi avaliada por análise gravimétrica ao longo da fermentação. Foram coletados, em duplicata, 5 ml de amostra, filtrados em papel filtro (0,22 µm), lavadas com água destilada e secas em balança de infravermelho (Ohaus MB-35, Parsippany, USA).

3.7 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

A extração de lipídeos foi realizada pela metodologia de Bligh & Dyer (1959) em duplicata. A biomassa liofilizada foi ressuspensa em clorofórmio/ metanol (2:1, v/v), e a lise celular foi realizada com o homogeneizador T 18 BASIC ULTRA- TURRAX / IKA por 6 min, com gelo para evitar o aquecimento da amostra. A lise foi seguida por filtração em papel filtro e os solventes foram evaporados a 60 °C em rota-evaporador. As amostras foram secas por 24 h até peso constante e pesadas em balança analítica.

3.8 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE SUBSTRATO

O consumo de substrato foi analisado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, Japão), com detector de índice de refração pela coluna Bio-Rad Aminex HPX 87H. Para o preparo das amostras o meio de cultura foi centrifugado e o

sobrenadante filtrado em membranas de acetato celulose (0,22 μ m). A fase móvel utilizada foi solução de ácido sulfúrico 5 mM. Para análise da concentração de glicose e lactose a vazão utilizada foi 0,6 mL.min⁻¹ a 45 °C. Para quantificação do glicerol a condição utilizada foi 0,8 mL.min⁻¹ a 65 °C.

3.9 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO

Os lipídeos produzidos em biorreator foram avaliados quanto ao seu perfil de ácidos graxos através de cromatografia gasosa (CG). Foi utilizado o equipamento da marca Shimadzu GC -14B, com detector FID, equipado com coluna capilar Rtx-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e H₂ como gás de arraste. As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas para 250 °C e 260 °C e programação da coluna foi 140 °C, 40 °C/ min até 280 °C. A identificação dos ácidos graxos foi realizada utilizando o FAME MIX (Supelco 37 FAME Mix, Sigma, Bellefonte, USA) como padrão.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, com auxílio do software Statistica 12 (Stasoft, USA), ao nível de 5 % de significância. Todos os experimentos, com exceção dos testes preliminares, foram realizados em duplicata.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES PARA AVALIAR CONDIÇÕES DE CULTIVO DA LEVEDURA

A primeira etapa do presente trabalho foi avaliar a capacidade da levedura *Meyerozyma guilliermondii* BI281A de metabolizar os substratos em estudo para conhecer seu comportamento. Para isso, foram realizadas as cinéticas apresentadas nas Figuras 7, 8 e 9.

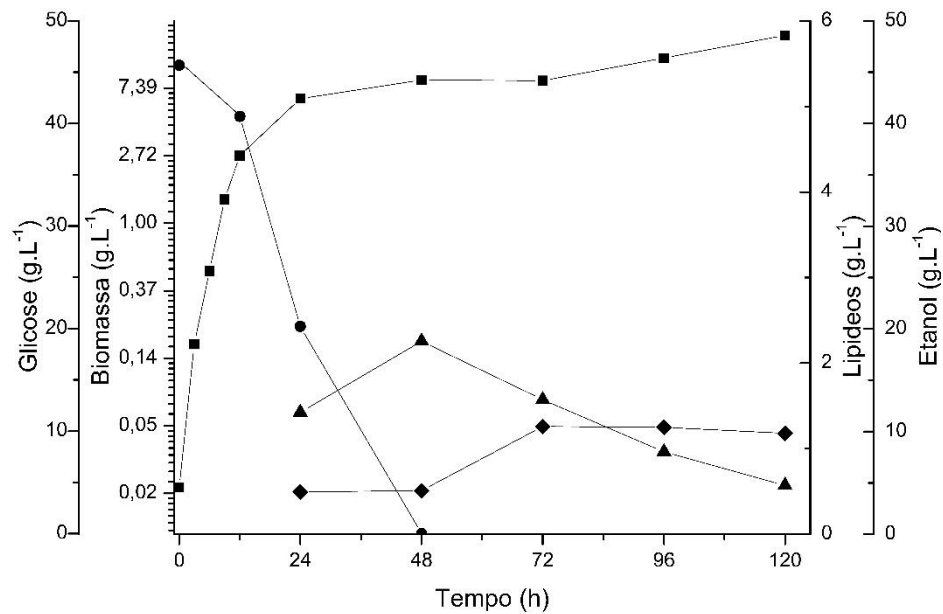


Figura 7. Experimento preliminar para avaliação do comportamento da levedura através de cinética em meio contendo glicose como fonte de carbono. Biomassa (g.L⁻¹) (■); Glicose (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); Etanol (g.L⁻¹) (▲); As condições de cultivo foram 150 rpm a 26 °C por 120 h.

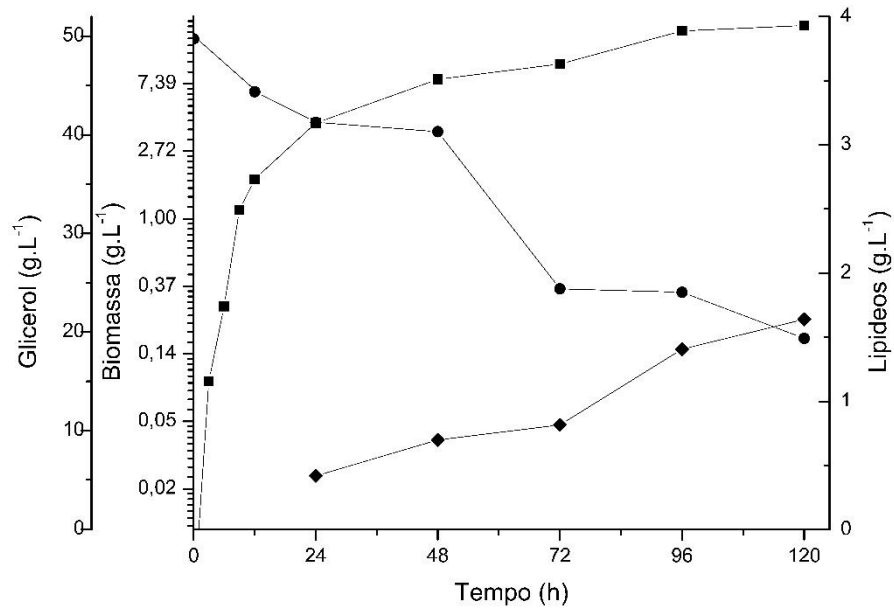


Figura 8. Experimento preliminar para avaliação do comportamento da levedura através de cinética em meio contendo glicerol residual como fonte de carbono. Biomassa (g.L⁻¹) (■); Glicerol (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); As condições de cultivo foram 150 rpm a 26 °C por 120 h.

