

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

Desenvolvimento de estratégia de produção de óleo microbiano a partir  
de resíduos industriais e aplicação na síntese de biodiesel

Trabalho de Conclusão de Curso

MARIANA RITTER RAU

Porto Alegre, julho de 2015

MARIANA RITTER RAU

Desenvolvimento de estratégia de produção de óleo microbiano a partir  
de resíduos industriais e aplicação na síntese de biodiesel

Trabalho apresentado como um dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Bacharel em Biotecnologia, ênfase em  
Biotecnologia Molecular.

Orientadora: Marilene H. Vainstein

Porto Alegre, junho de 2015

*“The scientist does not study nature because it is useful; he studies it because he delights in it, and he delights in it because it is beautiful. If nature were not beautiful, it would not be worth knowing, and if nature were not worth knowing, life would not be worth living.”*

Jules Henri Poincaré (1854-1912), matemático francês.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Marilene Vainstein, pela oportunidade de desenvolver esta linha de pesquisa e pela confiança ao longo de toda a jornada.

Aos amigos e colegas dos laboratórios 220 e 217, de forma especial àqueles que fizeram parte das etapas experimentais e de discussões acerca do trabalho. Cada um sabe do quanto foi importante para que este trabalho se concretizasse.

Aos demais laboratórios do Centro de Biotecnologia e da UFRGS com os quais foi possível trocar conhecimento e encontrar apoio logístico.

À família, amor e amigos.

Às agências de fomento CAPES e CNPq.

## RESUMO

O biodiesel é um biocombustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos, produzido através de uma reação de transesterificação de óleos renováveis. No Brasil, a matéria-prima mais empregada é o óleo de soja, o que implica no desvio de terras aráveis do setor de alimentos, além de estar sujeito a condições climáticas. Fontes alternativas ao óleo vegetal vem sendo propostas, e uma delas é o óleo microbiano. Leveduras oleaginosas são capazes de acumular óleo acima de 20% do volume celular, e a levedura *Yarrowia lipolytica* QU31, empregada neste estudo, atinge teores próximos de 60%. As vantagens do emprego de leveduras oleaginosas concernem principalmente à facilidade no cultivo, que pode ser escalonado a grandes volumes com facilidade, não utiliza áreas agrícolas e não está sujeita a fatores climáticos, além de leveduras serem capazes de metabolizar facilmente diversos resíduos agroindustriais. Neste trabalho, foi avaliada a eficiência do cultivo da levedura *Y. lipolytica* QU31, isolada de queijo artesanal, em um meio composto da combinação entre glicerina residual de síntese química de biodiesel e resíduo de cervejaria, também chamado de lama. O meio foi padronizado em escala de bancada, sendo encontrada a melhor composição de 7% de glicerina e 2% de lama. Foi realizada a produção de biomassa de levedura oleaginosa em biorreator de 5 L, que em seguida foi empregada na síntese de biodiesel por metanólise direta e transesterificação, sendo comparados três métodos de síntese: catálise básica com e sem agitação e catálise ácida com agitação. A síntese de biodiesel microbiano foi eficiente, e em seguida sua composição foi analisada por cromatografia gasosa. A análise do perfil do óleo e da composição do biodiesel indicou que as características do óleo de levedura estão de acordo com os limites das normas brasileira e europeia de qualidade, podendo ser empregado como matéria-prima para a síntese de biodiesel. Este trabalho contribuiu para a valorização de resíduos industriais na produção de uma matéria-prima renovável para a síntese de um biocombustível.

## ABSTRACT

Biodiesel is a biofuel composed by fatty acid alkyl esters, and it is produced through transesterification of renewable oils. The most used feedstock in Brazil is soybean oil, that leads to arable lands deviation from the food sector and is also vulnerable to climate changes. Alternative feedstocks have been proposed, and microbial oil is one of them. Oleaginous yeasts are capable of accumulate up to 20% of its cellular volume in lipids, and the yeast *Yarrowia lipolytica* QU31, employed to this purpose, reaches yields about 60%. The main advantages of oleaginous yeasts concerns about its easily scalable to industrial volumes, it doesn't need arable lands and isn't affected by climate changes, besides being capable to readily metabolize diverse agroindustrial wastes. In this work, the cultivation efficiency of *Y. lipolytica* QU31 (originated from artisanal cheese) on crude glycerol from a biodiesel's plant and slurry from a local brewery was evaluated. The culture medium was standardized at flasks scale, and the best combination was achieved at 7% glycerol and 2% slurry. The oleaginous yeast was cultivated in a 5 L bioreactor and then the biomass was used to biodiesel production through direct methanolysis and transesterification, with testing three methods: alkaline catalysis with or without stirring and acid catalysis. The microbial biodiesel production was efficient, and then it was analyzed by gas chromatography. The lipid profile and biodiesel composition are according to Brazilian and European quality standards, and it can be used as biodiesel feedstock. This work contributed to industrial wastes valorization towards its biotransformation to a renewable biodiesel feedstock.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de transesterificação de triacilglicerídeos (TAG) gerando biodiesel.....	14
Figura 2 – Três etapas da reação de transesterificação envolvidas na síntese de biodiesel..	15
Figura 3 - Típica cinética de crescimento e acúmulo de óleo de uma levedura oleaginosa cultivada em batelada .....	22
Figura 4 - Resíduos industriais estudados .....	30
Figura 5 - Medida da relação da área da gota em relação à área da célula. ...	35
Figura 6 - Reator de biodiesel empregado na síntese através de metanólise direta e transesterificação agitada.....	36
Figura 7 - Teor de biomassa e de lipídios dos cultivos na etapa 1 de padronização, após 96 h de incubação.....	40
Figura 8 - Painel com imagens da gota de óleo produzida na etapa 1 de padronização do meio, após 96h de cultivo de <i>Y. lipolytica</i> em diferentes meios contendo ou não lama de cervejaria..	42
Figura 9 - Medida de área da gota de óleo produzida pela levedura nos diferentes meios de cultura da etapa 1 de padronização. ....	44
Figura 10 - Contraste entre os valores de rendimento de lipídios (%) e de produtividade (g/L) dos cultivos da etapa 1 de padronização do meio.....	45
Figura 11 - Parâmetros do cultivo da levedura <i>Y. lipolytica</i> QU31 na etapa 2 de padronização do meio. ....	46
Figura 12 - Painel com imagens da gota de óleo produzida na etapa 2 de padronização, após 96h de cultivo em diferentes meios contendo ou não lama de cervejaria.....	47
Figura 13 - Medida de área da gota de óleo produzida pela levedura nos diferentes meios de cultura da etapa 2 de padronização. ....	48
Figura 14 - Contraste entre os valores de rendimento de lipídios (%) e de produtividade (g/L) dos cultivos da etapa 2 de padronização do meio.....	49
Figura 15 - Cromatografia em camada de sílica das amostras de óleo microbiano extraído a partir da biomassa cultivada em biorreator e da produção de biodiesel .....	54

Figura 16 - Parâmetros de biomassa, lipídios, proteína e pH final para a etapa 3 de padronização do meio de cultura. ....	56
Figura 17 - Painel com imagens da gota de óleo produzida após 96h de cultivo em diferentes meios contendo ou não resíduo de <i>Y. lipolytica</i> QU31 (DYC) ...	57
Figura 18 - Medidas da % da gota de óleo em relação ao volume celular da levedura oleaginosa. ....	58
Figura 19 - Perfis de óleo produzidos pela levedura <i>Y. lipolytica</i> QU31 em diferentes substratos e etapas de cultivo, e comparação entre os métodos de catálise empregados. ....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações da levedura <i>Y. lipolytica</i> na indústria.....	24
Tabela 2 - Combinações de resíduos testadas quanto à capacidade de induzir a produção de óleo microbiano, na etapa 1 de padronização.....	32
Tabela 3 - Fórmulas utilizadas no cálculo das propriedades do biodiesel.....	39
Tabela 4 - Diferenças na estimativa do teor de óleo em % entre os dois métodos testados, para a etapa 1.....	43
Tabela 5 - Diferenças na estimativa do teor de óleo em % entre os dois métodos testados, para a etapa 2.....	48
Tabela 6 - Parâmetros do cultivo da levedura QU31 em biorreator, nos tempos inicial e final, em comparação à escala de frascos. ....	51
Tabela 7 - Concentração dos ésteres totais produzidos através dos diferentes tipos de catálise empregados.....	54
Tabela 8 - Diferenças na estimativa do teor de óleo em % entre os dois métodos testados, para a etapa 3.....	58
Tabela 9 - Perfil do óleo produzido por diferentes fontes oleaginosas.....	60
Tabela 10 - Propriedades estimadas do biodiesel de diferentes fontes oleaginosas. Calculados conforme o item 3.7 a partir dos dados da tabela 9..	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGL: ácidos graxos livres

ANP: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

B2 ou B5 ou B6 ou B7: mistura de 2%, 5%, 6% ou 7% de biodiesel ao diesel.

CCD: cromatografia em camada delgada

DG: diglicerídeos

EtOH: etanol

FAME: *fatty acid methyl esthers*, metil ésteres de ácidos graxos

G3P: glicerol-3-fosfato

GC: *gas chromatography*, cromatografia gasosa

GRAS: *Generally Recognized as Safe*, geralmente reconhecido como seguro

MeOH: metanol

MG: monoglicerídeos

MM: meio mínimo

N: nitrogênio

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NOY: *non-oleaginous yeast*, levedura não oleaginosa

OY: *oleaginous yeast*, levedura oleaginosa

PBS: *phosphate buffered saline*, tampão fosfato

PUFAs: *polyunsaturated fatty acids*, ácidos graxos poliinsaturados

SCO: *single-cell oil*

TAG: triacilglicerídeos

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Cenário energético mundial e combustíveis alternativos.....	13
1.2	O biodiesel.....	14
1.2.1	Benefícios ambientais do biodiesel .....	15
1.2.2	Matérias-primas .....	16
1.3	Leveduras oleaginosas .....	18
1.3.1	Características.....	18
1.3.2	Metabolismo de lipídios: Vias de biossíntese .....	19
1.3.3	Metabolismo de lipídios: Balanço do fenótipo <i>Slim yeast</i> x <i>Obese yeast</i> .....	21
1.4	<i>Yarrowia lipolytica</i> .....	23
1.5	Cultivo em resíduos industriais .....	25
1.6	Produção de biodiesel a partir de óleo microbiano.....	27
2	OBJETIVO .....	29
2.1	Objetivo Geral .....	29
2.2	Objetivos específicos .....	29
3	METODOLOGIA .....	29
3.1	Obtenção da levedura e dos resíduos industriais .....	29
3.1.1	Levedura.....	29
3.1.2	Glicerina residual .....	30
3.1.3	Lama de cervejaria .....	30
3.1.4	“ <i>Deoiled yeast cake</i> ” (DYC).....	30
3.2	Padronização do meio de cultura .....	31
3.3	Escalonamento para Biorreator .....	32
3.4	Parâmetros avaliados.....	33
3.5	Metanólise direta e transesterificação .....	35
3.5.1	Catálise básica estática.....	35
3.5.2	Catálise básica com agitação.....	36
3.5.3	Catálise ácida .....	36
3.6	Análises cromatográficas .....	37
3.6.1	Preparação das amostras .....	37
3.6.2	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	37
3.6.3	Cromatografia Gasosa (GC).....	38

3.7 Análise das propriedades do biodiesel produzido .....	38
4.1 Padronização do meio .....	40
4.1.1 Etapa 1: Avaliação preliminar.....	40
4.2 Escalonamento para biorreator.....	50
4.3 Produção de biodiesel .....	52
4.4 Padronização do meio, etapa 3: Utilização de biomassa livre de óleo .....	55
4.5 Perfis de óleo e propriedades do biodiesel .....	59
4.5.1 Perfis de óleo da levedura <i>Y. lipolytica</i> QU31 em diferentes substratos.....	59
4.5.2 Propriedades do biodiesel produzido.....	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Cenário energético mundial e combustíveis alternativos

A matriz energética da atualidade sustenta-se essencialmente em combustíveis fósseis derivados de petróleo. Este ainda é abundantemente extraído das reservas, porém seu esgotamento está próximo devido à disponibilidade limitada deste recurso. Mudanças no cenário sociopolítico também levam a instabilidades do mercado de petróleo. Com a descoberta de novas reservas, principalmente no Brasil, a exploração de petróleo e a utilização dos seus derivados continua. No entanto, cada vez mais a consciência dos danos causados pelo uso de matéria de origem fóssil, como a alta quantidade de poluentes emitidos e o fato de ser não renovável, aponta para desvantagens no seu uso (Lee *et al.*, 2015).

Com isso, a pressão para o desenvolvimento de novos combustíveis, como o bioetanol e o biodiesel, é imensa. O bioetanol pode ser produzido a partir de fermentação dos açúcares obtidos de cana-de-açúcar e milho ou de material lignocelulósico, como bagaço de cana, cascas de arroz, de soja, etc. (Lee *et al.*, 2014). O biodiesel, por sua vez, é produzido em maior parte (>70%) a partir de óleo de soja, e passou a integrar a matriz energética brasileira, com obrigatoriedade, a partir da resolução da Agência Nacional do Petróleo (ANP) nº 37 de 22 de dezembro de 2005 que determinou para 2008 a adição de 2% de biodiesel ao óleo diesel, formando o chamado B2. Em 2013, a porcentagem aumentou para 5% (B5) até que, conforme a Medida Provisória nº 647 de 28 de maio de 2014, foram instituídos 6% e 7% (B6 e B7) para julho e novembro do mesmo ano. Com o aumento de 5% para 7%, a demanda anual de biodiesel cresceu 1,232 milhão de m<sup>3</sup> sobre os 3,08 milhões de m<sup>3</sup> produzidos anualmente para atender a demanda existente até então (Dutra *et al.*, 2014). Outro fator é a economia com a importação de óleo diesel: com o B5 em vigor, o volume importado era de 10,3 bilhões de litros, a aproximadamente US\$ 8,3 bilhões, e com a diminuição na fração de diesel dando lugar ao biodiesel na mistura B7, a economia pode chegar ao valor de US\$ 1 bilhão anuais em diesel que deixa de ser importado (Ubrabio, 2014).

## 1.2 O biodiesel

O biodiesel é composto de alquil ésteres de ácidos graxos, e tem como matéria-prima óleos de origem renovável compostos por triacilglicerol (TAG). Assim como hidrocarbonetos de origem fóssil, os óleos compostos de TAG apresentam hidrocarbonetos saturados que podem ser oxidados para gerar energia em veículos (Beopoulos *et al.*, 2009). A matéria-prima é submetida à uma reação de transesterificação com um álcool, na presença de um catalisador, para dar origem aos ésteres (Figura 1). Estes ésteres podem ser metílicos ou etílicos, caso seja utilizado como álcool o metanol (MeOH) ou o etanol (EtOH), respectivamente. A conversão de óleo em ésteres é mais eficiente quando o MeOH é empregado e, em razão disso, o biodiesel produzido industrialmente é composto por metil ésteres de ácidos graxos (FAME, do inglês *Fatty Acid Methyl Esters*) gerados pela reação com este álcool de cadeia curta.

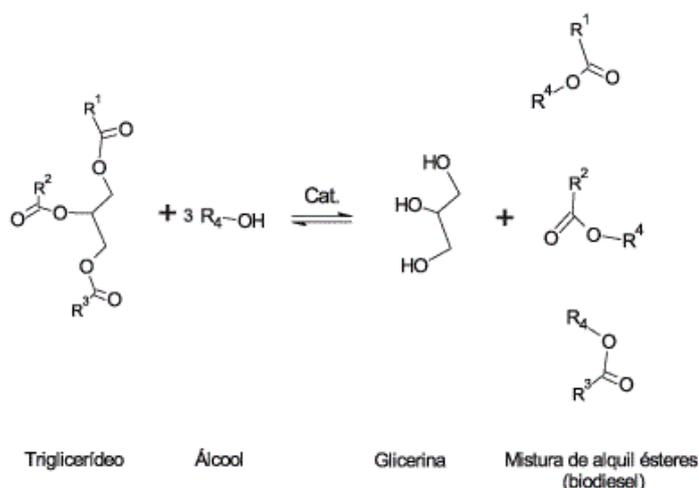


Figura 1 - Reação de transesterificação de triacilglicerídeos (TAG) gerando biodiesel. Fonte: Lobo *et al.*, 2009.

Os tipos de catálise mais empregados atualmente são a catálise básica, mediada por hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH); a catálise ácida, mediada por ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou ácido clorídrico (HCl); ou a catálise enzimática, na qual enzimas lipases realizam a transesterificação (Demirbas, 2009). Industrialmente é utilizada catálise básica, por ser menos corrosiva e mais rápida do que a catálise ácida. No entanto, apresenta sensibilidade à presença de ácidos graxos livres (AGL), que consomem o

catalisador para a formação de sabão ao invés de biodiesel. Portanto, a matéria-prima deve ser de qualidade e refinada para que o teor de AGL seja inferior a 0,5%, e não prejudique o rendimento (Meher *et al.*, 2006).

A transesterificação é composta por uma sequência de três reações reversíveis, na qual o triglicerídeo é convertido em etapas a diglicerídeo (DG), monoglicerídeo (MG) e, por último, a glicerol. Em cada etapa é produzido 1 mol de ésteres metílicos, e ao final das três etapas é produzido 1 mol de glicerol, o subproduto da reação (Helwani *et al.*, 2009). Na figura 1, está uma representação da reação em uma etapa única, enquanto na figura 2 as etapas estão discriminadas uma a uma. O glicerol é imiscível ao biodiesel, então após o progresso da reação, a mistura se separa passivamente em 2 fases. O glicerol é coletado e então o biodiesel passa por etapas de purificação, que compreendem neutralização do catalisador, remoção do metanol, do óleo não consumido e também dos sais formados durante a reação (Ma *et al.*, 2014).