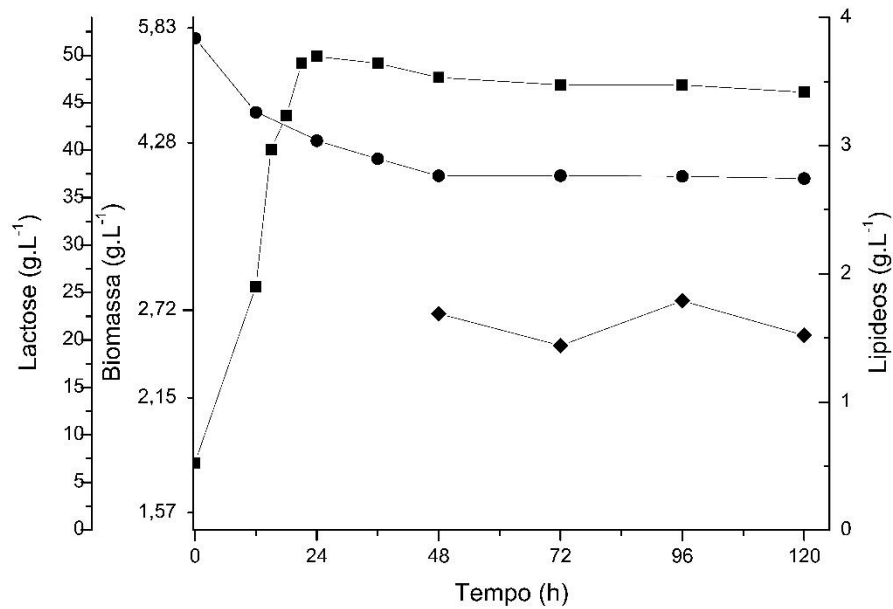


Figura 9. Experimento preliminar para avaliação do comportamento da levedura através de cinética em meio contendo permeado de soro de queijo como fonte de carbono. Biomassa (g.L⁻¹) (■); Lactose (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); As condições de cultivo foram 150 rpm a 26 °C por 120 h.

Como se pode observar nas cinéticas acima, a levedura foi capaz de crescer e metabolizar as três fontes de carbono, acumulando uma quantidade maior de biomassa no meio contendo glicerol. Foram produzidas 16,16 g.L⁻¹, 17,51 g.L⁻¹ e 4,90 g.L⁻¹ de biomassa para os meios com glicose, glicerol e lactose, respectivamente. O conteúdo lipídico produzido pelos mesmos foi de 1,18 g.L⁻¹, 1,64 g.L⁻¹ e 1,52 g.L⁻¹, respectivamente.

Pode-se observar que no meio com glicose (Figura 7) ocorreu a produção de etanol a partir de 24 h e, com o esgotamento do substrato em 48 h, a levedura passou a consumi-lo como fonte de carbono. Este comportamento é conhecido como crescimento diáuxico, e ocorre quando os metabólitos intermediários produzidos são consumidos para a formação de mais biomassa.

Nos meios de cultivo com glicerol e permeado de soro de queijo os substratos não foram totalmente consumidos em 120 h, restando ainda 19,36 g.L⁻¹ e 37 g.L⁻¹ de glicerol e lactose, respectivamente. O meio de cultura com lactose apresentou uma biomassa bem inferior às demais fontes de carbono. Contudo, este mostrou-se como um substrato interessante, pois ocorreu acúmulo de uma grande quantidade de lipídeos, correspondendo a 31 % do seu peso seco.

Embora nesses experimentos tenha sido obtida uma grande quantidade de biomassa, a quantidade de óleo em relação à mesma foi muito pequena, exceto para o caso do permeado de soro. Em virtude disto, os experimentos seguintes foram desenhados com uma composição proposta na literatura como indutora ao acúmulo de lipídeos.

4.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS COM “MEIO A”

A cinética de consumo de substrato, crescimento e acúmulo de lipídeos do “meio A”, contendo glicose como fonte de carbono, encontra-se na Figura 10.

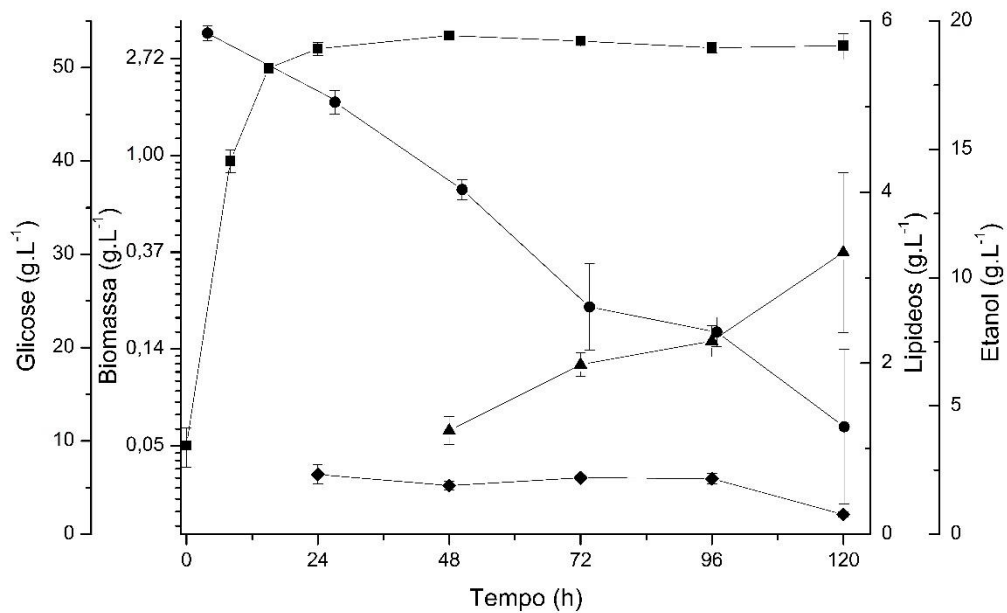


Figura 10. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “A” contendo glicose como fonte de carbono. Biomassa (g.L⁻¹) (■); Glicose (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); Etanol (g.L⁻¹) (▲); As condições de cultivo foram 150 rpm a 26 °C por 120 h.

Em estudos anteriores, Ramírez-Castrillón e colaboradores (2017) cultivaram a levedura *Meyerozyma guilliermondii* BI281A em meio com glicose como fonte de carbono e (NH₄)₂SO₄ como fonte de nitrogênio e obtiveram valores de biomassa de 2,50 g.L⁻¹ e lipídeos de 1,31 g.L⁻¹ em 96 h de cultivo. No presente estudo para o meio de cultura com glicose (Figura 10), a levedura apresentou um comportamento diferente do esperado. Após 120 h, obteve-se uma biomassa de 3,10 ± 0,45 g.L⁻¹ e a quantidade de lipídeos intracelulares diminuiu. Isso se explica pelo fato da levedura ter optado pela rota metabólica para produção de etanol, observada a partir das 48 h e alcançando 10,98 g.L⁻¹ ao término das 120 h. A quantidade de lipídeos obtida após 120 h de cultivo foi de 0,23 ± 0,04 g.L⁻¹, quantidade referente a 7,58 % ± 2,33 do peso seco. Ao final da cinética ainda restaram 11,52 g.L⁻¹ de glicose no meio. A levedura *Meyerozyma guilliermondii* BI281A mostrou potencial para futuros estudos referente à produção de etanol e esta espécie já vem sendo estudada para este propósito por autores como Martini e colaboradores (2016), que utilizaram xilose e hidrolisado de bagaço de cana de açúcar como substrato.

Os resultados obtidos para o meio A com glicerol residual como fonte de carbono e razão C/N 100:1 e 50:1 estão apresentados nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

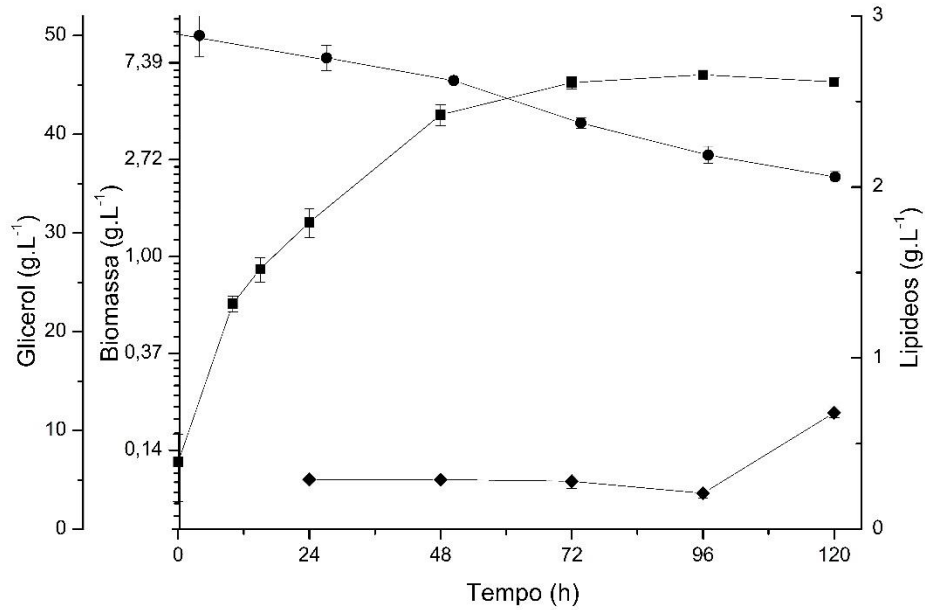


Figura 11. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “A” contendo glicerol residual como fonte de carbono e razão C/N 100:1; Biomassa (g.L⁻¹) (■); Glicerol (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); As condições de cultivo foram 150 rpm a 26 °C por 120 h.

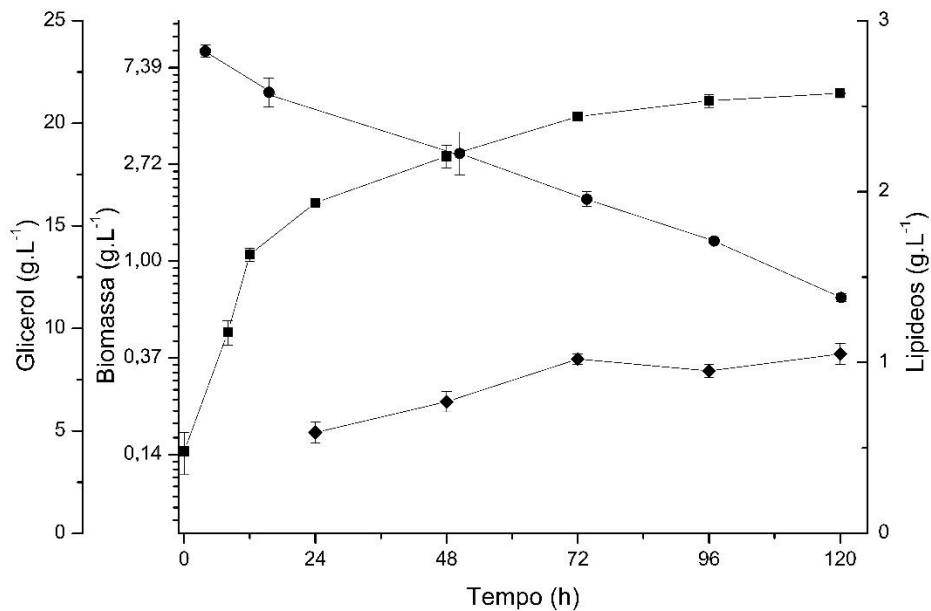


Figura 12. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “A” contendo glicerol residual como fonte de carbono e razão C/N 50:1; Biomassa (g.L⁻¹) (■); Glicerol (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); As condições de cultivo foram 150 rpm a 26 °C por 120 h.

Para a razão C/N 100:1 obteve-se $6,07 \pm 0,25$ g.L⁻¹ de biomassa e $0,68 \pm 0,03$ g.L⁻¹ de lipídeos. No início da fermentação havia 50 g.L⁻¹ de glicerol no meio e ao final da cinética ainda restaram 35,70 g.L⁻¹. Para a razão C/N 50:1 a biomassa obtida foi de $5,67 \pm 0,03$ g.L⁻¹ e $1,05 \pm 0,06$ g.L⁻¹ para os lipídeos. A quantidade inicial de glicerol foi de 25 g.L⁻¹ e após 120 h de cultivo ainda restaram 11,50 g.L⁻¹. Spier (2014) avaliou o comportamento da levedura *Meyerozyma guilliermondii* utilizando glicerol residual como substrato e encontrou valores próximos aos obtidos neste estudo, sendo que com uma razão C/N de 167:1, em 144 h, foram produzidos 6,17 g.L⁻¹ e 1,11 g.L⁻¹ de biomassa e lipídeos, respectivamente. O teor de lipídeos em base seca (17,94 %) obtido por Spier (2014) foi semelhante ao encontrado neste estudo (18,41 %) para razão C/N 50:1.

Ao comparar os resultados obtidos nas cinéticas com glicerol residual é possível perceber que a redução da razão C/N foi positiva. Mesmo com valores de biomassa semelhantes, foi possível observar um acúmulo de lipídeos significativamente superior ($p < 0,05$) no meio com razão 50:1. Em meios com condições de nitrogênio limitantes uma alta razão C/N favorece a produção de lipídeos, no entanto, altas concentrações de fonte de carbono podem inibir esse comportamento (ECONOMOU, C.N et al., 2011).