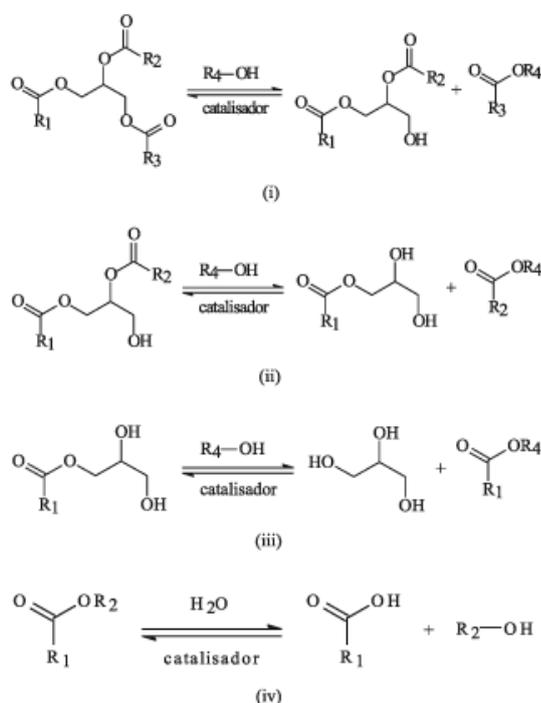


Figura 2 – Três etapas da reação de transesterificação envolvidas na síntese de biodiesel. Fonte: Suarez *et al.*, 2007.

### 1.2.1 Benefícios ambientais do biodiesel

O biodiesel pode ser utilizado puro (B100) ou em misturas de diferentes concentrações junto ao diesel fóssil, e sua utilização em motores a diesel não exige alteração nestes motores. O biocombustível apresenta diversas

vantagens ambientais se comparado ao diesel de petróleo. O diesel pode possuir quantidades superiores a 1800 ppm de enxofre em sua composição. Quando é queimado, dá origem a gases  $\text{SO}_2$  e  $\text{SO}_3$  que em contato com a pele humana podem levar a formação de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , gerando queimaduras, e também são responsáveis pela chuva ácida. A resolução da ANP nº 50 de 23 de março de 2013 reduziu de 1800 para 500 ppm o valor máximo de enxofre que pode estar presente no diesel. Europa e Estados Unidos adotam um máximo de 10 e 15 ppm, respectivamente (Miller, 2014). O biodiesel é livre de enxofre, e sua utilização na mistura com o diesel comum pode auxiliar na redução do teor deste poluente no combustível final. A combustão do biodiesel também gera aproximadamente 70% menos gases do efeito estufa em relação ao derivado de petróleo e emissões reduzidas de outras substâncias nocivas à saúde e cancerígenas, como os materiais particulados (Demirbas, 2009).

### 1.2.2 Matérias-primas

Vegetais oleaginosos são a principal fonte de óleo para a produção do chamado “Biodiesel de primeira geração”, e são eles os utilizados predominantemente na indústria. Os vegetais mais empregados, em todos os países, são soja, canola e palma (Demirbas, 2009). No Brasil, as matérias-primas mais utilizadas no mês de março de 2015 foram óleo de soja (74%), gordura bovina (21%), óleo de algodão (1,6%), óleo de fritura (0,74%) ou de palma/dendê (0,5%) (ANP, 2015). O uso de sementes oleaginosas para a produção de biodiesel desvia os grãos do setor alimentício para o de biocombustíveis, desta forma estabelecendo uma competição por áreas aráveis. Em um cenário onde a demanda por grãos para alimentação deve aumentar significativamente nos próximos anos, seguindo o aumento do tamanho da população, o uso desta fonte de óleo para a produção de biodiesel é questionável. É estimado que a população global atinja 9 bilhões de pessoas no ano de 2050 e, para atender à demanda alimentar, a produção de alimentos (inclusive aqui grãos) precisa crescer em 60% (Revista Agroanalysis, 2015).

Uma alternativa é o “Biodiesel de segunda geração”, que é produzido a partir de óleos não comestíveis, como óleo de jojoba, de pinhão-manso, de mamona, de sebo bovino e de óleo residual de fritura. No entanto, a disponibilidade de óleo a partir das fontes vegetais é insuficiente para atender à

demanda existente; e gordura animal, por sua vez, embora frequentemente mencionada em estudos como uma potencial matéria-prima, tem o uso limitado. Devido à composição naturalmente diferente de óleos vegetais, alguns métodos de produção de biodiesel (que são, em maioria, baseados em óleos vegetais) não são eficientes para a transesterificação de gorduras animais (Ma *et al.*, 1999). O óleo residual de fritura também vem sendo utilizado, porém de forma não plenamente custo-efetiva: além de conterem um alto teor de AGL (que formam sabão ao invés de biodiesel), tem um efeito negativo na qualidade do biodiesel produzido. A economia na obtenção do substrato não é tão vantajosa, se considerado o processo como um todo (Meher *et al.*, 2006).

Nas definições de biodiesel encontradas na literatura, frequentemente lê-se que se trata de uma “mistura de metil ésteres de ácidos graxos derivados de óleos vegetais ou gorduras animais” (Koutinas *et al.*, 2014). No entanto, os estudos buscando fontes alternativas vem crescendo, e logo esta definição irá tornar-se ultrapassada. A terceira geração de biodiesel tem em vista superar as limitações encontradas até então. Para isso, a matéria-prima alternativa utilizada é proveniente de óleo microbiano, também chamado de *Single Cell Oil* (SCO) (Meng *et al.*, 2009). Uma importante característica da aplicação deste tipo de óleo é a possibilidade de cultivar o micro-organismo produtor em resíduos industriais, em alternativa ao meio definido. Os micro-organismos utilizados podem ser micro-algas (Ma *et al.*, 2014), fungos filamentosos (Hussain *et al.*, 2014), bactérias (Fei *et al.*, 2015) ou leveduras (Ryu *et al.*, 2013; Cescut *et al.*, 2014). Microalgas podem acumular óleo acima de 80% de seu peso seco. No entanto, normalmente o óleo produzido é rico em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), o que para a produção de biodiesel se torna uma desvantagem, pois quanto maior o grau de insaturação de ésteres, menor sua estabilidade devido a oxidação. Além do mais, duplicam a quantidade de biomassa de um cultivo em 24 horas, implicando em tempo elevado de produção (Meng *et al.*, 2009). Considerando isto, as bactérias seriam uma alternativa, porém, não são tipicamente acumuladoras de óleo adequado para a síntese de biodiesel. Poucas acumulam compostos lipídicos complexos, como polihidroxicanoatos. Leveduras e fungos filamentosos acumulam óleo acima de 40% de seu peso seco, possuem tempo de cultivo adequado para

uma produção industrial e a composição do óleo se assemelha ao de origem vegetal. Em comparação a fungos filamentosos, as leveduras são de cultivo mais fácil, pois os fungos tendem a formar agregados de micélio tornando o meio de cultura viscoso, podendo causar entupimento de tubulações em uma planta industrial (Meng *et al.*, 2009).

### 1.3 Leveduras oleaginosas

#### 1.3.1 Características

Leveduras oleaginosas (ou OY, *Oleaginous Yeasts*) são capazes de acumular acima de 20% de seu peso seco em lipídios neutros (TAG). Estas leveduras compõem cerca de 5% da população total de leveduras (Ageitos *et al.*, 2011), e estão presentes principalmente nos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Trichosporon* e *Yarrowia*.

A habilidade de produção de óleo é intrínseca e natural da levedura, devido a diversas características genéticas. Em condições satisfatórias de disponibilidade de nutrientes, ocorre uma biossíntese basal de óleo (correspondente a 20-40% de óleo em relação à biomassa). Essa produção pode ser induzida e aumentada, e o teor de óleo depende da espécie em questão e do nível de aperfeiçoamento do cultivo, podendo variar de 50 a 75% de óleo.

O perfil de óleo produzido, isto é, o balanço entre a porcentagem de ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia e grau de insaturação, difere entre as espécies e também dentro da mesma espécie se cultivada em substratos distintos. Esta variação pode refletir em óleos bastante comuns na natureza e, portanto, de baixo valor comercial, como ácido palmítico, oleico e linoleico (C16:0, C18:1 e 18:2, respectivamente) até óleos para propostas específicas, de alto valor agregado. O valor de mercado pode variar entre \$0,3/kg até \$100/kg (Koutinas *et al.*, 2014). Desta forma, a melhor levedura oleaginosa para determinado bioprocessamento pode ser escolhida tendo como base

o conhecimento do seu perfil lipídico. O SCO produzido pode ter diversas aplicações, como cosméticos, fármacos, tintas, biodiesel e setor alimentício.

As diferenças entre leveduras oleaginosas (OY, *Oleaginous Yeasts*) e não oleaginosas (NOY, *Non-Oleaginous Yeasts*), que as tornam um grupo tão peculiar e interessante do ponto de vista biotecnológico, vem sendo estudadas em detalhe. Elas seguiram um diferente curso de evolução, e a comparação mais frequentemente feita é com a levedura-modelo *Saccharomyces cerevisiae*, uma NOY que acumula < 15% de óleo em relação à biomassa (Beopoulos *et al.*, 2008). Em comparação à levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica*, *S. cerevisiae* não utiliza ácidos graxos como substrato de forma eficiente, pois não secreta lipases e possui capacidade limitada de realizar  $\beta$ -oxidação. Ao encontrar um ambiente com carbono em excesso, *S. cerevisiae* passa de um metabolismo oxidativo para oxido-redutivo com a produção de etanol. *Y. lipolytica*, por sua vez, metaboliza glicose tão bem quanto ácido oleico (Papanikolaou e Aggelis, 2003) e, quando colocada frente à mesma situação, esta produz grandes quantidades de metabólitos intermediários do Ciclo de Krebs (ácido cítrico, ácido 2-cetoglutarico e ácido pirúvico) e converte o carbono em excesso a TAG.

### 1.3.2 Metabolismo de lipídios: Vias de biossíntese

Devido à nítida importância da biossíntese de lipídios para o armazenamento de ácidos graxos nas mais variadas espécies, este é um mecanismo altamente conservado na bioquímica dos seres vivos (Athenstaedt, 2010; Kurat *et al.*, 2006). É um processo integrado que ocorre em diversos compartimentos celulares. Envolve etapas na mitocôndria, no retículo endoplasmático, no citoplasma e finda na gota intracelular de lipídios.

As vias de síntese de lipídios são duas. Na via *de novo* a levedura capta fontes de carbono disponíveis no meio e cataboliza em metabólitos do ciclo de Krebs. A síntese se inicia no citoplasma com a clivagem de uma molécula de citrato, mediada por uma ATP citrato liase (ACL), em oxaloacetato e acetil-coA. Esta ACL é encontrada apenas em OY (Boulton e Ratledge, 1981). Além disso, os níveis de citrato mitocondrial são três vezes maiores em OY do que em NOY, indicando a importância de haver grande disponibilidade de precursores

para a lipogênese nestas leveduras. A partir do acetil-CoA liberado, a cadeia carbônica é incrementada por ciclos de adição dos blocos fundamentais para a síntese: malonil-CoA (no retículo endoplasmático) ou acetil-CoA (na mitocôndria), sendo necessárias duas moléculas de NADPH para cada ciclo. Malonil-CoA é produzido principalmente pela enzima acil-CoA carboxilase (ACC), enquanto NADPH é gerado pela enzima málica. Dessa forma, são sintetizados ácidos graxos livres, que podem ter tamanhos distintos de cadeia carbônica, dependendo da quantidade de unidades de acetil ou malonil-CoA adicionadas, e apresentar ou não insaturações, devido à ação de enzimas desaturases na cadeia carbônica (Damude *et al.*, 2006).

Na via *ex novo*, compostos oleosos presentes no meio são hidrolisados em ácidos graxos e incorporados pela levedura, e podem ser utilizados da forma como são na síntese de TAG para acúmulo intracelular. Leveduras oleaginosas, em particular *Y. lipolytica*, possuem especializações evolutivas que conferem melhor aptidão em captar do meio e utilizar óleos e gorduras (substratos hidrofóbicos, em geral) como nutrientes. Possuem diversos genes codificando surfactantes, que contribuem para a solubilização do óleo no meio; realizam modificações (protrusões) na superfície celular para facilitar a adesão de gotas hidrofóbicas e secretam lipases (Fickers *et al.*, 2005).

A síntese de TAG a partir dos ácidos graxos provenientes das duas vias é a mesma, seguindo a via Kennedy (Kennedy, 1961). Para isso, são necessárias 3 moléculas de ácidos graxos (acil-CoA) e uma molécula de glicerol-3-fosfato (G3P). O G3P sofre acilação na posição sn-1, formando ácido lisofosfatídico; em seguida é acilado novamente, na posição sn-2, formando ácido fosfatídico, que é defosforilado, dando origem a um diacilglicerol (DAG). Por fim, uma acilação dependente de acil-CoA na posição sn-3, gerando TAG. Os lipídios totais produzidos e armazenados em uma levedura são compostos aproximadamente de 90% TAG. Tais moléculas de estocagem de energia são armazenadas em um compartimento celular especializado chamado “corpo lipídico”, que consiste em um interior rico em lipídios neutros cercado de uma monocamada fosfolipídica. Nos limites desse compartimento estão presentes enzimas que desempenham papéis-chave no metabolismo de lipídios. Isto indica que essa estrutura não se trata apenas de um espaço de estocagem,

mas de uma estrutura envolvida ativamente na biossíntese, armazenamento, mobilização e degradação dos TAGs (Beopoulos *et al.*, 2009).

Ao enfrentar um ambiente com escassez de nutrientes, as leveduras oleaginosas mobilizam as reservas de TAG, e realizam degradação por  $\beta$ -oxidação no peroxissomo, uma via onde enzimas acil-CoA oxidases (Aox) são fundamentais. É gerado, novamente, acetil-CoA, que é direcionado para a síntese de nutrientes necessários à sobrevivência naquele momento.

### 1.3.3 Metabolismo de lipídios: Balanço do fenótipo *Slim yeast* x *Obese yeast*

O conhecimento sobre a fisiologia das OY permitiu diversos avanços quanto à maximização da quantidade de SCO produzido. O acúmulo de óleo é dependente de fatores como pH, aeração, temperatura e balanço de nutrientes. É possível alcançar teores maiores que os basais (estes naturalmente já elevados em OY), utilizando estratégias simples de cultivo, como a modulação da disponibilidade de nitrogênio e de carbono no meio. Já foi demonstrada a possibilidade de atingir um rendimento de  $0,22 \text{ g}_{\text{lipídios}}/\text{g}_{\text{carbono}}$  quando OY são cultivadas em glicose abundante e com N limitante (Rupcic *et al.*, 1996).

A razão para essa modulação metabólica pode ser explicada em termos de direcionamento do fluxo de carbono através das vias de biossíntese celulares. Quando cultivada em um meio rico em carbono e em nitrogênio, a assimilação de carbono é limitada apenas pelo sistema de transporte de substratos para dentro da célula, de forma que ocorre o crescimento catalítico. Nesta situação, o fluxo de carbono está distribuído e equilibrado entre a síntese das 4 principais biomoléculas: ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos. É observado o fenótipo de “*slim yeast*”, pois o acúmulo de óleo é muito baixo. Por outro lado, quando o carbono é abundante e ao mesmo tempo o nitrogênio é restringido, levando a uma elevada razão C/N, ocorre o chamado fenótipo “*obese yeast*”. As leveduras, de fato, engordam, pois na ausência de nitrogênio suficiente para a síntese de aminoácidos e ácidos nucleicos, a taxa de multiplicação celular tende a diminuir, acompanhada do aumento da taxa de síntese e armazenamento de lipídios a partir do carbono abundante. Leveduras NOY, quando na mesma situação, interrompem o crescimento catalítico, podem sintetizar óleo em baixas quantidades (abaixo de 10% do peso seco) e

direcionam o carbono em excesso para a síntese de polissacarídeos, como amido,  $\beta$ -glucana e manana (Ratledge, 2004). No entanto, quando a razão C/N é excessivamente elevada, pode ocorrer deficiência de nitrogênio, levando à queda da viabilidade celular antes mesmo que as leveduras comecem a acumular óleo. O carbono em excesso também pode ser desviado para a síntese de ácido cítrico (Papanikolau *et al.*, 2006) em detrimento do acúmulo em lipídios, pois ocorre consumo de carbono que não é direcionado à produção do óleo de interesse.

Ao avaliar a taxa de multiplicação celular e de produção de óleo de uma OY, se observa um comportamento característico. Estes dois fenômenos não estão diretamente correlacionados, como pode ser compreendido a partir dos diferentes fenótipos discutidos acima. Uma grande produção de biomassa pode não estar acompanhada de produção abundante de óleo, e o oposto também é visto: acumulação elevada de óleo acompanhada de baixa biomassa devido à depleção de nitrogênio. A aproximação do máximo destes dois parâmetros, simultaneamente, representa a situação ideal (Papanikolau e Aggelis, 2002).

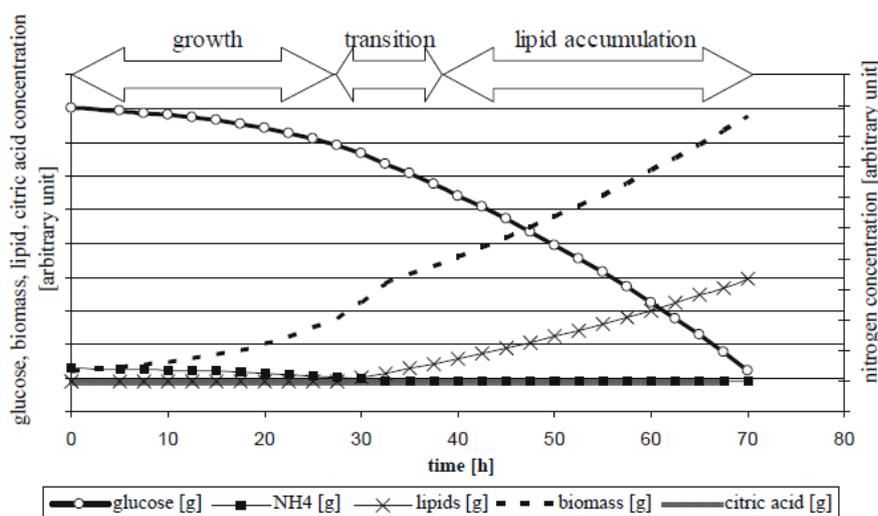


Figura 3 - Típica cinética de crescimento e acúmulo de óleo de uma levedura oleaginosa cultivada em batelada. Fonte: Beopoulos *et al.*, 2009.