A utilização de glicerol mostrou-se mais eficiente quando comparada à glicose, o que torna a importância do estudo desse subproduto da indústria do biodiesel ainda mais evidente. O comportamento observado pode estar relacionado ao fato do glicerol residual ser composto por macro elementos que podem ser assimilados pelo microrganismo durante o cultivo, como cálcio, potássio, magnésio, sódio, fósforo e enxofre (THOMPSON E HE, 2006). Além disso, os gastos com a utilização de glicose como matéria-prima podem limitar a industrialização de óleo microbiano, o que favorece ainda mais o uso de fontes de carbono renováveis e abundantes, como o glicerol e o permeado de soro de queijo (XU et al., 2012).

Os resultados obtidos para o meio A com permeado de soro de queijo como fonte de carbono e razão C/N 100:1 e 50:1 estão apresentados nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

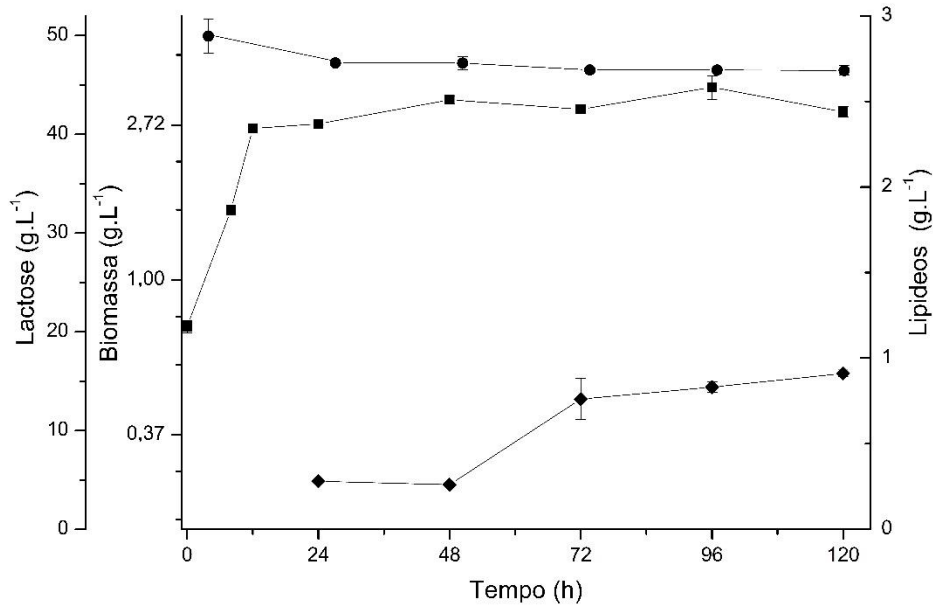


Figura 13. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “A” contendo permeado de soro de queijo como fonte de carbono e razão C/N 100:1; Biomassa (g.L⁻¹) (■); Lactose (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); As condições de cultivo foram 150 rpm a 26 °C por 120 h.

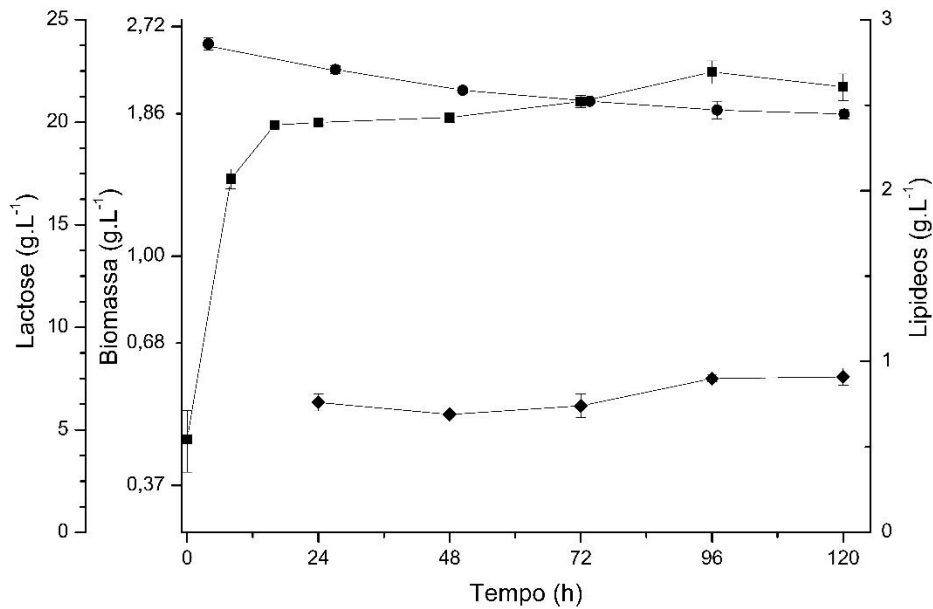


Figura 14. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “A” contendo permeado de soro de queijo como fonte de carbono e razão C/N 50:1; Biomassa (g.L⁻¹) (■); Lactose (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); As condições de cultivo foram 150 rpm a 26 °C por 120 h.

Na cinética apresentada na Figura 13, referente à razão C/N 100:1, a biomassa obtida após 120 h de cultivo foi de $2,96 \pm 0,10 \text{ g.L}^{-1}$. A produção de lipídeos foi de $0,91 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$, valor correspondente a 30,69 % da biomassa. Para o meio com permeado de soro de queijo com razão C/N 50:1 (Figura 14) foram produzidos $2,09 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e $0,91 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de lipídeos em 120 h. Neste caso o teor de lipídeos correspondente à biomassa foi de 43,43 %. A quantidade de lactose consumida foi de $3,75 \text{ g.L}^{-1}$ e $3,49 \text{ g.L}^{-1}$ para as razões 50 e 100:1, respectivamente.

Diversos autores relataram um resultado positivo para o acúmulo de lipídeos em leveduras com o aumento da razão C/N (ANGERBAUER et al., 2008; SAENGE et al., 2011; RAMÍREZ-CASTRILLÓN et al., 2017), no entanto, a levedura *Meyerozyma guilliermondii* utilizada neste estudo mostrou comportamento diferenciado. Assim como no meio com glicerol residual, a redução da razão C/N no permeado de soro permitiu um aumento significativo na capacidade de acúmulo de lipídeos intracelulares, resultando em 12,74 % a mais de óleo em suas células em relação ao peso seco.

Castanha (2012), avaliou a capacidade de acúmulo de lipídeos utilizando soro de queijo sem suplementação como substrato nas espécies de levedura *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula graminis*, *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus sp.*, *Tricosporon sp.*, e *Lipomyces starkeyi* e o maior valor obtido para produção de óleo foi $1,27 \text{ g.L}^{-1}$ para *Cryptococcus laurentii* em 300 h, correspondente a um teor 13,09 % do peso seco. Com a suplementação e otimização deste meio, Castanha (2012) obteve $2,96 \text{ g.L}^{-1}$ de lipídeos, no entanto a porcentagem de lipídeos intracelulares em relação à biomassa seca aumentou muito pouco, chegando apenas a 14,63 %. Estes resultados sugerem que um estudo mais aprofundado para a otimização do uso de permeado de queijo pode ser realizado com intuito de conseguir mais biomassa mantendo a mesma capacidade de acúmulo em base seca. Vale salientar que nenhum estudo foi publicado com a levedura *Meyerozyma guilliermondii* utilizando este resíduo como fonte de carbono.

Para facilitar a comparação entre os resultados obtidos nas cinéticas anteriores, a Tabela 4 apresenta a produção de biomassa e lipídeos em 120 h de cultivo.

Em nenhuma das cinéticas a alteração da razão C/N resultou em diferenças significativas ($p < 0,05$) na biomassa, no entanto apresentou um efeito significativo em relação ao teor de lipídeos em base seca, que aumentou quando esta foi reduzida.

Tabela 4. Resultados obtidos nas cinéticas com meio a utilizando diferentes fontes de carbono como substrato.

Meio de cultivo	C/N	X (g.L ⁻¹)	L (g.L ⁻¹)	L% (%)
Glicose	100:1	3,10 ± 0,45 ^b	0,23 ± 0,04 ^c	7,58 ± 2,33 ^d
Glicerol	50:1	5,67 ± 0,03 ^a	1,04 ± 0,06 ^a	18,41 ± 1,24 ^c
Glicerol	100:1	6,07 ± 0,25 ^a	0,68 ± 0,03 ^b	11,21 ± 0,92 ^d
Permeado de soro	50:1	2,09 ± 0,13 ^c	0,91 ± 0,05 ^a	43,43 ± 0,32 ^a
Permeado de soro	100:1	2,96 ± 0,10 ^{bc}	0,91 ± 0,02 ^a	30,69 ± 0,31 ^b

X: Biomassa; L: teor total de lipídeos; L%: teor de lipídeos em base seca. Resultados expressos como média ± desvio padrão; médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5 % de significância.

Analisando as cinéticas de crescimento e acúmulo de lipídeos foi possível observar que a levedura metaboliza lactose em menor quantidade em relação à glicose e ao glicerol, no entanto, acumula mais lipídeos intracelulares em sua biomassa, provavelmente pelo stress causado devido à dificuldade na metabolização. Também foi possível observar que em todos os casos ainda restou substrato ao final das 120 h e, a partir de 72 h, as cinéticas apresentaram comportamento constante.

Em virtude de o glicerol residual ser metabolizado pela levedura com mais facilidade em relação ao permeado de soro de queijo, este foi testado no meio de cultura base YM, baseado no item 3.2, com intuito de produzir uma maior quantidade de biomassa e, como reflexo, uma maior quantidade de lipídeos. Os experimentos realizados posteriormente foram desenhados com uma razão C/N 100:1 e 50:1, para fins de comparação com o “meio A”.

4.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS COM “BASE YM”

As duas cinéticas realizadas com glicerol estão apresentadas nas Figuras 15 e 16. Nestes casos, como a base do meio era rica em nitrogênio, as razões C/N foram ajustadas através da redução da quantidade de nitrogênio.

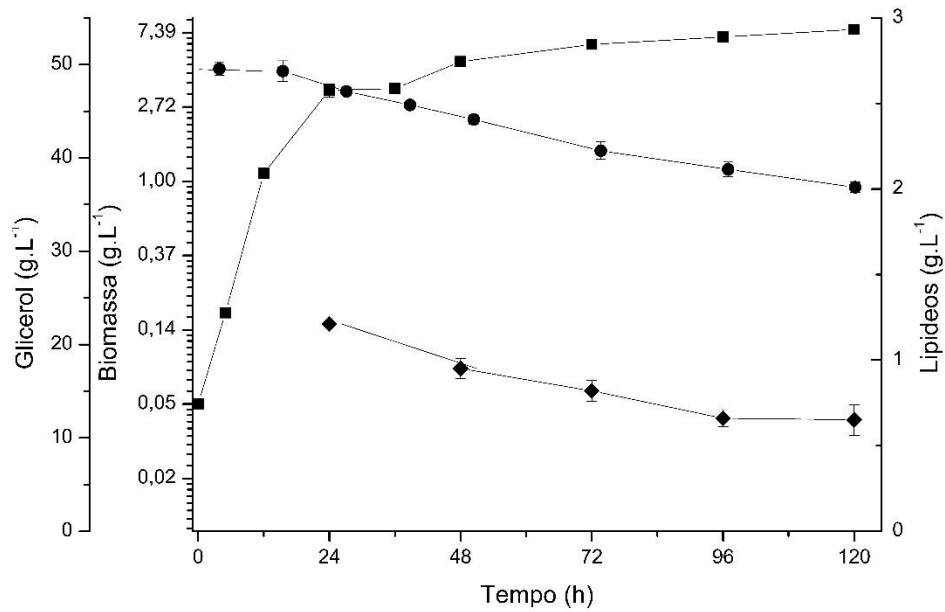


Figura 15. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “Base YM” contendo glicerol como fonte de carbono e razão C/N 100:1; Biomassa (g.L⁻¹) (■); Glicerol (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); As condições de cultivo foram 150 rpm a 26 °C por 120 h.

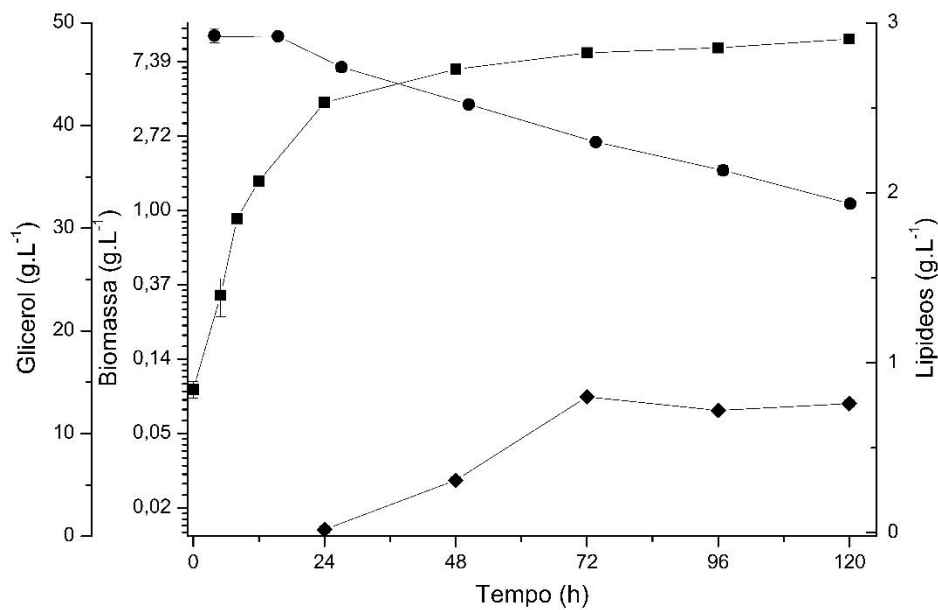


Figura 16. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em meio “Base YM” contendo glicerol como fonte de carbono e razão C/N 50:1; Biomassa (g.L⁻¹) (■); Glicerol (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); As condições de cultivo foram 150 rpm a 26 °C por 120 h.