Considerando um cultivo em batelada (Figura 3), o meio de cultura conta inicialmente com quantidade suficiente de nutrientes para desencadear a fase de crescimento, quando a biomassa aumenta exponencialmente. Aqui, o carbono é direcionado para vias importantes para a multiplicação celular. Este

período tem duração aproximada de 48 horas. Com a exaustão de nitrogênio, a levedura passa por uma fase de transição, na qual ocorrem adaptações metabólicas necessárias ao novo cenário que irá enfrentar, juntamente com a desaceleração da multiplicação celular. O carbono, ainda abundante, é assimilado e catabolizado, e o fluxo pelo ciclo de Krebs se torna intenso. A lipogênese é, assim, favorecida. Num período de aproximadamente 72 a 96 horas, ou até mais, o fenótipo *obese yeast* se manifesta intensamente. Aqui, a multiplicação ocorre pouco, e a levedura continua acumulando óleo, até começar a produzir ácido cítrico, ou até que este estoque passe a ser necessário para a manutenção da viabilidade celular. Então, os lipídios são mobilizados e catabolizados através de  $\beta$ -oxidação (Beopoulos *et al.*, 2009).

#### 1.4 *Yarrowia lipolytica*

A levedura empregada neste trabalho pertence à espécie *Yarrowia lipolytica*. Esta é uma das leveduras oleaginosas mais estudadas, sendo uma espécie-modelo para engenharia metabólica dentro deste grupo, para a qual estão disponíveis ferramentas de biologia molecular, biologia de sistemas, engenharia genética, transcritômica e um rascunho do genoma sequenciado (Liu e Alper, 2014). É uma plataforma importante de produção de proteínas heterólogas. Além disso, apresenta a vantagem de ser GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, não patogênica (Groenewald *et al.*, 2013).

*Y. lipolytica* pode ser encontrada habitualmente em ambientes ricos em substratos hidrofóbicos, como alcanos ou lipídios, em alimentos ricos em gordura, áreas contaminadas com hidrocarbonetos, etc. (Landell *et al.*, 2006). Isso se deve à facilidade que a levedura apresenta em assimilar esse tipo de nutriente. Foram identificadas, em seu genoma, diversas famílias multigênicas codificando proteínas que atuam na via de assimilação de substratos hidrofóbicos e na lipogênese. A origem pode ser a partir de amplificação genômica e evolução sucessiva dos genes envolvidos em tais vias. São 13 famílias envolvidas na utilização de substratos hidrofóbicos, sendo a família da lipase composta por 16 membros, e a de acil-coA oxidase, por 6. Além disso, a

levedura é capaz de formar protruções na superfície celular, o que facilita a captura destes substratos (Papanikolaou e Aggelis, 2002; Ykema *et al.*, 1986).

*Y. lipolytica* foi e é empregada atualmente na indústria por várias empresas, na produção de diferentes produtos (Tabela 1).

Tabela 1 - Aplicações da levedura *Y. lipolytica* na indústria.

<b>Produto</b>	<b>Empresa</b>	<b>Ano</b>	<b>Referência</b>
<b>Proteína (Toprina L) para nutrição animal</b>	British Petroleum (BP)	1950-1970	Babel <i>et al.</i> , 2000
<b>Proteína para nutrição humana</b>	Skotan SA	Em produção	Rywińska <i>et al.</i> , 2013
<b>Probiótico e prebiótico</b>	Skotan SA	Em desenvolvimento	Rywińska <i>et al.</i> , 2013
<b>Ácido cítrico</b>	Pfizer Inc.	1970-1990	Fried, 1972
<b>Ácido cítrico</b>	Archer Daniels Midland	1990-atualmente	Fickers <i>et al.</i> , 2005
<b>Manitol e eritritol (adoçantes)</b>	Baolingbao Biology Co. Ltd.	2003-atualmente	Tomaszewska <i>et al.</i> , 2012
<b>New Harvest™ (suplemento com ácido eicosapentaenoico)</b>	DuPont	2010 - atualmente	Groenewald <i>et al.</i> , 2013
<b>Carotenóides (corante e estabilizante alimentício natural)</b>	Microbia (DSM) e DuPont	Não informado	Bailey <i>et al.</i> , 2006
<b>Enzimas lipases e proteases</b>	Pfizer e Novozymes	Atualmente	Groenewald <i>et al.</i> , 2013
<b>Enzima lisossomal humana (expressão heteróloga)</b>	Oxyrane	Testes clínicos em 2013	Ryckaert e Lerondel, 2011
<b>Lipase (biorremediação)</b>	Artechno	Não informado	Bordes <i>et al.</i> , 2011

Além das aplicações industriais (Tabela 1), diversos outros usos vem sendo explorados, por enquanto no campo da pesquisa. O uso em biorremediação é frequentemente citado, pois a levedura metaboliza muito bem substratos hidrofóbicos presentes em áreas contaminadas, produção de biosurfactantes, de polímeros biodegradáveis (polihidroxicanoatos) e de óleo microbiano para conversão em biodiesel (Groenewald *et al.*, 2013).

Esta levedura produz até 62% de seu peso seco em lipídios neutros (Nambou *et al.*, 2014), sendo o perfil composto majoritariamente por C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 e C18:2, sendo estas também as cadeias mais comuns no óleo de soja (Ma e Hanna, 1999). Sendo assim, esta levedura possui potencial aplicação como biofábrica de matéria-prima para a síntese de biodiesel.

São vários os estudos com *Y. lipolytica* para a produção de óleo, tanto com um isolado tipo selvagem como estudos de engenharia metabólica.

Cheirsilp e Louhasakul (2013) utilizaram uma técnica de cultivo de duas fases, combinando dois resíduos industriais. Na primeira fase, a fase de crescimento (aproximadamente 50 horas), foi utilizado soro de látex diluído 3 vezes em água, combinado com 4% de glicerina bruta. Após, a fase de lipogênese foi induzida através do cultivo em apenas 4% de glicerina bruta. Com esta estratégia foi atingido um teor de óleo de 44,5% e 3,4 gramas de lipídios por litro de cultivo. Em um estudo Blazeck (2014) modificou várias vias-chave de *Y. lipolytica* visando o acúmulo de óleo: deletou proteases extracelulares, enzimas da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, da formação de peroxissomos (estes degradam lipídios) e do ciclo do ácido tricarbóxico; enquanto superexpressou enzimas que convertem ácido cítrico em acetil-CoA, que produzem NADPH e DGA (acil-coA:diacilglicerol aciltransferase). Com isso, obteve de 16,1 g/L de óleo e um rendimento de 88% de óleo por peso seco de célula. Este é o melhor resultado reportado até agora utilizando edição do genoma desta levedura.

### 1.5 Cultivo em resíduos industriais

Um estudo de Koutinas (2014) determinou a influência do custo de cada insumo de uma indústria fictícia de biodiesel microbiano no custo final do produto, encontrando que glicose e extrato de levedura para o cultivo representam 79% e 16% do custo de produção do óleo, respectivamente. O cultivo em resíduos industriais é uma alternativa para reduzir significativamente tais custos e tornar o biodiesel de óleo de levedura mais próximo da aplicação ao lado do biodiesel atual. O tratamento de resíduos por microrganismos oleaginosos visa a metabolização do resíduo como substrato para a produção de óleo de valor agregado. Este procedimento é uma prática correta ambientalmente, permite o reciclo dos nutrientes e não produz poluição secundária, uma vez que a massa de células produzida é coletada para a obtenção do óleo produzido.

Diversos resíduos já foram testados quanto à eficiência na indução da produção de óleo por diversas leveduras. Melaço, ácidos graxos voláteis, glicerina bruta, água de esgoto municipal, permeado de queijo, resíduo de moinho de óleo de palma, resíduo de água com gordura animal de indústria de

aves ou suínos ou peixe, óleo de fritura, biomassa de levedura oleaginosa pós-extração de óleo, vinhaça, bagaço de sorgo e de cana-de-açúcar, farelo de canola, palha de trigo e de arroz, resíduo de maceração de milho, hidrolisado de amido de mandioca, entre outros (Leiva-Candia *et al.*, 2014). Os resíduos descritos podem ser testados individualmente ou combinados no meio de cultura. Dependendo da apresentação do resíduo, este pode ser utilizado como a base do meio, e complementado com outros que desempenhem o papel de fonte de carbono e outros nutrientes, caso se faça necessário. Alguns resíduos precisam ser diluídos, pois podem conter em sua composição inibidores do crescimento microbiano (Cheirsilp e Louhasakul, 2013). Desta forma, as carências nutricionais enfrentadas pelo microrganismo cultivado em um substrato, apenas, podem ser supridas pela combinação com outro(s).

A glicerina bruta é um subproduto da síntese química de biodiesel e, conforme a estequiometria da reação (Figura 1) é produzido aproximadamente 1 kg de glicerina para cada 10 kg de biodiesel sintetizados. Este resíduo inclui, além de um teor variável de glicerol: MG, DG e TAG eventualmente não convertidos a biodiesel, álcool da reação (metanol ou etanol), sais, água (adicionada muitas vezes para evitar a cristalização dos sais) e catalisador. A quantidade de glicerol presente no resíduo depende do tipo de processo utilizado (Bournay *et al.*, 2005). A geração de glicerina em plantas de biodiesel põe em evidência a necessidade do seu correto destino. A alternativa encontrada é o refino e purificação, que pode ser feita via filtração, adição de produtos químicos, destilação fracionada e filtração em resinas de troca iônica. O glicerol purificado pode ser encaminhado para a utilização em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos (Thompson e He, 2006). No entanto, a purificação possui um custo de operação, que irá se refletir no preço de venda do biodiesel. Alguns pequenos produtores (ou mesmo produtores maiores) enfrentam dificuldades quanto ao custo e estrutura necessária para isto, então o destino da glicerina se torna problemático.

Semelhantemente, a utilização de subprodutos do próprio processo para operações subsequentes representa uma oportunidade de reduzir a geração de resíduos e fazer a reciclagem destes compostos. Estes podem ser produtos químicos recuperados e aplicados novamente na mesma etapa ou outros

resíduos que possam ser utilizados no meio de cultivo da levedura, também possibilitam uma redução no custo de operação. Quando se trata da produção de leveduras oleaginosas, a parte interessante economicamente são os lipídios estocados intracelularmente, sendo que a biomassa livre de óleo não possui relevância para a produção de biodiesel. Este subproduto pode ser mantido dentro do ciclo de produção de biodiesel através da utilização no meio de cultivo, pois a composição é semelhante ao extrato de levedura comercial.

### 1.6 Produção de biodiesel a partir de óleo microbiano

Embora não seja uma ideia recente, os trabalhos envolvendo a produção de biodiesel microbiano ainda são limitados. A maioria dos estudos abrange apenas a seleção de uma boa linhagem acumuladora de óleo, determinação do melhor meio de cultivo e análise do perfil de ácidos graxos, e encerram afirmando o potencial para uso como matéria-prima de biodiesel. Nos estudos onde a produção de biodiesel, de fato, é abordada, a técnica mais empregada é aquela composta por diversas etapas (cultivo, obtenção e secagem da biomassa, extração de óleo com clorofórmio e metanol, reação de síntese), análoga à produção de biodiesel a partir de vegetais oleaginosos. Este processo apresenta diversas desvantagens, pelo elevado consumo de tempo, de solventes, de estrutura, etc. (Cheirsilp e Louhasakul, 2013). Em função disso, é necessário o desenvolvimento de novas técnicas para a produção de biodiesel a partir de SCO.

Um método desenvolvido por Thiru (2011) realiza a lise celular de biomassa úmida por homogeneização, seguida de extração do óleo utilizando hexano (solvente 4 e 10 vezes mais barato que metanol e clorofórmio, estes os solventes utilizados mais comumente na extração) e isopropanol. A partir daí se obtém óleo purificado que é utilizado para produção tradicional de biodiesel.

Um conceito introduzido em 2007 por Liu e Zhao é o de metanólise direta e transesterificação da biomassa oleaginosa seca. Nesta técnica, a etapa de extração do óleo é dispensada, refletindo em ganho de tempo e também uma economia no processo. Mesmo sem extração prévia, a síntese de

biodiesel é possível, pois o metanol, juntamente com o catalisador (que geralmente é um ácido ou base forte) misturados à biomassa, irão proporcionar o rompimento da célula e consequente liberação do óleo intracelular para o meio de reação para a transesterificação. Para isso, a proporção empregada de metanol por quantidade de óleo (geralmente de 20:1) é superior à quantidade utilizada na produção a partir de óleo já extraído (em torno de 6:1). Este não é um problema, pois o metanol pode ser recuperado por evaporação, entra em ebulição a 65 °C, e reutilizado em reações seguintes. Outro fator é que o tempo de reação para uma conversão acima de 90% dos TAGs em ésteres metílicos chega a 10 horas (Thliveros *et al.*, 2014) ou até 24 horas (Liu e Zhao, 2001), dependendo do tipo de catálise empregada.

Também pode ser utilizada a biomassa úmida diretamente na produção de biodiesel. Este processo economiza uma etapa, pois não é necessária a secagem da biomassa. Porém, a água presente no meio pode levar à hidrólise dos TAG em AGL, ao invés de transesterificação. Os AGL, por sua vez, irão consumir o catalisador e formar sabão. A reação de hidrólise é minimizada utilizando uma grande razão de metanol:biomassa, para que o solvente esteja em quantidade muito superior à água do meio e a transesterificação ocorra antes da hidrólise. Cheirslip e Louhakasul (2013) obtiveram teor de FAMES gerados superior a 70% utilizando este procedimento. No entanto, a razão utilizada foi de 209:1. Os mesmos autores realizaram a reação utilizando biomassa seca com uma razão de solvente:biomassa de 167:1, e quando a biomassa úmida foi utilizada com a mesma razão, a produção de biodiesel foi 6 vezes mais lenta. A reação ocorreu em pequena escala, em tubos em um aparelho Termomixer, e é importante salientar que o escalonamento desta técnica enfrentaria problemas logísticos devido ao grande volume de reação necessário para obter a mesma quantidade de biodiesel alcançável em um processo com uma razão de metanol:solvente dez vezes menor, ao ser incluída a etapa de secagem. Considerando os custos e benefícios, a metanólise e transesterificação utilizando biomassa seca é mais vantajosa.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Utilizar a levedura *Yarrowia lipolytica* QU31 como biofábrica de óleo microbiano aplicável na síntese de biodiesel, utilizando substratos de baixo custo derivados de resíduos industriais.

### 2.2 Objetivos específicos

Padronização, em escala laboratorial, das condições de cultivo da levedura *Y. lipolytica* em meio líquido, utilizando-se como substrato glicerina residual de plantas comerciais de produção de biodiesel e lama de cervejaria;

Avaliação de parâmetros cinéticos de crescimento: produção de biomassa e de óleo, rendimento e produtividade;

Escalonamento do cultivo para Biorreator (5 L);

Utilização da biomassa de levedura oleaginosa para síntese de biodiesel através de metanólise direta e transesterificação com catálise básica ou catálise ácida;

Análise de composição e propriedades do biodiesel produzido.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Obtenção da levedura e dos resíduos industriais

#### 3.1.1 Levedura

A levedura estudada para a produção de óleo, *Y. lipolytica* QU31, foi isolada de queijo artesanal (Landell *et al.*, 2006). A identificação da levedura foi realizada anteriormente por sequenciamento da região ITS (*internal transcribed spacer*) do rDNA conforme Ramírez-Castrillón *et al.*, (2014). Esta levedura é descrita na literatura como oleaginosa e desperta interesse biotecnológico (Beopoulos *et al.*, 2009).

### 3.1.2 Glicerina residual

A glicerina (Figura 4, A) foi obtida da indústria Bianchini SA, localizada no município de Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil. A empresa produz biodiesel a partir de óleo de soja, utilizando como álcool o metanol e como catalisador da reação de transesterificação o metilato de sódio. O resíduo da síntese, a glicerina, possui acima de 80% de glicerol, aspecto viscoso e cor amarelo clara e pH elevado devido à catálise básica, então é neutralizado até pH 5, levando a formação de NaCl (aproximadamente 3,5%). Em função da salinidade, é adicionado 10% de água para evitar a cristalização do sal do resíduo nas tubulações e equipamentos. Também compõe este resíduo uma pequena fração de óleo não convertido completamente a biodiesel. A empresa usualmente comercializa este subproduto para indústrias de refinamento a um baixo custo. A levedura *Y. lipolytica* é capaz de metabolizar glicerol e converter em lipídios, então se evidencia a aplicação no cultivo da levedura oleagínosa.

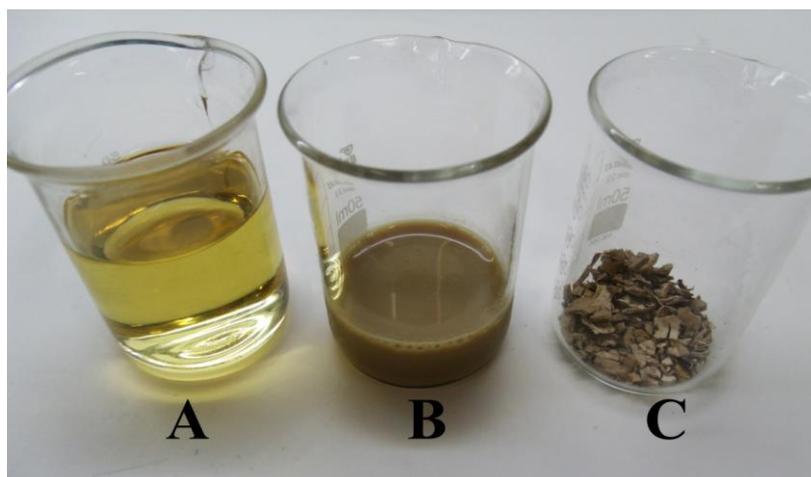


Figura 4 - Resíduos industriais estudados. A: glicerina residual da síntese química de biodiesel (Bianchini SA); B: lama de levedura cervejeira (Cervejaria Seasons); C: massa de células restante do processo de metanólise e transesterificação.

### 3.1.3 Lama de cervejaria

O resíduo de indústria cervejeira é proveniente da microcervejaria Seasons, situada em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. É chamado de “lama” ou “*slurry*”, um sedimento formado no fundo dos fermentadores, composto por leveduras que perderam viabilidade e entraram em autólise, e também de leveduras metabolicamente ativas (Figura 4, B). Após alguns reusos do fermento cervejeiro em fermentações consecutivas, a lama é removida, neutralizada e descartada ou encaminhada para alimentação animal,

a um custo praticamente nulo. Este resíduo é rico em proteínas, vitaminas e micronutrientes, assemelhando-se ao extrato de levedura comercial. No estudo de Ryu (2013), a composição da lama é estimada em 9,4% de umidade, 23,6% de proteínas, 3,5% de carboidratos, 4,8% de ácidos graxos e 6,5% de cinzas

#### 3.1.4 “Deoiled yeast cake” (DYC)

O processo de síntese de biodiesel via metanólise direta e transesterificação, descrito no item 3.5, gera um subproduto composto de restos celulares de *Y. lipolytica* que foi lisada e teve o óleo removido. É um resíduo sólido, e quando dissolvido em água apresenta pH extremo (muito ácido ou muito básico, dependendo do tipo de catálise empregada na síntese de biodiesel na etapa anterior). Este resíduo foi avaliado semelhantemente à lama de levedura cervejeira.