Para o meio com razão C/N 100:1, foram obtidas $7,7 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e $0,65 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$ de lipídeos intracelulares. Esta situação não favoreceu o acúmulo de lipídeos ao longo do tempo de cultivo, provavelmente pela grande quantidade de nitrogênio no meio. Com a redução da razão C/N para 50:1, a levedura produziu um valor significativamente ($p < 0,05$) maior de biomassa, alcançando $10,05 \pm 0,17 \text{ g.L}^{-1}$, porém a produção de lipídeos, $0,76 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$, não apresentou diferença estatística ao nível de 5 % para esta variável. O consumo de substrato foi de $12,68 \text{ g.L}^{-1}$ e $16,35 \text{ g.L}^{-1}$ para as razões 100:1 e 50:1, respectivamente. Observando este resultado e comparando-o com o experimento preliminar de razão 20:1 (Figura 8), pode-se concluir que a redução da razão C/N proporciona uma maior assimilação do substrato pela levedura e, conseqüentemente, uma maior produção de biomassa.

Esperava-se que as cinéticas com base YM apresentassem valores maiores de biomassa e lipídeos, no entanto foram encontrados valores inferiores de óleo em g.L^{-1} e porcentagem de biomassa seca em relação aos cultivos no Meio A. Este fato pode ser explicado pela concentração de zinco e outros metais no meio A, que influenciam no metabolismo favorecendo o acúmulo de lipídeos (LI et al., 2006). Além disso, o Meio A contém uma menor quantidade de nitrogênio, que é o nutriente limitante do meio de cultura. Seu esgotamento ativa a enzima AMP desaminase, responsável pela inibição da enzima isocitrato desidrogenase, que bloqueia o ciclo do ácido cítrico e promove o acúmulo de acetil-coA necessário para a síntese de ácidos graxos (RATLEDGE, 2004; BELLOU et al., 2016).

O cultivo base YM e razão C/N 50:1 poderia ser avaliado por mais tempo com intuito de aumentar o acúmulo de lipídeos, porém quanto mais longo o cultivo, menor a produtividade e maiores os custos de produção. De acordo com Saenge e colaboradores (2011), a produção de biomassa é favorecida por uma baixa razão C/N e este comportamento foi comprovado ao comparar os valores de biomassa com os experimentos preliminares realizados como etapa inicial deste estudo.

Levando-se em consideração o desempenho da levedura *Meyerozyma guilliermondii* nas cinéticas estudadas, foi desenhado um experimento em biorreator, com intuito de aumentar a escala e verificar a influência da aeração no acúmulo de lipídeos. O meio de cultivo selecionado para escalonamento foi o Meio A com glicerol residual na razão C/N 50:1, pois foi a composição que apresentou maior potencial para otimização.

Deu-se preferência ao glicerol residual em vez do permeado de soro de queijo com base no consumo de substrato, que não passou de 4 g.L^{-1} nos meios com lactose, sendo necessário um estudo de otimização de conversão de substrato em biomassa e lipídeos antes de passar para a etapa de escalonamento.

4.4 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM BIORREATOR DE CULTIVO SUBMERSO

O aumento de escala é de grande relevância neste processo biotecnológico, possibilitando o controle de aeração e pH dos cultivos. A cinética realizada em biorreator está representada na Figura 17, com uma produção de biomassa de $7,05 \pm 0,52 \text{ g.L}^{-1}$, destacando-se em relação ao cultivo em frascos agitados ($5,6 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$).

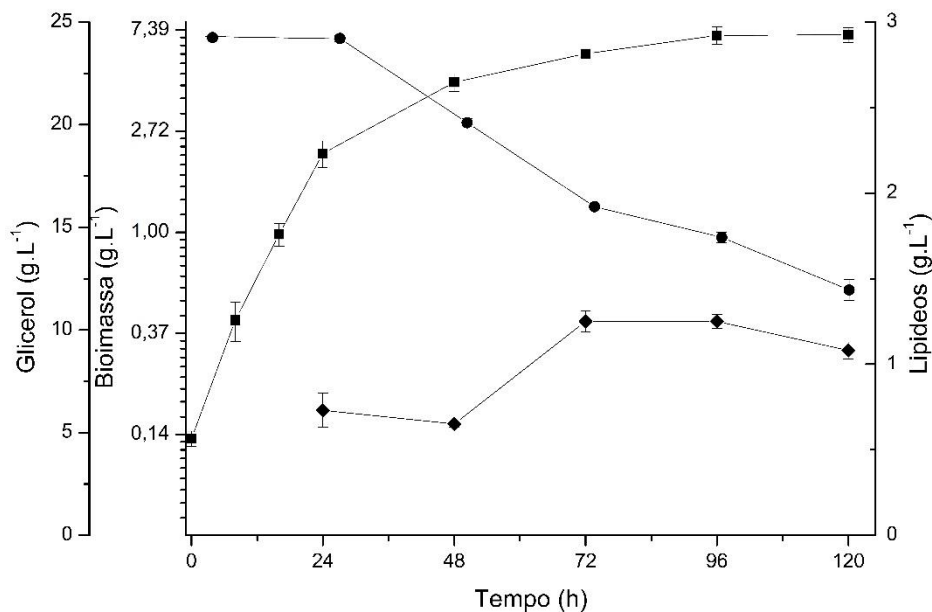


Figura 17. Cinética de crescimento e acúmulo de lipídeos em biorreator contendo glicerol como fonte de carbono e razão C/N 5 0:1; Biomassa (g.L⁻¹) (■); Glicerol (g.L⁻¹) (●); Lipídeos (g.L⁻¹) (◆); As condições de cultivo foram 400 rpm, aeração de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ a 26 °C por 120 h.

O aumento observado em relação à biomassa sofreu influência da aeração, visto que a transferência de oxigênio aumenta ao escalonar o processo e esta variável interfere na velocidade de crescimento de cultivos microbianos (GARCIA-OCHOA E GOMEZ, 2009).

No cultivo em biorreator o microrganismo consumiu $12,3 \text{ g.L}^{-1}$ de substrato. A produção de lipídeos intracelulares foi de $1,08 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$, valor semelhante ao encontrado no cultivo em frascos agitados ($1,04 \pm 0,06$).

As estratégias de cultivo são muito importantes para obtenção de uma melhor performance nos processos biotecnológicos. Raimondi e colaboradores (2014) estudaram o acúmulo de lipídeos em *Candida freyschussii* ATCC 18737 e, ao escalonar o processo para biorreator, conseguiram um aumento de $3,2 \text{ g.L}^{-1}$ para $4,7 \text{ g.L}^{-1}$ (batelada) e 28 g.L^{-1} (batelada alimentada). Com isso, espera-se que os valores obtidos no presente estudo possam ser otimizados em futuros experimentos. Infelizmente, não houve tempo suficiente para complementar este trabalho com a otimização da produção em biorreator. Acredita-se que a utilização da estratégia de batelada alimentada seja muito positiva nos valores de produção, sendo possível trabalhar com o princípio de alta densidade celular, utilizando inicialmente glicerol residual como substrato para a produção de biomassa e, posteriormente, permeado de soro de queijo para o acúmulo de lipídeos intracelulares.

4.5 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS EM BIORREATOR

O perfil de ácidos graxos produzidos pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* BI281A está apresentado na tabela 5.

Tabela 5. Perfil de ácidos graxos produzidos em biorreator com glicerol como fonte de carbono.

Ácido graxo	Teor de ácidos graxos (%)*
C12:0	$1,50 \pm 0,05$
C14:0	$1,15 \pm 0,78$
C16:0	$21,89 \pm 0,31$
C16:1	$9,44 \pm 0,40$
C 17:0	$1,15 \pm 0,04$
C18:0	$5,72 \pm 0,57$
C18:1 n-9	$47,16 \pm 1,69$
C18:2 n-6	$9,59 \pm 0,11$
C18:3 n-3	$1,25 \pm 0,04$

*Ácidos graxos detectados em quantidade traço não foram incluídos na tabela.

Os ácidos graxos que compõem majoritariamente o óleo produzido são o ácido oleico (C_{18:1}) e palmítico (C_{16:0}). Wang e colaboradores (2012) reportaram um perfil bem similar a este para a levedura *Pichia guilliermondii* Pcl22, apresentando 0,4 % de ácido mistérico (C_{14:0}), 21,9 % de ácido palmítico (C_{16:0}), 12,2 % de ácido pamitoleico (C_{16:1}), 5,8 % de ácido esteárico (C_{18:0}), 57,9 % de ácido oleico (C_{18:1}) e 1,7 % de ácido linoleico (C_{18:2}).

A composição principal do óleo obtido demonstra potencial para a otimização da produção de ácidos graxos poli-insaturados, visto que estes são sintetizados a partir dos ácidos esteáricos e palmíticos, passando por sucessivas dessaturações e alongamentos pela ação das enzimas dessaturases e alongases (Figura 3) (BELLOU et al., 2016).

Pode-se observar na Tabela 5 que a levedura foi capaz de produzir ácido α -linolênico (C_{18:3 n-3}) (ômega 3), ácido graxo conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e efeitos benéficos em relação às doenças cardiovasculares, níveis de lipídeos no plasma e arritmia (Barceló-Coblijn e Murphy, 2009). Mattana e colaboradores (2014), ao otimizar a produção de ácido α -linolênico em *Yarrowia lipolytica*, observaram que tanto a agitação, quanto a fonte de nitrogênio interferem na quantidade de ácido graxo produzida, podendo até inibir a síntese do mesmo. Neste caso, o uso de triptona como fonte de nitrogênio inibiu a produção de ácido α -linolênico (ALA), enquanto que o aumento na agitação reduziu a sua produção. Através da redução da agitação de 250 para 150 rpm, Mattana e colaboradores (2014) obtiveram um aumento no teor de ALA de 5,71 % e 4,99 % para duas linhagens de *Y. lipolytica*. Um aumento de 10 % no teor de ALA foi observado por Salunke e colaboradores (2015) em *Lipomyces starkeyi* após transformação genética e, junto com este aumento, também foi observada a produção de ácido docosahexaenoico (DHA), não observada anteriormente.

Spier (2014) avaliou o perfil de ácidos graxos produzidos pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* e relatou que após 144 h de cultivo não houve síntese de ALA, porém produziu-se DHA (C_{22:6 n-3}). Este ácido graxo já vem sendo utilizado na indústria de alimentos para fortificação de ovos e de fórmulas infantis e sua produção é de grande interesse por parte de indústrias como BASF A.G., Nestlé, Hoffmann-LaRoche A.G. entre outras (WARD E SINGH, 2005).

O perfil lipídico obtido neste estudo e sua comparação com a bibliografia demonstra a importância da otimização da produção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa pela levedura *M. guilliermondii*, podendo ser obtida através da engenharia bioquímica, avaliando

as condições de cultivo, ou da engenharia genética, pela superexpressão das enzimas chave do processo.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a utilização da levedura oleaginosa *Meyerozyma guilliermondii* BI281, recentemente isolada em trabalhos de nosso programa de pós-graduação, é de extrema importância, visto que possui capacidade de crescer em meios contendo resíduos como substrato e produzir ácidos graxos poli-insaturados de alto valor econômico. Neste estudo, buscou-se explorar a levedura como um modelo para produção de lipídeos, e verificou-se também habilidade para a produção de etanol, demonstrando grande potencial para futuras investigações.

A partir dos resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que o microrganismo estudado foi capaz de converter glicerol residual em óleos com perfil poli-insaturado, como ácido α -linolênico, produto muito valorizado na indústria de alimentos e farmacêutica. Os valores máximos alcançados em relação à produção de biomassa e lipídeos ($7,05 \pm 0,52 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,08 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente) foram obtidos em biorreator, com razão C/N 50:1. Estes valores são considerados satisfatórios, levando-se em consideração o uso de uma levedura selvagem ainda muito pouco estudada na literatura. Maiores estudos devem ser realizados para uma maior produção, utilizando batelada alimentada e alta densidade celular como princípios, além da possibilidade de estudos de metabolômica e fisiologia celular para se entender, de forma mais precisa, as rotas metabólicas de síntese de AGPI por esta levedura.

Em resumo, este estudo mostrou que substratos de baixo custo podem ser convertidos em óleo de alto valor agregado, através de um processo sustentável que minimiza resíduos e reduz custos de produção.

CAPÍTULO 6 - PERSPECTIVAS

A levedura estudada no presente trabalho demonstrou alto potencial para futuros estudos. Sugere-se a realização de um desenho experimental com alternativas para o aumento da produção de biomassa e lipídeos, tais como a aplicação de fed-batch (batelada alimentada), aplicando os princípios operação baseados na alta densidade celular. Outro fator a ser explorado é a modificação genética do microrganismo, através da superexpressão das enzimas chave responsáveis pela produção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. Com isso, busca-se alcançar valores de produção muito superiores, atingindo resultados ainda não publicados na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKPINAR-BAYIZIT, A. et al. Single cell oil (SCO) production by *Fusarium* species using cheese whey as a substrate. **Mljekarstvo**, v. 64, n. 2, p. 111-118, Apr-Jun 2014. ISSN 0026-704X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000337260700006 >.