### 3.2 Padronização do meio de cultura

Tendo em vista a formulação de um meio de cultura indutor da produção de óleo microbiano, a partir apenas de resíduos industriais, a glicerina foi avaliada como fonte de carbono e a lama como suplementação de nitrogênio, sais e micronutrientes.

Um experimento preliminar, chamado de etapa 1, foi realizado utilizando as combinações possíveis entre 5%, 7% e 10% de glicerina (v/v) e 0,1%, 1%, 2% e 3% de lama (v/v). Como controle, foi testado glicose 10% como fonte de carbono e a suplementação de nitrogênio e sais padrão, chamada de meio mínimo (MM), composta por 0,1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,05 %  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Tabela 2). O experimento foi realizado em batelada, em frascos de 500mL. Um pré-inóculo foi cultivado em meio rico YPD (2% glicose, 2% peptona e 1% extrato de levedura) e todos os meios foram padronizados com inóculo de  $1 \times 10^6$  células/mL e pH 6. Os cultivos permaneceram durante 96 horas a 25 °C sob agitação de 150 rpm (Poli *et al.*, 2014a).

Tabela 2 - Combinações de resíduos testadas quanto à capacidade de induzir a produção de óleo microbiano, na etapa 1 de padronização do meio de cultivo. \*: o meio mínimo (MM) é composto de 0,1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,05 %  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

<b>Meios teste</b>		
	<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Fonte de Nitrogênio</b>
<b>M1</b>	5% glicerina	0,1% lama
<b>M2</b>	5% glicerina	1% lama
<b>M3</b>	5% glicerina	2% lama
<b>M4</b>	5% glicerina	3% lama
<b>M5</b>	7% glicerina	0,1% lama
<b>M6</b>	7% glicerina	1% lama
<b>M7</b>	7% glicerina	2% lama
<b>M8</b>	7% glicerina	3% lama
<b>M9</b>	10% glicerina	0,1% lama
<b>M10</b>	10% glicerina	1% lama
<b>M11</b>	10% glicerina	2% lama
<b>M12</b>	10% glicerina	3% lama
<b>Meios controle</b>		
	<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Fonte de Nitrogênio</b>
<b>C1</b>	7% glicerina	Meio mínimo*
<b>C2</b>	10% glicose	Meio mínimo*
<b>C3</b>	10% glicose	2% lama

O teste foi repetido com os meios M7, M9, M10 e com os meios controle para avaliação mais precisa dos parâmetros, e chamado de etapa 2. As condições de cultivo foram as mesmas descritas acima.

Foi estudada também a aplicação do resíduo de biomassa livre de óleo obtido conforme descrito no item 3.5, referido na literatura como “*deoiled yeast cake*” (Ryu *et al.*, 2013) como suplementação do meio, da mesma forma como a lama de levedura cervejeira (Figura 4, C). O teste foi chamado de etapa 3. Os meios avaliados foram os mesmos da etapa 2, porém considerando a porcentagem em gramas de resíduo por volume de meio, pois o resíduo é sólido e não líquido como a lama.

### 3.3 Escalonamento para Biorreator

O melhor meio de cultura encontrado na padronização foi empregado no cultivo da levedura em biorreator (Minifors, Infors HT). O biorreator utilizado

tinha capacidade para 5 L, dos quais 3 L foram ocupados com meio de cultivo. Após a preparação do meio e ajuste para pH 6 com NaOH, o vaso do biorreator contendo meio de cultivo foi esterilizado em autoclave vertical, conforme instruções do fabricante (Obom *et al.*, 2013). O pré-inóculo em meio rico YPD permaneceu por 24 h a 25 °C e 150 rpm. O volume de inóculo correspondeu a 10% do volume de meio fermentado. Os parâmetros foram ajustados para: aeração de 1 vvm, agitação de 350 rpm e 25 °C, durante 96 horas. Foi necessária a adição de uma solução de antiespumante ao biorreator (em decorrência, principalmente, da composição da lama utilizada no meio, que contém proteínas). Foi utilizado 0,8 mL/L de antiespumante (Xiameter<sup>®</sup> AFE-0900. Dow Corning do Brasil Ltda.) adicionado ao meio de cultura e também configurada a adição automática de antiespumante ao biorreator, caso houvesse espumação detectada pelos sensores durante o cultivo.

A biomassa produzida foi coletada após as 96 h, através de ciclos de centrifugação, e seca a 60 °C *overnight*, para posterior emprego na síntese de biodiesel. Foram avaliados os mesmos parâmetros estudados na escala laboratorial, para verificar eventuais alterações no comportamento do bioprocessamento e verificar a produtividade de óleo nesta escala.

#### 3.4 Parâmetros avaliados

**Biomassa (g/L):** por determinação do peso seco. Uma alíquota do meio foi retirada, centrifugada em tubo previamente pesado, lavada com água destilada e seca em estufa a 60 °C até peso constante. O peso inicial do tubo foi subtraído do peso final contendo a amostra seca. A análise foi realizada em triplicata.

**Lipídios (g/L):** a extração para determinação quantitativa e gravimétrica foi realizada a partir da biomassa seca e pesada, utilizando solventes orgânicos conforme protocolo adaptado a partir de Bligh & Dyer (1959). Em um tubo de 50 mL contendo a amostra foram adicionados clorofórmio e metanol na proporção de 1:2 e água destilada correspondente ao peso da amostra multiplicado por 0,2. As células foram rompidas utilizando um homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax<sup>®</sup> Janke & Knukel GmbH & CoKG) por 3 minutos. Após incubação sob agitação durante 30 minutos, foram adicionados clorofórmio e

sulfato de sódio anidro 1,5% na proporção de 1:1, seguido de agitação breve em vortex. O tubo foi centrifugado a 6000 RPM por 5 minutos para a separação de fases. A fase orgânica (inferior) foi transferida utilizando uma pipeta Pasteur para um tubo contendo 1g de sulfato de sódio anidro, agitado brevemente por inversão e filtrada em filtro de papel para um tubo previamente pesado, que permaneceu em estufa a 60 °C para evaporação do solvente. Se observa um sólido amarelado no fundo do tubo, que pode ser analisado por cromatografia em camada delgada para confirmação de que se trata do óleo de levedura. O peso inicial do tubo foi subtraído do peso final contendo a amostra seca. A análise foi realizada em triplicata.

Rendimento de lipídios (%): representa rendimento de óleo por peso seco de células. Calculado conforme a fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Lipídios } \left(\frac{g}{L}\right) \times 100}{\text{Biomassa } \left(\frac{g}{L}\right)}$$

Gotas intracelulares de óleo: visualizadas por microscopia de fluorescência utilizando o corante Vermelho de Nilo (Sigma-Aldrich), que é fluorescente quando dissolvido em solventes orgânicos. Em ambientes neutros, como no interior de corpos lipídicos, o corante emite fluorescência de cor amarela, enquanto em ambientes polares, como fosfolipídios, emite vermelho e alaranjado. Uma alíquota do cultivo foi centrifugada a 2000 RPM durante 5 minutos e lavada duas vezes com PBS 1x e pH 7,4. 10 µL da suspensão foram espalhados em lâmina de vidro e, após secagem, foram adicionados 10 µL do corante Vermelho de Nilo 0,1mg/mL em acetona. A lâmina permaneceu incubada ao abrigo de luz durante 5 minutos e o excesso de corante foi lavado com PBS. Para a visualização em microscopia de fluorescência, foi utilizado o microscópio Axioskop 40 – Carl Zeiss Microscopy, filtro de 450-490nm, acoplado a uma câmera (AxioCam MRc – Zeiss) (Greenspan *et al.*, 1985).

Tamanho da gota de óleo: o software ImageJ (versão 1.49) foi utilizado para medir o diâmetro da célula e da gota de óleo, nas imagens de microscopia de fluorescência. Foram buscadas imagens nítidas e células esféricas para

realizar a determinação. A medição foi feita nas imagens sem identificação, para que fosse evitado qualquer tipo de tendência quanto ao tratamento.

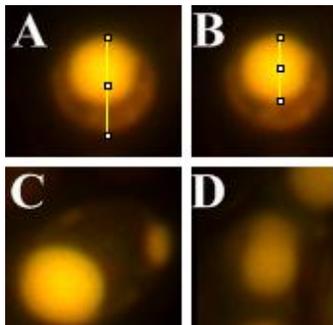


Figura 5 - Medida da relação da área da gota em relação à área da célula. A e B: célula ideal para a medição, de forma esférica e nítida, sendo A: medida da célula e B: medida da gota. C e D: células impróprias para a medição, sendo C: célula de forma ovalada e D: célula sem nitidez.

A partir desses dados, foi traçada uma relação de porcentagem do volume celular ocupado pela gota através da seguinte fórmula:

$$\text{Área da gota (\%)} = \frac{(\text{área da gota} \times 100)}{\text{área da célula}}$$

Teor de nitrogênio na forma de proteína: como a maior parte do nitrogênio dos meios teste é orgânico e oriundo das proteínas que compõem o resíduo de lama, uma estimativa do teor de Nitrogênio foi realizada através do ensaio de Bradford (1976).

pH final do cultivo: é um indicativo da atividade metabólica da levedura, pois a oxidação da fonte de carbono leva à acidificação do meio. O aparelho (Jenway, 3510 pH/mV/Temperature Meter) foi calibrado previamente à realização das medições.

### 3.5 Metanólise direta e transesterificação

#### 3.5.1 Catálise básica estática

Esta metodologia foi desenvolvida por Thliveros (2014) e utiliza a catálise básica, mediada por NaOH. A biomassa previamente seca em estufa foi incubada com uma solução de NaOH 4g/L em metanol, na proporção de 1:20 (biomassa:solução), a 50 °C durante 10 h. No trabalho descrito por Thliveros (2014), a reação ocorre em banho-maria, de forma estática. Após as 10 horas de reação estática em frasco Erlenmeyer fechado, os sólidos (biomassa livre

de óleo) foram separados do líquido da reação, foi adicionado hexano na proporção de 4:10 (mistura:hexano) para propiciar a separação de fases e a concentração dos ésteres metílicos na fase orgânica e acondicionado sob refrigeração por 16h. As fases foram coletadas para análise cromatográfica, sendo o metanol em excesso recuperado por evaporação, podendo ser utilizado nas próximas reações, e o hexano da fase orgânica foi evaporado ao concentrar a alíquota para análise cromatográfica dos ésteres metílicos. Os restos de levedura lisada e sem óleo foram coletados para avaliação como suplementação do meio de cultivo (item 3.2).

### 3.5.2 Catálise básica com agitação

Procedimento realizado essencialmente da mesma forma como descrito no item 3.5.1, mas sob agitação. A agitação propicia melhor transferência de massa na reação de transesterificação. Para isso, foi utilizado um reator acoplado a uma haste giratória (Figura 6), aplicando agitação de 350 rpm.



Figura 6 - Reator de biodiesel empregado na síntese através de metanólise direta e transesterificação agitada. Acima, o motor que aplica uma agitação de velocidade regulável, acoplado a um condensador com circulação constante de água para o resfriamento e evitar a evaporação do álcool. Por dentro dele passa uma haste que aplica a agitação ao frasco, este que fica disposto sobre uma manta de aquecimento de temperatura regulável. A temperatura da reação foi monitorada com um termômetro digital.

### 3.5.3 Catálise ácida

Alternativamente à catálise básica, também foi realizada a produção de biodiesel através de catálise ácida, com agitação, conforme Liu e Zhao (2007). Brevemente, a biomassa foi incubada com uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2 mol/L

em metanol, na proporção de biomassa 1:20 solução. A reação ocorreu durante 24 horas a 70 °C e sob agitação de 350 rpm, no mesmo reator da figura 6. Em seguida, foi realizada a purificação do biodiesel (Liu e Zhao, 2007). A mistura foi filtrada em papel (para a coleta da biomassa livre de óleo), concentrada em rotavapor para recuperar o metanol e diluída em éter de petróleo. Foi adicionado 3 partes de água por parte de mistura. A fase orgânica (superior) foi coletada, seca em sulfato de sódio anidro e novamente concentrada em rotavapor. A massa de biodiesel resultante foi diluída em hexano e analisada por cromatografia.

### 3.6 Análises cromatográficas

#### 3.6.1 Preparação das amostras

Para a avaliação do perfil de óleo produzido pela levedura, foi realizada a derivatização do óleo extraído da levedura na padronização do meio, para produzir ésteres metílicos, pois os TAGs não podem ser diretamente injetados na coluna cromatográfica. O procedimento foi realizado conforme Abreu (2004) e consiste, brevemente, em: adição de 2 mL de uma solução 0,5 N de NaOH em MeOH para cada 0,1 g de óleo microbiano, reação sob agitação e temperatura controlados (Eppendorf Thermomixer® Comfort) por 30 minutos a 60 °C. A seguir, foram adicionados 3,5 mL de MeOH e 350 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, e a reação foi incubada por 2 h a 60 °C sob agitação. As amostras foram lavadas com NaCl 5%, adicionado 2 partes de hexano por parte de amostra, a fase orgânica foi concentrada (Concentrator Plus – Eppendorf) e suspensa novamente em hexano.

#### 3.6.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A produção de ésteres metílicos, tanto da derivatização quanto da reação de síntese de biodiesel, foi confirmada através de cromatografia em camada delgada e posteriormente analisada por cromatografia gasosa. Foi realizada conforme Chattopadhyay (2011). Em uma camada de sílica (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV – Macherey-Nagel GmbH & Co. K) de aproximadamente 12 cm x 8 cm, foi traçada a lápis uma linha a 1 cm da base da camada e as amostras foram aplicadas em pontos lado a lado, sobre esta linha. Para a corrida, a camada foi disposta verticalmente dentro de um béquer

contendo uma solução solvente de fase móvel composta por hexano:acetato de etila:ácido acético 9:1:0,1, onde permaneceu durante 20 minutos. O solvente arrasta componentes da amostra até diferentes alturas, conforme sua polaridade e afinidade pelo solvente ou pela camada. A revelação foi feita utilizando iodo ressublimado, que, ao ser exposto ao calor, reage com ligações duplas e cora de amarelo as frações da amostra eluída.

Foram aplicadas soluções padrão de ácido graxo livre (AGL), neste caso ácido oleico, monoglicerídeo (MG), diglicerídeo (DG), triglicerídeo (TG) e ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês *Fatty Acid Methyl Esthers*). Isso permitiu a identificação das frações eluídas.

### 3.6.3 Cromatografia Gasosa (GC)

A cromatografia gasosa foi realizada conforme parâmetros estabelecidos pela norma europeia EN 14103 (2011), no cromatógrafo Clarus 600 (Perkin Elmer), com injetor PKD, em coluna Supelco capilar PEG (30m x 0,2mm, espessura da fase 0,2 $\mu$ m), detector de ionização na chama (FID) e amostrador automático (Clarus 600 Autosamplers). O gás carreador foi N<sub>2</sub> (1 mL/min) e o programa utilizado o que segue: Temperatura do injetor e do detector: 250 °C; corrida: 160 °C por 30 segundos, aumento de 40 °C/min até 190 °C (1 min) e aumento de 3 °C/min até 250 °C (1 min). O tempo total de análise foi de 23,25 minutos por amostra. O volume de amostras injetado foi 1  $\mu$ L no modo “split”, na razão de 1:10. Os tempos de retenção dos picos gerados no cromatograma foram comparados a padrões (F.A.M.E. Mix, C4-C24 analytical standard, Sigma-Aldrich) para a identificação, e a área sob o pico de cada amostra foi utilizada para determinar a abundância relativa, em porcentagem, de cada éster. Nas amostras dos diferentes tipos de catálise, foi adicionado um padrão interno para a determinação da concentração de ésteres resultantes da reação.

### 3.7 Análise das propriedades do biodiesel produzido

A partir do perfil de ésteres obtido pela cromatografia gasosa, foi possível estimar matematicamente algumas propriedades físico-químicas do biodiesel, conforme a tabela 3, e isto pode auxiliar a inferir sobre o desempenho do biocombustível.

Tabela 3 - Fórmulas utilizadas no cálculo das propriedades do biodiesel.

Propriedade	Unidade	Fórmula	Variáveis
<b>Densidade</b>	Kg/m <sup>3</sup> , a 15°C	$\rho = \sum (c_i \times \rho_i)$	$\rho$ = densidade; $c_i$ = fração molar do éster $i$ ; $\rho_i$ = densidade do éster $i$ (Lapuerta <i>et al.</i> , 2010).
<b>Viscosidade Cinemática</b>	mm <sup>2</sup> /s, a 40°C	$V_{mix} = \sum (A_i \times v_i)$	$V_{mix}$ = Viscosidade; $A_i$ = % do éster $i$ ; $v_i$ = viscosidade do éster $i$ (Knothe <i>et al.</i> , 2011).
<b>Valor de Iodo</b>	Não possui	$IV = \sum (254 \times D \times A_i) \div MW_i$	$IV$ = valor de iodo ( <i>Iodine Value</i> ); $D$ = nº de ligações duplas do éster $i$ .
<b>Poder Calorífico</b>	MJ/Kg	$HHV = 0,4625VS + 39,450$	$HHV$ = Poder calorífico (do inglês <i>High Heating Value</i> ).
<b>Número de Cetano</b>	Não possui	$CN = 1,068 \sum (CN_i \times c_i) - 6,747$	$CN$ = Número de cetano ( <i>Cetane Number</i> ); $CN_i$ = Número de cetano do éster $i$ (Tong <i>et al.</i> , 2011).

Densidade ( $\rho$ ), Viscosidade Cinemática ( $V_{mix}$ ), Número de Saponificação (SN), Valor de Iodo (IV) e Número de Cetano (CN) foram calculados conforme expressões descritas em Khot *et al* (2012); e Viscosidade (VS) e Poder Calorífico (HHV) foram calculados conforme Demirbas (2008). As fórmulas são adequadas para biodiesel metílico, e as relações estabelecidas por elas foram obtidas pelos autores a partir de resultados experimentais. Tais propriedades foram comparadas aos limites estipulados pelas normas de qualidade europeia (EN 14214) e brasileira (RANP 07/08), bem como ao biodiesel proveniente de matéria-prima vegetal (óleo de soja), de sebo bovino (Mata *et al.*, 2010), da alga *Chlorella zofingiensis* (Liu *et al.*, 2011) e também de outros fungos: o fungo filamentoso *Mortierella isabellina* (Hussain *et al.*, 2014) e a levedura *Rhodosporidium toruloides* (Liu e Zhao, 2007), esta que é outra das leveduras oleaginosas mais amplamente estudadas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Padronização do meio

#### 4.1.1 Etapa 1: Avaliação preliminar

Este trabalho teve como uma das metas encontrar a proporção ideal de combinação entre dois resíduos industriais que poderiam induzir a produção de lipídios e ser suficientemente adequada para propiciar uma boa produção de biomassa. O uso de glicerina bruta e resíduo de cervejaria já foi relatado (Poli *et al.*, 2014a); porém estes não eram os únicos componentes do meio de cultivo. No estudo de Poli e colaboradores (2014a), todos os meios utilizados eram complementados com 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,05% de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , e a exploração do resíduo de cervejaria foi apenas sugestiva quanto a futuras aplicações e não foi muito desenvolvida. No nosso trabalho foram avaliadas diferentes concentrações de glicerina (10%, 7% ou 5%) e de lama de cervejaria (0,1%, 1%, 2% ou 3%), para uma verificação preliminar do comportamento fisiológico da levedura em cada uma destas condições. Nenhum tipo de pré-tratamento foi aplicado aos resíduos, apenas foram combinados, o pH foi ajustado a 6 e o meio esterilizado. O único processo que pode contribuir para a disponibilização de nutrientes da lama de cervejaria, neste caso, é o processo natural de autólise, encadeado por enzimas endógenas (Ryu *et al.*, 2013).

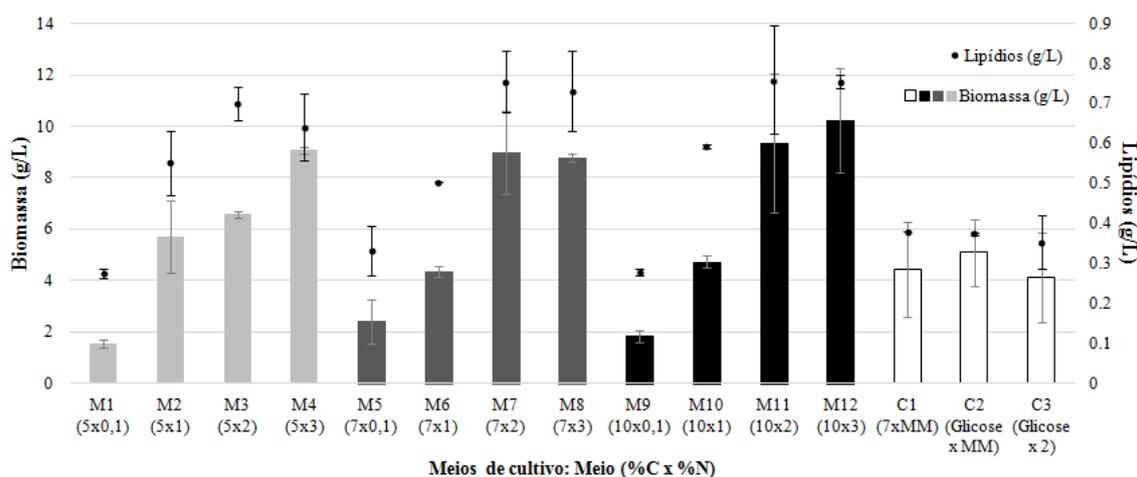


Figura 7 - Teor de biomassa e de lipídios dos cultivos na etapa 1 de padronização, após 96 h de incubação. Valores de biomassa, no eixo da esquerda, foram obtidos por peso seco; valores de lipídios no eixo da direita, foram obtidos por extração conforme item 3.4. Ambos os valores estão representados em g/L e considerando o desvio padrão. Meios de cultivo agrupados conforme a concentração de carbono. M1 a M12: Meios de cultivo teste e C1 a C3: Controles. Composição descrita abaixo da barra e na tabela 2.

Foi observado, conforme a figura 7, o aumento na produção de biomassa conforme maior a quantidade de lama no meio, sendo a maior produção (cerca de 9 g/L) nos meios contendo 2% e 3% de lama. Este resultado foi superior em praticamente o dobro do valor de biomassa dos meios controle, salientando a comparação aos meios contendo MM como suplementação. É sabido que *Y. lipolytica* não sintetiza tiamina (Groenewald *et al.*, 2013). Logo, a lama pode estar fornecendo um aporte de nutrientes mais adequado e completo para a multiplicação celular. Os meios contendo menor quantidade deste resíduo (0,1%) não proporcionaram suplementação adequada para sustentar uma boa multiplicação da levedura.

Quanto à glicerina, a melhor produtividade de biomassa e de óleo foi atingida utilizando 7% e 10%, sem diferença entre estas concentrações. Portanto, foi selecionado 7% para que não seja utilizada uma quantidade de glicerina superior àquela que o micro-organismo é capaz de metabolizar, pois o contrário levaria à geração de um resíduo do meio de cultura contendo glicerina não consumida. Cheirsilp e Louhasakul (2013) não observaram melhora no rendimento de biomassa ou óleo aumentando o teor de glicerina de 4% para 8%, explicando em razão da inibição pelo substrato, ou ainda, como foi utilizada glicerina como único composto no meio, devido à insuficiência de nutrientes. Outros estudos também apontaram para esta faixa de concentração de glicerina como a ideal para a indução da produção de lipídios (Kiran *et al.*, 2013; Yen *et al.*, 2012. Kitcha e Cheirsilp, 2011). Considerando meios de cultivo utilizados como controles, se observa a melhora significativa na produção de biomassa e uma tendência de aumento, na produção de lipídios, quando a glicose foi substituída por glicerina. Isso é devido à composição da glicerina, que contém impurezas que podem estar sendo utilizadas pela levedura, e também em termos de metabolização diferentes destas duas fontes de carbono. O glicerol pode ser transformado em moléculas intermediárias da via glicolítica através de fosforilação, gerando G3P, que é dehidrogenado; ou pela via oxidativa com subsequente fosforilação. Ambas as vias de assimilação geram dihidroxiacetona fosfato, que pode então ser convertida a ácido cítrico e lipídios, entre outros metabólitos (Makri *et al.*, 2010).

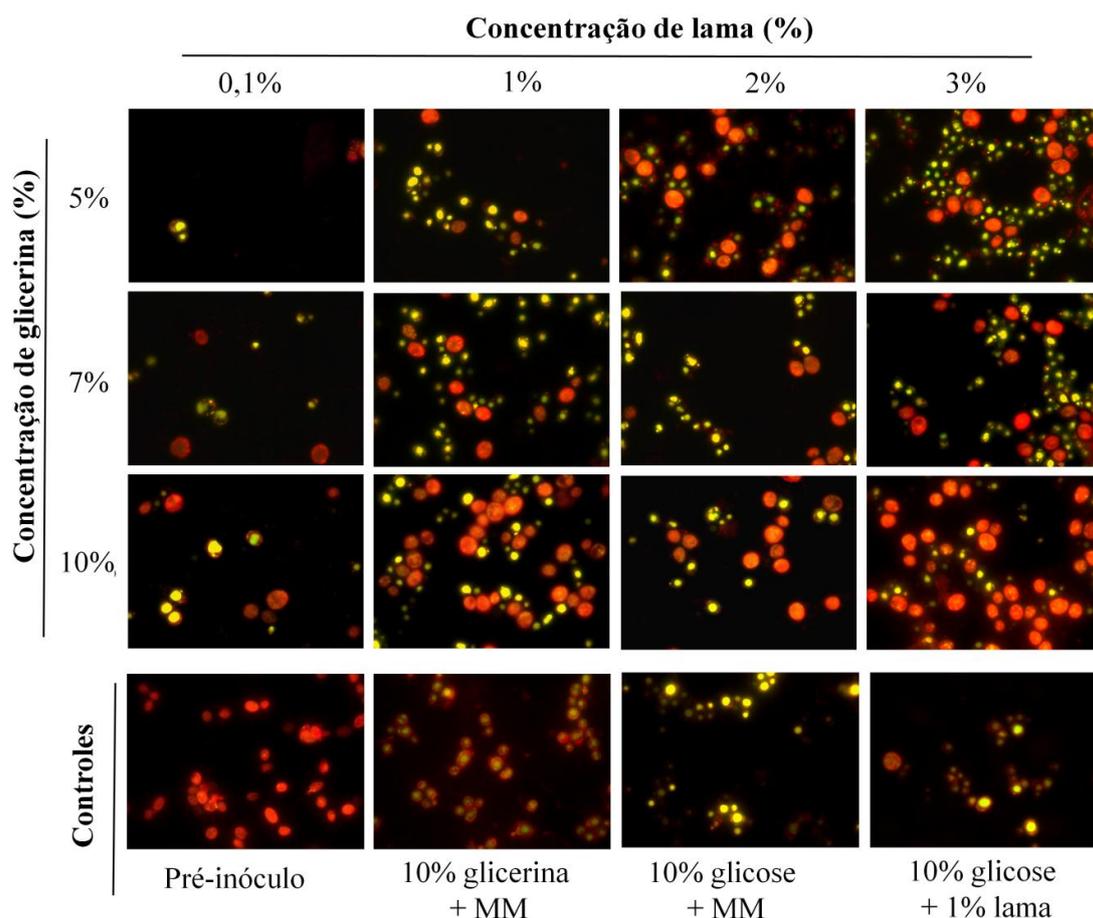


Figura 8 - Pannel com imagens da gota de óleo produzida na etapa 1 de padronização do meio, após 96h de cultivo de *Y. lipolytica* em diferentes meios contendo ou não lama de cervejaria. Em vermelho, fosfolipídios, e em amarelo-ouro, lipídios neutros (TAG) que compõem a gota lipídica. Imagens de microscopia de fluorescência (filtro 450 – 490 nm), aumento de 1000 vezes.

Os resultados observados nas análises de produção de biomassa e determinação gravimétrica da produção de óleo foram confirmados através da observação em microscópio das gotas lipídicas intracelulares produzidas (Figura 8). A microscopia de fluorescência das células coradas com vermelho de Nilo permite observar fosfolipídios (em vermelho e alaranjado) e lipídios neutros como TAG (em amarelo). Logo, fica clara a distinção entre as células de *Y. lipolytica*, que possuem uma gota amarela intracelular, e as células de *S. cerevisiae*, que compõem o fermento cervejeiro, que aparecem em vermelho e são maiores pois tais linhagens cervejeiras frequentemente apresentam poliploidia.

Foi verificada discrepância entre os dados de rendimento de óleo em % em relação à biomassa celular obtidos pela da quantificação de óleo por extração com solventes (método de Bligh e Dyer, 1959) e pela medição do

tamanho da gota de óleo que ocupa a célula observada nas imagens de fluorescência (Tabela 4). Uma pequena diferença era esperada, visto que o óleo possui uma massa menos densa do que o restante do conteúdo celular, e uma equivalência dos dados de gravimetria aos dados de medição por imagem somente seria possível caso o óleo e o restante da célula possuísem a mesma densidade. No entanto, a diferença foi tão pronunciada que outros fatores passaram a ser considerados. O principal deles é que no cálculo da porcentagem por peso seco foi levada em consideração a biomassa total, que inclui o peso da lama presente no meio. A lama não tem participação no acúmulo de óleo, então sua inclusão no cálculo tende apenas a diminuir os valores. Logo, o meio M9 (com maior razão C:N) seria aquele que propiciaria maior porcentagem de óleo acumulado por volume celular, no entanto ele carrega a menor quantidade de lama (0,1%) e, conseqüentemente, tem menor interferência do peso da mesma no cálculo do rendimento.

Tabela 4 - Diferenças na estimativa do teor de óleo em % entre os dois métodos testados, para a etapa 1. Comparação entre a medida da gota visualizada nas imagens e o valor calculado após a extração do óleo com solventes.

<b>Meio de cultivo: Meio (%C x %N)</b>	<b>Método de estimativa</b>	
	<b>ImageJ</b>	<b>Extração</b>
<b>M1 (5x0,1)</b>	58,59 ± 8,16	17,91 ± 1,24
<b>M2 (5x1)</b>	53,28 ± 7,14	14,16 ± 2,57
<b>M3 (5x2)</b>	51,47 ± 7,53	15,10 ± 1,49
<b>M4 (5x3)</b>	48,01 ± 9,35	9,78 ± 0,96
<b>M5 (7x0,1)</b>	58,90 ± 6,99	11,19 ± 0,00
<b>M6 (7x1)</b>	57,04 ± 8,11	12,53 ± 0,52
<b>M7 (7x2)</b>	56,04 ± 6,23	10,64 ± 0,42
<b>M8 (7x3)</b>	52,75 ± 8,31	8,44 ± 0,65
<b>M9 (10x0,1)</b>	54,38 ± 9,54	8,25 ± 0,95
<b>M10 (10x1)</b>	58,81 ± 8,08	7,06 ± 0,80
<b>M11 (10x2)</b>	53,84 ± 8,21	8,34 ± 1,30
<b>M12 (10x3)</b>	45,86 ± 6,07	7,52 ± 1,34
<b>C1 (7xMM)</b>	50,71 ± 8,43	12,22 ± 0
<b>C2 (Glicose x MM)</b>	49,34 ± 7,26	7,59 ± 1,87
<b>C3 (Glicose x 2)</b>	57,20 ± 9,90	9,02 ± 2,22

Outra explicação, que também afetaria a estimativa da produtividade de lipídios por volume de meio, seria algum problema relacionado à extração do óleo. Podem ocorrer perdas durante as etapas de extração (Poli *et al.*, 2013),

desde um rompimento ineficiente da célula pela homogeneização, perdas de líquido retido no papel da filtração, até o próprio volume da fase orgânica que não é coletado em sua totalidade para evitar contaminação por sólidos da fase aquosa.

Os valores de desvio padrão para a quantificação via ImageJ, que variam entre 6 e 9%, são relativamente elevados, devido a heterogeneidade das células encontradas nas imagens. Se observa, em um mesmo campo, células mais jovens cujo corpo lipídico ainda não teve um incremento completo, e também células que entraram plenamente em lipogênese. Apesar disto, se mostrou um bom método para quantificação do rendimento de óleo.

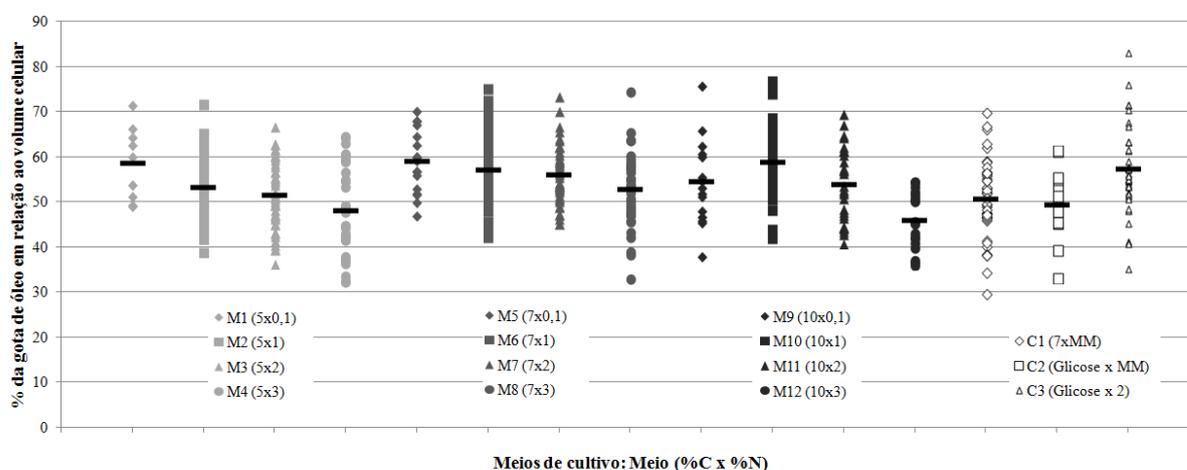


Figura 9 - Medida de área da gota de óleo produzida pela levedura nos diferentes meios de cultura da etapa 1 de padronização. O traço preto que corta a distribuição representa a média. Número amostral de cada tratamento, em número de células medidas: M1=9; M2=43; M3=43; M4=37; M5=17; M6=47; M7=49; M8=36; M9=15; M10=31; M11=30; M12=20; C1=46; C2=16; C3=36.

O rendimento de lipídios, representado na Figura 9 em porcentagem de lipídios por peso seco de célula, foi maior quanto menor a quantidade de lama utilizada, sendo 0,1% a concentração que melhor proporcionou o acúmulo de óleo (exceto no meio com 10% de glicerina). Isso se deve a elevada razão Carbono:Nitrogênio destes meios, um fator amplamente discutido na literatura como o principal desencadeante de lipogênese devido a restrição de nitrogênio (Beopoulos *et al.*, 2009). No entanto, este também foi o meio que rendeu a mais pobre produção de biomassa (Figura 7). O resultado é uma população reduzida de células com alta produção de óleo, levando a baixa produtividade em g/L: cerca de quatro vezes menor do que o meio utilizando 2% de lama.

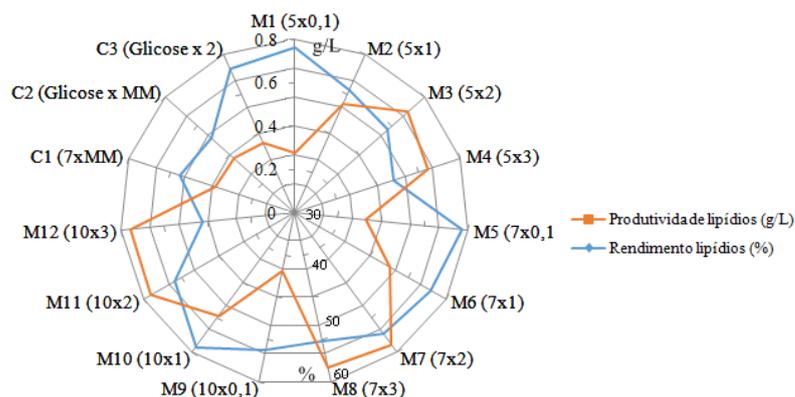


Figura 10 - Contraste entre os valores de rendimento de lipídios (%) e de produtividade (g/L) dos cultivos da etapa 1 de padronização do meio.