ANGERBAUER, C. et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. - 8, p. 3051 - 3056, 2008. ISSN - 0960-8524.

BARCELÓ-COBLIJN, A.; MURPHY, E. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. - 6, p. 355 - 374, 2009. ISSN - 0163-7827.

BELLOU, S. et al. Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 24-35, Feb 2016. ISSN 0958-1669. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166915001275>>.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J.-M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1193-1206, 2011. ISSN 1432-0614. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3212-8>>.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959/08/01 1959. ISSN 0576-5544. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1139/o59-099>>.

CASTANHA, R. F. **Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

CASTANHA, R. F. et al. Optimization of lipids production by *Cryptococcus laurentii* 11 using cheese whey with molasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 379-387, 2014. ISSN 1517-8382. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166260/>>.

CHANG, Y. et al. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus sp.* in glucose-based media and corncob hydrolysate for microbial oil production. **Fuel**, v. 105, p. 711 - 717, 2013. ISSN - 0016-2361.

DOBROWOLSKI, A. et al. Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 207, p. – 237 - 243, 2016. ISSN - 0960-8524.

EASTERLING, E. R. et al. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 356-361, 2009. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408004768> >.

ECONOMOU, C. N. et al. Modeling of single-cell oil production under nitrogen-limited and substrate inhibition conditions. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 108, n. 5, p. 1049, 2011. ISSN - 1097-0290.

ECONOMOU, C. N., AGGELIS, G.; PAVLOU, S.; VAYENAS, DV. Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9737-9742, 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411011138> >.

EL-KHAIR, A. Formulation of Milk Permeate for Utilization as Electrolyte Beverages. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences.**, p. 572 - 578, 2009. ISSN 1991-8178.

FAKAS, S. et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 4, p. 573-580, 2009. ISSN 0961-9534. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953408002237> >.

FAKAS, S. et al. Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 4, p. 1062-1070, 2008. ISSN 1365-2672. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03839.x> >.

FEI, Q. et al. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2695-2701, 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410017979> >.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153 - 176, 2009. ISSN - 0734-9750.

LAMERS, D. et al. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2016. ISSN 1472-6750. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12896-016-0276-7> >.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 749-756, 2008. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1625-9> >.

LI, Y.-H. et al. Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. - 4, p. 650 - 656, 2006. ISSN - 1872-2075.

LIU, L.-P. et al. Use of Crude Glycerol as Sole Carbon Source for Microbial Lipid Production by Oleaginous Yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 2, p. 495-510, June 01 2017. ISSN 1559-0291. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2340-0> >.

MARTINI, C. et al. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 80, April 02 2016. ISSN 1573-0972. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2036-1> >.

MATTANNA, P. et al. Enhancement of microbial oil production by alpha-linolenic acid producing *Yarrowia lipolytica* strains QU22 and QU137. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 1929-1934, December 01 2014. ISSN 2092-6456. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0263-5> >.

OCHSENREITHER, K. et al. Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils. **Frontiers in Microbiology**, p. 1539, 2016. ISSN - 1664-302X Y1.

PAPANIKOLAOU, S. Oleaginous Yeasts: Biochemical Events Related with Lipid Synthesis and Potential Biotechnological Applications. **Fermentation Technology**, v. 1, 1:e103, 2011. ISSN 2167-7972.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 43-49, Mar 2002. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401001493> >.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 8, p. 1031-1051, Aug 2011. ISSN 1438-7697. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.201100014/abstract> >.

POLI, J. S. et al. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 320-326, 2014. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414003885> >.

RAIMONDI, S. et al. Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 83, June 07 2014. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-83> >.

RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M. et al. The Oleaginous Yeast *Meyerozyma guilliermondii* BI281A as a New Potential Biodiesel Feedstock: Selection and Lipid Production Optimization. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1776, 2017-September-22 2017. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01776> >.

RATLEDGE, C. Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In: KAMEL, B. S. e KAKUDA, Y. (Ed.). **Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids**. Boston, MA: Springer US, 1994. p. 235-291. ISBN 978-1-4615-2109-9.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807-815, 2004. ISSN 0300-9084. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908404001634> >.

RATLEDGE, C. Single Cell Oils for the 21st Century. In: (Ed.). **Single Cell Oils (Second Edition)**: AOCS Press, 2010. p. 3-26.

SAENGE, C. et al. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 210 - 218, 2011. ISSN - 1359-5113.

SALUNKE, D. et al. Production of polyunsaturated fatty acids in recombinant *Lipomyces starkeyi* through submerged fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 7, p. 1407-1414, July 01 2015. ISSN 1615-7605. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-015-1382-y> >.

SARDESAI, V. M. The Essential Fatty Acids. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 7, n. 4, p. 179-186, 1992. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0115426592007004179> >.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, n. 9, p. 502-507, 2006. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332206002435> >.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 1 - 11, 1996. ISSN - 0960-8524.

SMITH, K. **Dried dairy ingredients**. Madison: Wisconsin Center of Dairy Research: 60 p. 2008.

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

TCHAKOUTEU, S. S. et al. Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 911- 927, 2015. ISSN - 1365-2672.

THEVENIEAU, F.; NICAUD, J.-M. Microorganisms as sources of oils. **OCL**, v. 20, n. 6, p. D603, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1051/ocl/2013034> >.

THOMPSON, J. C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, n. - 2, p. 261 - 265, 2006. ISSN - 0883-8542.

TSIGIE, Y. A. et al. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9216-9222, 2011. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411008741> >.

UPRETY, B. K.; VENKATESAGOWDA, B.; RAKSHIT, S. K. Current Prospects on Production of Microbial Lipid and Other Value-Added Products Using Crude Glycerol Obtained from Biodiesel Industries. **BioEnergy Research**, v. 10, n. 4, p. 1117-1137, December 01 2017. ISSN 1939-1242. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9857-0> >.

WANG, G. Y., CHI, Z., SONG, B., WANG, Z. P., AND CHI, Z. M. High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. **Biores. Technol.**, v. 124, p. 77 - 82, 2012. ISSN - 0960-8524.

WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3627-3652, 2005. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305002199> >.

XIE, D.; JACKSON, E.; ZHU, Q. Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 1599 - 1610, 2015. ISSN - 0175-7598

XU, J. et al. - Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. **Biochemical Engineering Journal**. p. 30-36, 2012. ISSN - 1369-703X.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol - a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 5 - 13, March 14 2012. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-13> >.

ZACARCHENCO, P. et al. **Permeado de soro - Aplicações que agregam valor aos coprodutos do leite**. Anuário Leite e Derivados: BTS Publicação e Publicidade: 48 - 55 p. 2012.

ZHU, L. Y.; ZONG, M. H.; WU, H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7881-7885, 11// 2008. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408001752> >.