Um desvínculo entre % de óleo e produtividade em g/L foi verificado pela sobreposição dos parâmetros (Figura 10). Como dito anteriormente, uma alta porcentagem de óleo constituindo o volume celular não é sinônimo de elevada produtividade volumétrica. Tal perfil foi observado no presente estudo. De forma geral, os meios onde a porcentagem de óleo resultante foi intermediária apresentavam uma composição que propiciou a multiplicação da levedura de forma satisfatória, resultando em maior produtividade de óleo em g/L quando comparados aos meios onde a porcentagem foi maior.

#### 4.1.2 Etapa 2: Avaliação direcionada

Para melhor entender o comportamento da levedura em diferentes situações metabólicas, foram avaliados mais detalhadamente os meios M7, M9 e M10, comparados aos mesmos controles da etapa 1.

Os cultivos aqui avaliados propiciaram diferentes comportamentos fisiológicos para a levedura QU31 (Figura 11, A). O meio M7 propiciou a melhor produção de lipídios e de biomassa por volume de meio, superior aos controles (corroborando resultado da etapa 1), porém não foi o melhor no acúmulo de óleo por volume celular. M9 foi um dos meios que melhor induziu acúmulo de óleo, mas com prejuízo à multiplicação celular, e M10 o que propiciou um dos melhores rendimentos em %, se mostrou tão eficiente quanto os controles, mas não foi eficaz para uma boa produtividade em g/L.

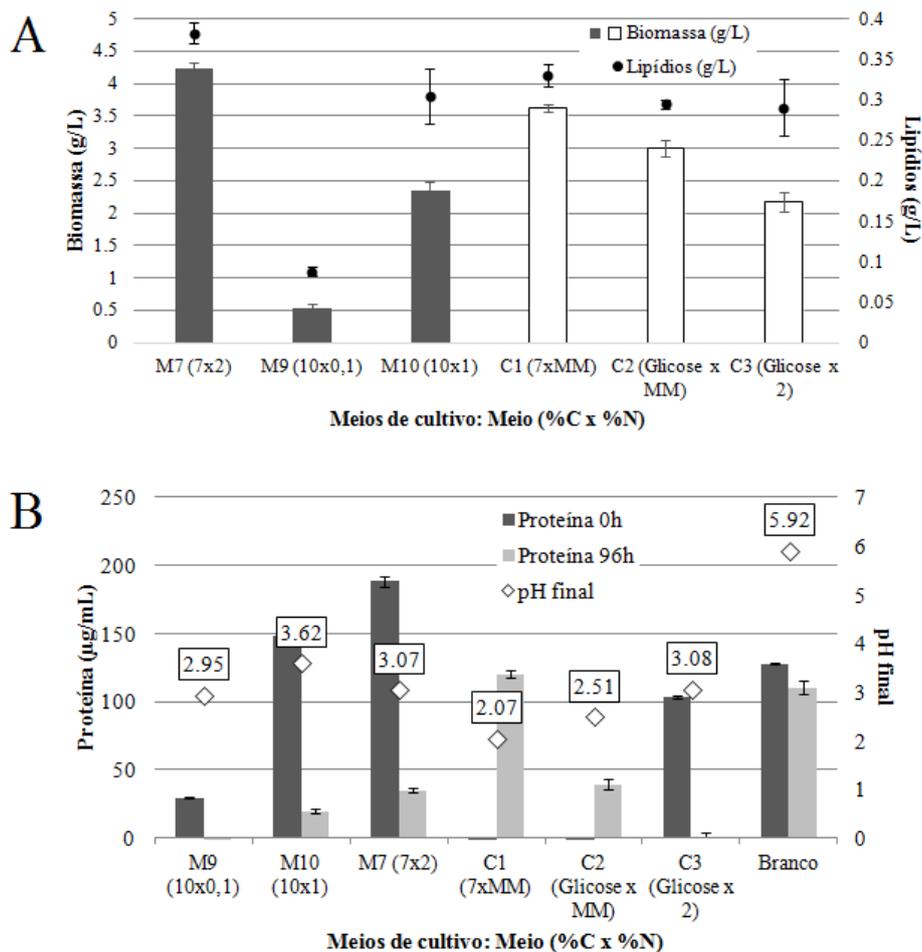


Figura 11 - Parâmetros do cultivo da levedura *Y. lipolytica* QU31 na etapa 2 de padronização do meio. A: Teor de biomassa e de lipídios dos cultivos da etapa 2 de padronização, após 96 h. Valores de biomassa no eixo da esquerda, obtidos por peso seco; valores de lipídios no eixo da direita, obtidos por extração conforme item 3.4. Ambos representados em g/L e considerando o desvio padrão. B: Teor de proteína, representando o nitrogênio do meio (µg/mL) no eixo da esquerda; pH final do cultivo no eixo da direita. M7, M9 e M10: Meios de cultivo teste e C1-C3: Controles; composição descrita abaixo da barra e na tabela 2.

A medida do teor de proteínas do meio foi realizada tendo em vista a avaliação da quantidade de nitrogênio na forma de proteína solúvel no sobrenadante (Figura 11, B). Exceto nos meios C1 e C2, onde não houve a adição de lama, pode ser visualizado o consumo dos nutrientes proteicos que faziam parte da composição deste resíduo. Esta é uma medida indireta do consumo de nitrogênio ao final do cultivo. Nos meios M7, M9, M10 e C3, o teor de proteína cai significativamente, indicando que esta foi consumida, enquanto no meio sem inóculo (Branco), o valor se mantém praticamente constante. O pH de todos os meios sofreu acidificação ao longo das 96 horas de cultivo, em contraste ao meio sem inóculo, que se manteve perto do valor inicial (5,92).

As imagens de microscopia de fluorescência permitem visualizar que os resíduos testados foram eficazes na indução da produção de lipídios.

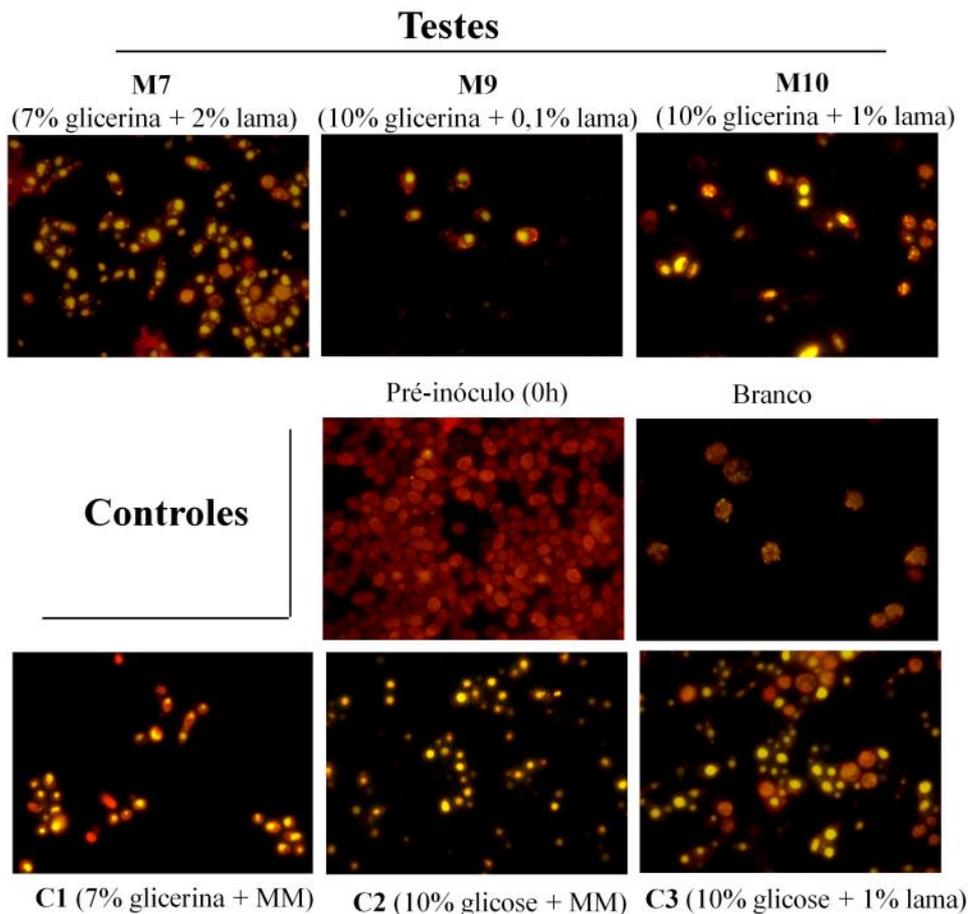


Figura 12 - Paineis com imagens da gota de óleo produzida na etapa 2 de padronização, após 96h de cultivo em diferentes meios contendo ou não lama de cervejaria. Em vermelho, fosfolipídios, e em amarelo-ouro, lipídios neutros (TAG) que compõem a gota lipídica. Imagens visualizadas através de microscopia de fluorescência (filtro 450 – 490 nm), no aumento de 1000 vezes.

Destacando a imagem da cultura no tempo inicial (Figura 12), na qual foi observada uma alíquota do pré-inóculo da levedura QU31, está representada uma imagem típica de uma levedura oleagiosa na fase de produção de biomassa. O fenótipo “*slim yeast*” se manifesta, sem produção abundante de óleo neste momento. As demais imagens indicam a mudança notável para a fase de acúmulo de SCO, e a predominância do fenótipo “*obese yeast*”.

Da mesma forma como mencionado na etapa 1 de padronização do meio de cultivo, foi verificado que a quantificação do rendimento de lipídios em % da biomassa produzida não é o método mais adequado quando é utilizada lama de cervejaria no cultivo (Tabela 5). Por isso, a estimativa deste valor foi

feita através da medida da gota de óleo via software ImageJ e os resultados estão representados na figura 13.

Tabela 5 - Diferenças na estimativa do teor de óleo em % entre os dois métodos testados, para a etapa 2. Comparação entre a medida da gota visualizada nas imagens e o valor calculado após a extração do óleo com solventes.

Meio de cultivo: Meio (%C x %N)	Método de estimativa	
	ImageJ	Extração
<b>M9 (10x0,1)</b>	60,80 ± 9,10	17,71 ± 3,99
<b>M10 (10x1)</b>	60,10 ± 9,15	14,31 ± 2,11
<b>M7 (7x2)</b>	53,99 ± 8,13	9,03 ± 0,13
<b>C1 (7xMM)</b>	47,91 ± 6,78	9,12 ± 0,39
<b>C2 (Glicose x MM)</b>	49,19 ± 6,02	9,83 ± 0,36
<b>C3 (Glicose x 2)</b>	51,33 ± 6,14	13,34 ± 0,65

Os meios teste, contendo lama, tendem a ser superiores aos meios controle quanto ao rendimento de lipídios por volume celular (Figura 13). O melhor resultado foi atingido com o cultivo nos meios M9 e M10, sendo M7 intermediário e a seguir, os controles. O comportamento oposto dos valores de produtividade e de rendimento também foi observado nesta etapa do estudo (Figura 14). Foi encontrado que a produtividade de óleo, em gramas por litro, está relacionada à quantidade de lama presente no meio de cultivo. Apesar de induzir uma produção excelente em porcentagem, o meio M9, contendo apenas 0,1% de lama, não suportou o crescimento adequado da levedura, resultando em uma produtividade muito pobre em relação ao volume do meio. Já o meio contendo 2% deste resíduo apresentou a melhor produtividade, em detrimento do rendimento em volume celular.

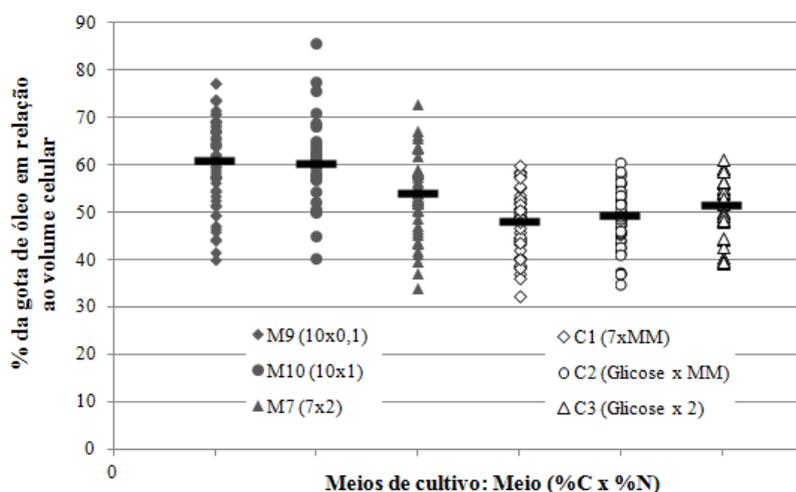


Figura 13 - Medida de área da gota de óleo produzida pela levedura nos diferentes meios de cultura da etapa 2 de padronização. O traço preto que corta a distribuição representa a média. Número amostral de cada tratamento, em número de células medidas: M9=59, M10=33, M7=49, C1=48, C2=48 e C3=34.

Como todos os meios testados foram eficazes na indução da produção de SCO, resta identificar os fatores que influenciam no maior teor de óleo entre estes meios. O efeito da quantidade de lama foi encontrado como o mais impactante e, mesmo que uma grande quantidade deste resíduo não propicie o maior rendimento em porcentagem entre os testes, a produtividade em gramas por litro de cultivo é superior. Isto ocorre devido à maior quantidade de nutrientes no início do cultivo, o que oportuniza uma fase de produção de biomassa mais estendida, pois o momento da depleção de elementos como o nitrogênio chega mais tarde. Com isso, o cultivo entra na fase de lipogênese contendo uma grande carga microbiana, que sintetiza e armazena TAG a partir do carbono em excesso resultando na grande produtividade por volume de meio.

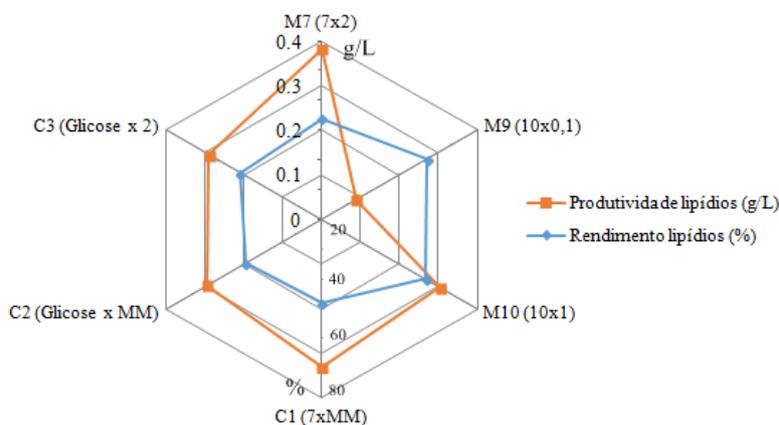


Figura 14 - Contraste entre os valores de rendimento de lipídios (%) e de produtividade (g/L) dos cultivos da etapa 2 de padronização do meio.

Uma alternativa para maximizar a quantidade de óleo produzido é o estudo detalhado da cinética do processo, através da retirada de amostras e avaliação dos parâmetros em tempos estabelecidos do cultivo. O conhecimento mais aprofundado do comportamento da levedura poderia esclarecer qual o momento em que está em fase de produção de biomassa, quando inicia a troca para a lipogênese, quando a taxa de produção de óleo cresce e se observa o fenótipo “*obese yeast*” e, finalmente, quando o cultivo deve ser interrompido para evitar a mobilização e utilização das reservas de TAG, que coincide com a fase de produção de ácido cítrico (Papanikolau *et al.*, 2002b).

De forma geral, todos os parâmetros testados foram superiores nos meios contendo resíduos se comparados ao meio controle, contendo apenas glicose e suplementação padrão definida (MM). Poli e colaboradores (2014a),

em contraste, encontrou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como a melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipídios e biomassa para uma cepa de *Y. lipolytica*. No entanto, a preparação da lama utilizada era diferente, pois sofria um pré-tratamento.

Um estudo utilizando apenas resíduo de cervejaria para o cultivo de *C. curvatus* e produção de óleo testou diversos pré-tratamentos quanto ao desempenho na disponibilização de nutrientes (Ryu *et al.*, 2013). Compreendiam hidrólise ácida, básica ou com água deionizada e altas temperaturas. Entretanto, além dos tratamentos causarem estresse iônico no meio resultante pelas elevadas concentrações de íons como  $\text{Na}^+$ , não eram economicamente viáveis pelo gasto de energia e reagentes e também geravam um resíduo: a fração sólida era desprezada enquanto a fração aquosa contendo nutrientes solúveis era empregada nos testes de crescimento. O estudo fala dos benefícios do pré-tratamento, no entanto, não realizou os procedimentos com o resíduo sem processamento, para poder afirmar o quão vantajosos são estes métodos sobre o processo natural de autólise. A autólise pode ser acelerada por plasmólise, utilizando sais inorgânicos ou solventes orgânicos como tolueno e etanol (VUKAŠINOVIĆ-MILIĆ *et al.*, 2007).

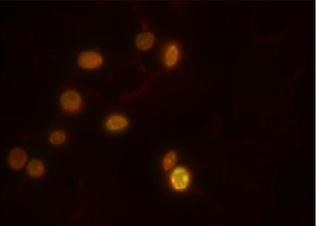
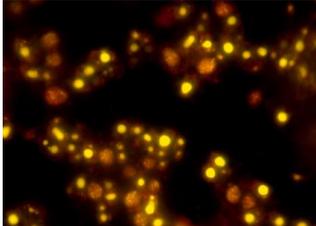
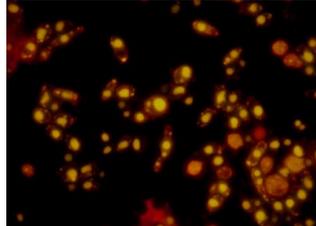
O meio escolhido para os experimentos seguintes de produção de óleo em biorreator é composto de 7% de glicerina e 2% de lama de cervejaria. Este não é o meio que induz o maior rendimento de óleo em porcentagem de volume celular, no entanto, rende a melhor produtividade por volume de cultivo. Isto implica em maior porcentagem de volume celular que não é representado por óleo microbiano. Após a síntese de biodiesel por metanólise e transesterificação, é gerado um resíduo de células de levedura lisadas e sem lipídios (DYC). Neste trabalho, a geração de biomassa livre de óleo não é um problema. Como será visto no item 4.4, este subproduto pode ser aproveitado como suplementação do meio de cultivo, semelhantemente à lama.

#### 4.2 Escalonamento para biorreator

Uma vez determinado em escala de bancada o melhor meio de cultivo para o objetivo em questão, o mesmo foi empregado para estudar o escalonamento da produção de biomassa de levedura oleaginosa em biorreator. Entender o comportamento da levedura em um fermentador é a etapa inicial essencial para verificar a viabilidade de um processo em escala

industrial. Quanto à adição de antiespumante, não foram encontrados na literatura relatos de que a solução tenha interferência (seja ela positiva ou negativa) na produtividade de óleo microbiano.

Tabela 6 - Parâmetros do cultivo da levedura QU31 em biorreator, nos tempos inicial e final, em comparação à escala de frascos. A medida de óleo através do software ImageJ foi realizada utilizando 38 células. Imagens da gota de óleo obtidas por microscopia de fluorescência, no aumento de 1000 vezes. A porcentagem de óleo do tempo inicial do cultivo em biorreator não foi medida pois as células não apresentam um corpo lipídico distinguível que possa ser medido, nessa fase de crescimento.

Parâmetro	Biorreator		Frascos
	0 h	96 h	96 h
Biomassa (g/L)	0,81 ± 0,01	5,51 ± 0,07	4,24 ± 0,08
Óleo (g/L)	0,17 ± 0,01	0,78 ± 0,03	0,38 ± 0,01
Óleo % (ImageJ)	-	54,54 ± 6,95	53,99 ± 8,13
pH	6	3,18	2,95
Proteína	165,55 ± 1,59	11,91 ± 0,6	34,73 ± 1,70
Gota de óleo			

O escalonamento do cultivo da levedura *Y. lipolytica* QU31 para biorreator de 5 litros (Tabela 6) manteve a porcentagem de óleo e foi benéfico para a produção de biomassa, surtindo efeito positivo na produção de lipídios. O teor final alcançou  $0,78 \pm 0,03$  g/L. Um dos fatores que contribui para a melhora no desempenho de um processo quando escalonado é a facilidade no controle dos parâmetros e a possibilidade de maior aeração do cultivo (Papanikolau *et al.*, 2002a). Assim como os nutrientes adicionados ao meio, o oxigênio é um elemento necessário ao crescimento da levedura, e o melhoramento na aeração aumenta a disponibilidade desse nutriente (Lima *et al.*, 2001). O oxigênio foi fornecido ao cultivo por um cilindro de ar comprimido, sendo as bolhas de ar liberadas no fundo do frasco, a uma taxa específica, e logo acima se localizava a hélice agitadora, que contribui para que as bolhas sejam divididas e o oxigênio se propague melhor. Em elevadas concentrações de oxigênio dissolvido, os genes codificantes de enzimas envolvidas na lipogênese, como ATP-citrato liase e enzima málica, tem a expressão induzida, causando impacto direto na produtividade de óleo microbiano. Por outro lado,

quando a concentração de oxigênio é baixa, a levedura *Y. lipolytica* tende a crescer formando hifas e produzir teores baixos de lipídios (Bellou *et al.*, 2014).

A melhora nos valores dos parâmetros foi alcançada, no entanto, estes valores podem se tornar ainda maiores se as condições de cultivo forem otimizadas. A forma de cultivo em batelada é importante por propiciar o esgotamento de nitrogênio, que é necessário para a indução da lipogênese. Além da implementação de um controle do pH do cultivo, uma alternativa de melhoramento a ser considerada é a estratégia de cultivo de batelada alimentada. Através dela, a fase de produção de biomassa pode ser prolongada, pela adição controlada de nutrientes e manutenção do meio rico por mais tempo. A fase de crescimento é crucial para se obter uma grande produtividade de lipídios, pois é durante esta fase que ocorre praticamente toda a multiplicação da levedura e é isto o que irá determinar a quantidade de células hábeis a entrar em lipogênese na fase seguinte do cultivo. É possível controlar os fluxos de carbono e nitrogênio, a lipogênese e evitar a produção de metabólitos indesejados (como o ácido cítrico) (Beopoulos *et al.*, 2009). São diversos os relatos de aumento na produção de óleo utilizando este tipo de cultivo de leveduras oleaginosas, como *Cryptococcus curvatus*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Y. lipolytica* (Zhang *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2010; Kiran *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010; Papanikolaou *et al.*, 2001). Os trabalhos mais recentes de cultivo de *Y. lipolytica* em batelada alimentada incluem produção de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, eritritol,  $\gamma$ -decalactona e SCO a partir de ácidos graxos voláteis (Yu *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2012; Fontanille *et al.*, 2012). Ainda é necessário um melhoramento na técnica de cultivo para atingir a maior produtividade possível do cultivo desta levedura oleaginosa.

A biomassa da levedura QU31 produzida em biorreator foi coletada por ciclos de centrifugação, seca e empregada na síntese de biodiesel.

#### 4.3 Produção de biodiesel

Foram comparadas três diferentes metodologias de síntese de biodiesel através de metanólise e transesterificação: síntese por catálise básica

conforme Thliveros (2014) realizada com ou sem agitação, ou então catálise ácida, conforme Liu e Zhao (2007). Embora a catálise básica seja empregada comercialmente, a ácida foi estudada pois não é sensível à presença de AGL. Em função do metabolismo da levedura, o óleo microbiano pode conter uma fração variável de AGL, portanto, essa é uma metodologia que é considerada para a síntese de biodiesel microbiano (Leiva-Candia *et al.*, 2014).

Todas as reações foram realizadas utilizando a biomassa previamente cultivada em biorreator e seca a 60°C. A secagem a essa temperatura é importante pois auxilia na inativação de enzimas lipases endógenas da levedura, que poderiam atuar na hidrólise dos TAGs em AGL caso a biomassa fosse armazenada a temperatura ambiente (Koutinas *et al.*, 2014).

Conforme a cromatografia em camada delgada (CCD) ilustrada na figura 15, pode ser visto que o óleo microbiano é composto principalmente por TAG e MG. Ainda pode ser distinguido um pequeno ponto, a uma altura próxima a AGL e DG, pois essa é a região onde migram fosfolipídios (Fei *et al.*, 2015). A eficácia dos métodos de produção de biodiesel foi comprovada pela presença de um grande ponto na altura dos ésteres metílicos, em todas as três amostras. Também pode ser observada a ausência de TAG, que era o componente majoritário do óleo, indicando que este foi convertido progressivamente a DG e MG, gerando biodiesel. Nas amostras de catálise básica, podem ser vistos pontos na altura de DG e AGL, o que indica que existe um teor de óleo não totalmente convertido a biodiesel, e que o processo ainda pode ter algumas condições otimizadas visando o aumento na taxa de conversão.

Foi investigada a eficiência dos diferentes métodos de metanólise e transesterificação na conversão do óleo da biomassa da levedura em ésteres metílicos. O teste da reação com agitação visava verificar se a aplicação de agitação proporcionaria melhor transferência de massa entre os reagentes e, portanto, uma maior conversão do óleo em biodiesel. A CCD fornece apenas um dado qualitativo quanto a presença dos componentes, portanto, a partir dela não pode ser afirmado qual dos tipos de catálise básica empregados foi mais eficaz. O que pode ser verificado é que a amostra contendo biodiesel produzido via catálise ácida possui menos contaminantes e material residual (apenas um pouco de AGL), devido ao procedimento de purificação que estava incluso na metodologia (Liu e Zhao, 2007).

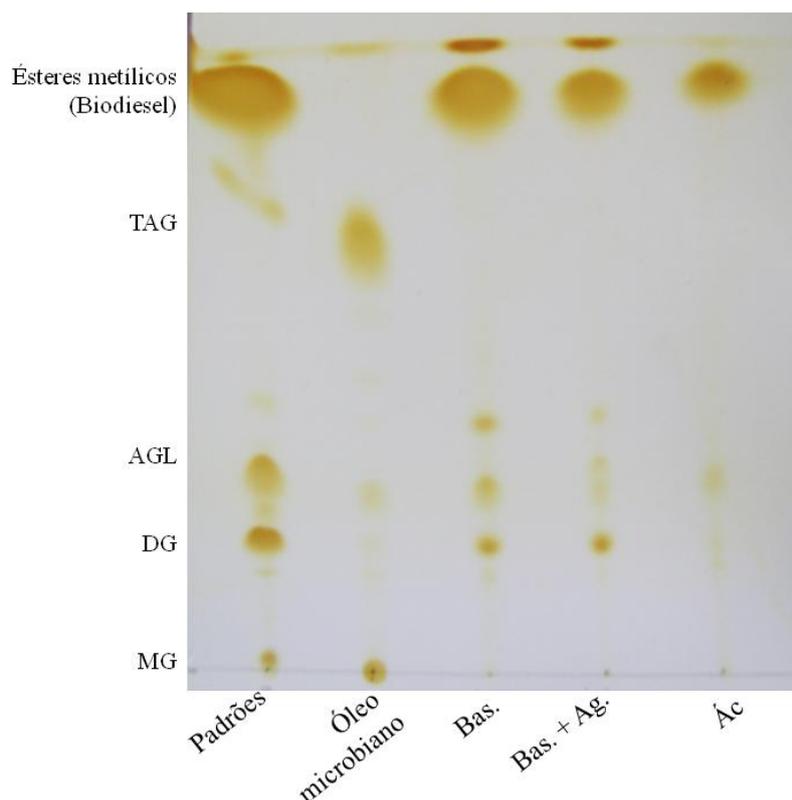


Figura 15 - Cromatografia em camada de sílica das amostras de óleo microbiano extraído a partir da biomassa cultivada em biorreator e da produção de biodiesel pelos três tipos de catálise: básica (Bas.); básica com agitação (Bas. + Ag.) ou catálise ácida (Ác.). As amostras foram aplicadas lado a lado sobre uma linha a 1cm da base da camada. No ponto da esquerda, foram aplicados os padrões para comparação, compostos de ésteres metílicos, TAG (triacilglicerídeos), AGL (ácidos graxos livres), DG (diglicerídeos) e MG (monoglicerídeos).

A cromatografia gasosa permitiu realizar esta análise. Aparentemente, a catálise ácida resultou em um biodiesel com fração aumentada de ácido linoleico (C18:2) e palmítico (C16:0), e menor de C18:1 (Figura 19, C) A composição dos ésteres com mais de 20 carbonos também foi variável, mas este pode ser um artefato do grau de concentração das amostras. A área de ésteres muito diluídos no cromatograma não é avaliada pelo software. Apesar disso, a composição dos ésteres majoritários se mantém essencialmente a mesma.

Tabela 7 - Concentração dos ésteres totais produzidos através dos diferentes tipos de catálise empregados.

<b>Tipo de Catálise</b>	<b>Ésteres totais (mg/mL)</b>
Básica sem agitação	1,13
Básica com agitação	1,49
Ácida	2,17

Na Tabela 7 estão os dados obtidos pela quantificação dos ésteres totais a partir da adição de um padrão interno de concentração conhecida junto à amostra. Está indicado que a aplicação de agitação contribuiu à conversão dos TAGs em biodiesel. A agitação proporciona maior transferência de massa numa reação de transesterificação (Demirbas, 2009), e também pode ter auxiliado na ruptura das células da levedura e disponibilização do óleo. A catálise ácida levou ao maior teor de ésteres entre os métodos testados. Este resultado pode ser decorrente do procedimento de purificação do biodiesel produzido, realizado após a síntese, que conta com a concentração da amostra (Liu e Zhao, 2007). A catálise básica, por sua vez, apresenta aproximadamente a metade da concentração de ésteres do que a ácida e não sofreu nenhum tipo de concentração ou purificação (Thliveros *et al.*, 2014).

#### 4.4 Padronização do meio, etapa 3: Utilização de biomassa livre de óleo

A aproximação de um bioprocessamento a um modelo cíclico, onde resíduos gerados em uma etapa são capazes de alimentar outras, é uma proposta que minimiza custos e o impacto ambiental que seria resultante da geração de subprodutos. A utilização de restos de levedura oleaginosa para cultivos subsequentes foi descrita recentemente (Thiru *et al.*, 2011) e ainda é pouco explorada. Este resíduo foi chamado de DYK, do inglês *deoiled yeast cake*, ou seja, a biomassa livre de óleo.

O resíduo de levedura *Y. lipolytica* QU31 após metanólise e transesterificação foi testado como complementação do meio de cultivo, combinado à glicerina bruta, de forma semelhante à lama de cervejaria testada anteriormente. As concentrações testadas foram as mesmas da etapa 2. Foi utilizado um controle adicional, composto pelo melhor meio escolhido nas etapas 1 e 2: o M7. Aqui, foi chamado de C4 para fins de diferenciação do M7 testado com DYK nesta etapa.

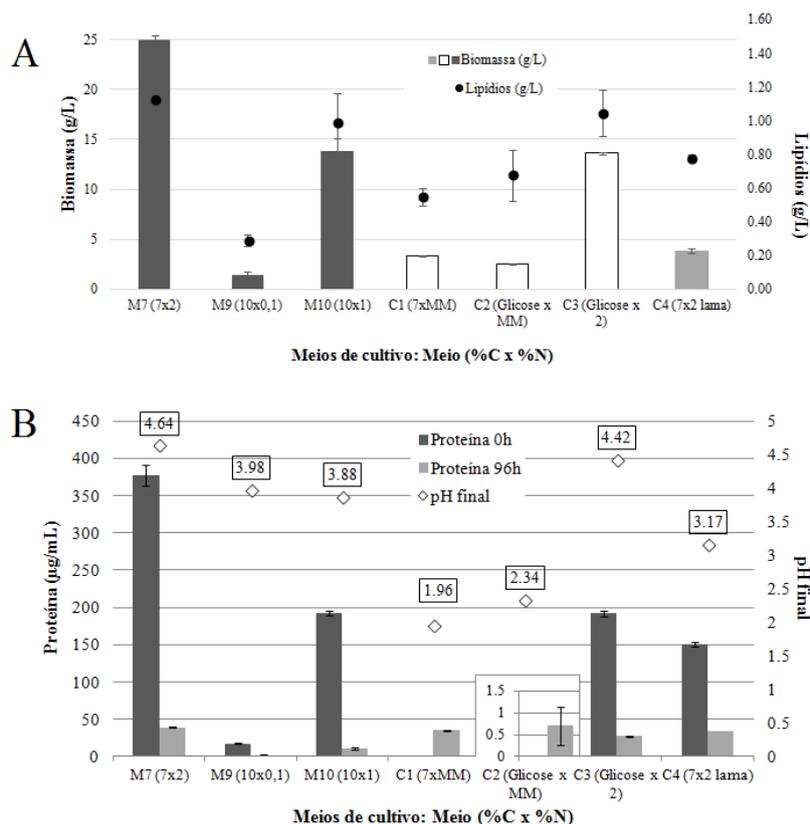
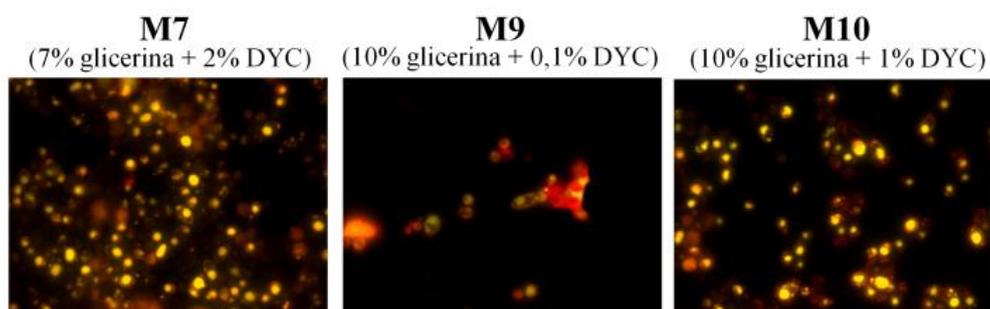


Figura 16 - Parâmetros de biomassa, lipídios, proteína e pH final para a etapa 3 de padronização do meio de cultura. A: Teor de biomassa e lipídios dos cultivos da etapa 3 de padronização, após 96 h. Valores de biomassa no eixo da esquerda, obtidos por peso seco; valores de lipídios no eixo da direita, obtidos por extração conforme item 3.4. Ambos representados em g/L e considerando o desvio padrão. B: Teor de proteína, representando o nitrogênio do meio ( $\mu\text{g/mL}$ ) no eixo da esquerda; pH final do cultivo no eixo da direita. M7, M9 e M10: Meios de cultivo teste e C1-C4: Controles; composição descrita abaixo da barra.

A produção de biomassa e de lipídios foi notavelmente superior aos meios contendo lama de cervejaria (Figura 16). Os meios M10 e M7 apresentaram teor de biomassa e lipídios por volume de meio superiores ao meio padrão com lama. Da mesma forma como observado na figura 11B da etapa 2, o consumo da proteína do meio para a multiplicação celular é notável. O pH final dos cultivos com DYC se manteve próximo de 4 e não caiu tanto quanto o meio C4, que chegou a 3,17. A razão pode ser devido à característica deste resíduo, que é proveniente da síntese de biodiesel utilizando catálise básica. Ele se apresenta na forma de pequenos grumos (Figura 4, C) e, mesmo que o pH do meio possa ter sido ajustado para 6 no tempo inicial, é possível que tenha ocorrido alcalinização do meio conforme estas partículas foram se dissolvendo com a agitação do cultivo.

## Testes



## Controles

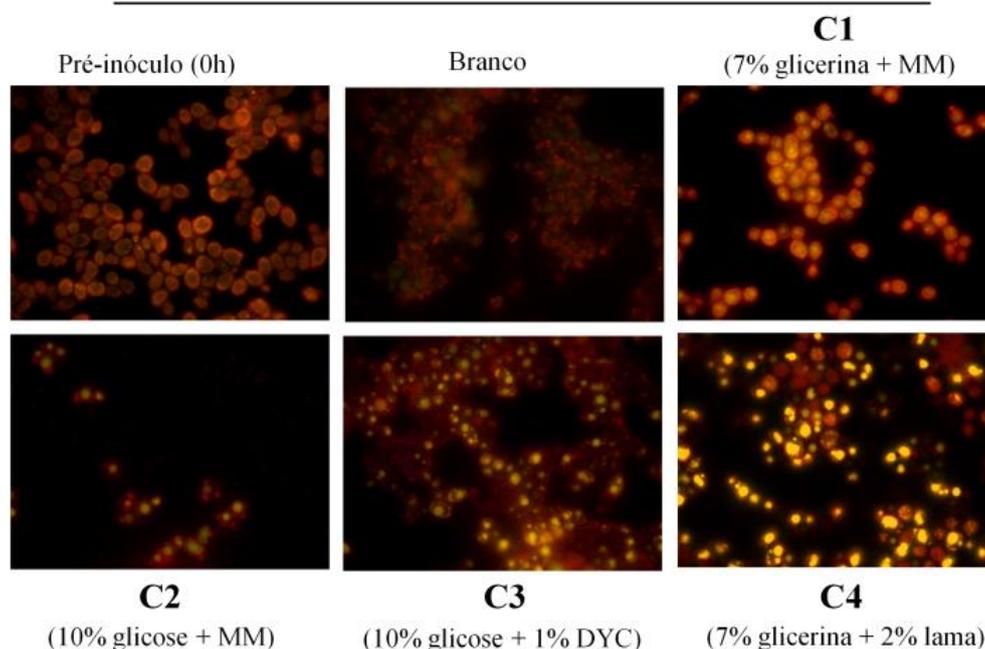


Figura 17 - Painel com imagens da gota de óleo produzida após 96h de cultivo em diferentes meios contendo ou não resíduo de *Y. lipolytica* QU31 (DYC). Em vermelho, fosfolípidios, e em amarelo-ouro, lípidios neutros (TAG) que compõem a gota lipídica. Imagens visualizadas através de microscopia de fluorescência (filtro 450 – 490 nm), no aumento de 1000 vezes.

Conforme a figura 17 de microscopia é possível visualizar no controle Branco uma quantidade de células disformes e alguns pedaços de células, o que indica que este resíduo sofreu lise na etapa anterior de metanólise e transesterificação. Enquanto na imagem do pré-inóculo a levedura não apresenta um corpo lipídico distinguível por microscopia, observa-se tanto nos meios M quanto nos controles C que a produção é induzida após 96h, e que a utilização de DYC é eficiente para induzir o fenótipo “*obese yeast*”, semelhantemente aos controles. Estas imagens foram utilizadas para a medida da gota de óleo via software ImageJ.

Tabela 8 - Diferenças na estimativa do teor de óleo em % entre os dois métodos testados, para a etapa 3. Comparação entre a medida da gota visualizada nas imagens e o valor calculado após a extração do óleo com solventes.

Meio de cultivo: Meio (%C x %N)	Método de estimativa	
	ImageJ	Extração
M9 (10x0,1)	57,32 ± 7,70	19,76 ± 6,72
M10 (10x1)	55,19 ± 7,92	7,10 ± 0,91
M7 (7x2)	64,95 ± 6,92	4,54 ± 0,90
C1 (7xMM)	47,59 ± 8,95	16,49 ± 1,14
C2 (Glicose x MM)	54,02 ± 7,92	26,21 ± 5,88
C3 (Glicose x 2)	57,27 ± 8,61	7,70 ± 1,09
C4 (7x2 lama)	57,84 ± 6,74	20,91 ± 0,69

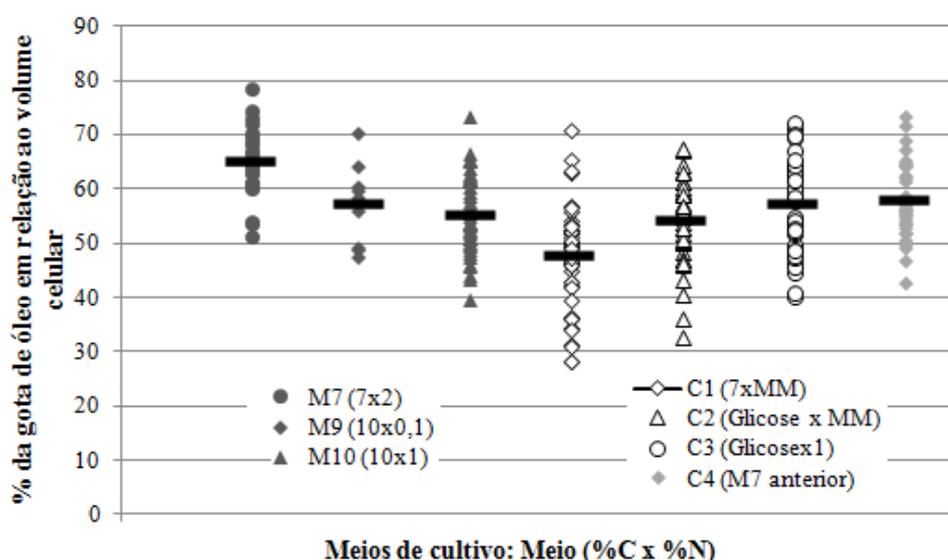


Figura 18 - Medidas da % da gota de óleo em relação ao volume celular da levedura oleaginosa. O traço preto que corta a distribuição representa a média. Número amostral de cada tratamento, em número de células medidas: M7=50, M9=9, M10=47, C1=52, C2=38, C3=42 e C4=38.

Diferentemente das etapas 1 e 2, o meio que proporcionou a melhor porcentagem de óleo por volume celular pela quantificação via ImageJ foi M7 (Figura 18). Cabe salientar que o resultado foi superior ao meio C4, de composição semelhante porém com lama de cervejaria no lugar de resíduo de *Y. lipolytica* QU31. Os meios M9 e M10 tiveram resultados semelhantes aos controles. Portanto, para o cultivo utilizando resíduo de levedura oleaginosa, o meio com melhor desempenho em todos os aspectos foi o M7, que então é o mais adequado para realizar o cultivo de indução da produção de lipídios.

Fica clara a razão pela qual os resíduos tendem a suportar melhor o crescimento de uma levedura: o que é tratado como contaminante na indústria

pode representar um nutriente assimilável pelo micro-organismo. Resíduos possuem formulação mais complexa de nutrientes e, por isso, suportaram melhor o desenvolvimento e lipogênese desta levedura oleaginosa.

O resíduo composto por DYC proporcionou melhor crescimento da levedura, e a razão pode estar no tratamento de metanólise e transesterificação que a biomassa sofre para a produção de biodiesel. As células são lisadas via solvente, o que proporciona a liberação de diversos componentes quando em meio líquido. Nas etapas 1 e 2, os potenciais nutrientes que estão localizados intracelularmente podem ter permanecido confinados nas células das leveduras que compõem a lama, pois não foi realizado nenhum tipo de processamento neste resíduo. Ao utilizar DYC, o passo necessário para a disponibilização do óleo microbiano na síntese de biodiesel cumpre papel duplo, ao atuar de certa forma também como um pré-tratamento da biomassa.

Koutinas (2014) realizou um estudo técnico da viabilidade financeira da implementação de uma indústria de produção de biodiesel a partir de óleo microbiano. Nos seus cálculos, o custo final de produção do biodiesel a partir de metanólise direta e transesterificação seria \$4,93 dólares por litro. São considerados usos alternativos para os resíduos gerados, bem como o reaproveitamento dos solventes por destilação. Para o resíduo de biomassa, é sugerida a comercialização para indústrias de ração animal, a um valor que flutua entre \$1,50 e \$2,50 dólares, o que contribuiria para a redução no custo de produção do óleo microbiano em aproximadamente \$1 dólar por litro de óleo. Não existem estudos deste tipo considerando o reuso da biomassa no próprio cultivo no impacto do custo total do processo, apenas uma estimativa de Thiru (2011) de redução do custo do meio de cultura em 60%.

#### 4.5 Perfis de óleo e propriedades do biodiesel

##### 4.5.1 Perfis de óleo da levedura *Y. lipolytica* QU31 em diferentes substratos

O perfil do óleo produzido por uma levedura pode variar conforme o substrato de cultivo (Ageitos *et al.*, 2011; Cheirsilp e Louhasakul, 2013). Foram analisados por cromatografia gasosa os perfis da levedura cultivada nos meios

C1, C2, C3 (sendo este último o controle da etapa 3, contendo DYC), M7 do cultivo da etapa 1 (contendo lama) e do cultivo em biorreator e da etapa 3 (contendo DYC). De forma geral, o perfil do óleo da levedura é composto majoritariamente de C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 e C18:2, cada um representando respectivamente cerca de 20,3%, 9,3%, 11,2%, 49% e 10,1% da composição de TAG (Figura 19). Este perfil está de acordo com estudos anteriores com *Y. lipolytica* (Blazeck *et al.*, 2014; Nambou *et al.*, 2014; Poli *et al.*, 2014a; Makri *et al.*, 2010).

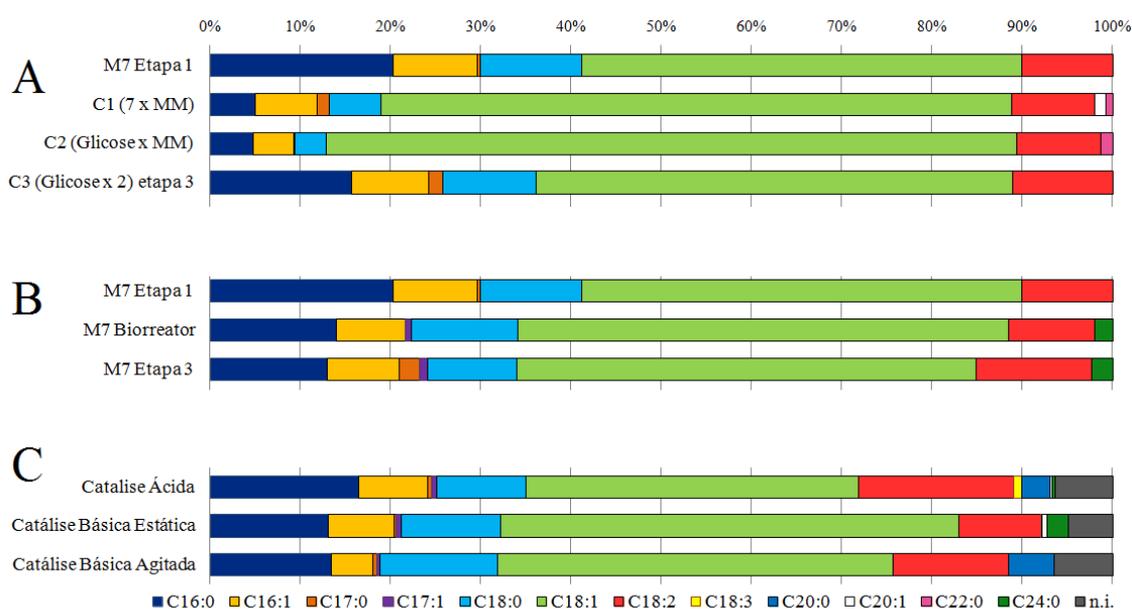


Figura 19 - Perfis de óleo produzidos pela levedura *Y. lipolytica* QU31 em diferentes substratos e etapas de cultivo, e comparação entre os métodos de catálise empregados. Dados obtidos por GC e porcentagens calculadas considerando a porcentagem relativa da área sob o picos de cada éster no cromatograma. A: Comparação entre o perfil resultante do cultivo no meio escolhido nas etapas 1 e 2 e os controles. B: Comparação dos perfis resultantes das diferentes fases de cultivo, considerando a etapa inicial de triagem de meios (M7 Etapa 1), a escala de biorreator (M7 Biorreator) e a etapa final onde o resíduo é aproveitado para o cultivo (M7 Etapa 3). C: Eficiência dos três métodos de metanólise direta e transesterificação na conversão de óleo em ésteres. N. ni.: picos não identificados.

Na figura 19A, estão sendo comparados os perfis de óleo da levedura no meio mais eficiente escolhido no estudo (M7) juntamente com os controles. Considerando os controles C1 e C2, com MM no lugar da lama de cervejaria, estes foram os únicos a apresentar C22:0, que não foi identificado nos demais. A troca de glicose (C2) por glicerina (C1) teve um pequeno efeito de redução em C18:1 e aumento em C16:1.

Ao empregar lama de cervejaria, houve uma queda de 29% na fração de ácido oleico (C18:1) e aumento de 307% no ácido palmítico (C16:0), em

relação a C1, levando ao aumento no grau de saturação do óleo. Um efeito análogo é observado quanto a C2 e C3, na troca de MM por DYC na suplementação do meio. Poli (2014a) observou um aumento na fração de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de 7,34% para 32,48% quando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  era substituído por resíduo de cervejaria. Isto é indesejável pois insaturações nas cadeias dos componentes do biodiesel o tornam mais suscetível à oxidação. No presente trabalho a fração de PUFAs não ultrapassou 9,5%.

Na figura 19B, se compara o perfil de óleo nas etapas da pesquisa. Na composição resultante do meio M7 da etapa 1, não consta o ácido graxo tetracosanóico (C24:0), em contraste à composição gerada em biorreator e na etapa 3. No entanto, este ácido graxo estava presente na amostra, como pôde ser observado no cromatograma, ele apenas não foi computado pelo software do equipamento por apresentar baixa concentração que reflete em uma pequena área sob o pico, insuficiente para realizar o cálculo da integração desta área. Isso ocorre em função da diluição da amostra aplicada. De forma geral, os três perfis possuem alto grau de similaridade, havendo apenas uma diminuição no teor de ácido palmitoleico (C16:1) a partir da etapa 1 e a produção de uma pequena fração de 17:0 na etapa 3. Estes resultados demonstram o comportamento estável da levedura ao longo dos testes, bem como que o uso de resíduos da própria levedura não acarreta em alterações drásticas no perfil, mantendo sua aplicabilidade na síntese de biodiesel.

#### 4.5.2 Propriedades do biodiesel produzido

A fim de comparar o perfil do óleo da levedura *Y. lipolytica* QU31 com outras matérias-primas, foram pesquisadas as composições típicas de óleo destas fontes para traçar o perfil e, a partir dele, calcular algumas propriedades do biodiesel (Tabela 9).

Tabela 9 - Perfil do óleo produzido por diferentes fontes oleaginosas. Representada pela fração, em porcentagem, de cada éster em relação ao conteúdo total.

Fonte/Éster	14:0	16:0	16:1	16:2	16:3	16:4	17:0	18:0	18:1	18:2	18:3	18:4	20:0	22:0	22:1	24:0	Referência
<b>Soja</b> ( <i>Glycine max</i> )	-	11.75	-	-	-	-	-	3.15	23.26	55.53	6.31	-	-	-	-	-	Ma e Hanna, 1999
<b>Sebo bovino</b>	9.2	30.1	-	-	-	-	-	17.1	38.3	4.2	0.6	-	0.4	-	-	-	Mata <i>et al.</i> , 2010
<b>Microalga</b> ( <i>Chlorella protothecoides</i> )	-	26.6	2.2	7.7	6.6	1.1	-	3.7	17.9	20.8	12.2	1.1	-	-	-	-	Liu <i>et al.</i> , 2011
<b>Fungo filamentososo</b> ( <i>Mortierella isabellina</i> )	0.9	23.2	3.3	-	-	-	-	12.1	52.1	7.1	-	-	0.8	0.2	-	0.2	Hussain <i>et al.</i> , 2014
<b>Levedura</b> ( <i>Rhodospordium toruloides</i> )	0.7	24.3	1.1	-	-	-	0.6	7.7	54.6	2.1	<0.1	-	-	-	-	-	Liu e Zhao, 2007
<b>Y. lipolytica QU31</b>	-	13.12	7.27	-	-	-	0.19	10.98	50.72	9.1	0.18	-	-	-	-	2.37	Presente trabalho

Conforme os valores da tabela 10, o biodiesel produzido a partir de óleo de levedura, tanto de *Y. lipolytica* quanto de *R. toruloides*, apresentou a menor densidade entre as matérias-primas analisadas, sendo inferior aos limites estipulados pelas normas europeia (EM 14214) e brasileira (RANP 07/2008). Este parâmetro tem relação com a estrutura das moléculas, aumentando quanto maior a cadeia carbônica e diminuindo quanto maior o número de insaturações. Um fator que contribui para este resultado é a presença de ésteres com 16 carbonos na composição dos óleos de levedura.

A viscosidade do biodiesel aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de saturação, da mesma forma como a densidade. Os valores de viscosidade estão todos dentro dos limites de qualidade.

O índice de iodo reflete a estabilidade oxidativa do biodiesel. Quanto maior o número de insaturações, maior o valor de iodo e a susceptibilidade à oxidação. Por isso, os valores estipulados em normas estimam um valor máximo de 120. O biodiesel de soja e de microalga possuem valores de iodo superiores ao permitido (132 e 122, respectivamente), isso ocorre pois o óleo de soja tem o ácido linoleico (C18:2) como o mais abundante da sua composição e o óleo de microalga é rico em ácidos graxos poliinsaturados. O óleo da levedura *Y. lipolytica* QU31, por sua vez, possui ótima estabilidade.

O poder calorífico (HHV, *High Heating Value*) é um dos parâmetros mais importantes na caracterização do biodiesel e é uma estimativa do conteúdo energético de um combustível. A norma europeia não estipula valores para HHV, mas todos os valores encontrados estão de acordo com a norma brasileira e com dados da literatura (Sivaramakrishnan e Ravikumar, 2011).

O número de cetano é indicativo do tempo de atraso na ignição de combustíveis para motores do ciclo diesel, logo, reflete a qualidade da ignição do combustível. Quanto maior o número de cetano mais curto será o tempo de ignição (Tong *et al.*, 2010), e este valor aumenta com o comprimento da cadeia carbônica saturada. Não estão disponíveis na literatura dados do número de cetano de ésteres insaturados como C16:2, C16:3, C16:4 e C18:4 (Borowitzka e Moheimani, 2013). Isto significa que o cálculo deste parâmetro para óleo de microalga, rico nestes componentes, tem um erro embutido por não considerar tais ésteres.

Tabela 9 - Propriedades estimadas do biodiesel de diferentes fontes oleaginosas. Calculados conforme o item 3.7 a partir dos dados da tabela 9.

	Densidade a 15°C (kg/m <sup>3</sup> )	Viscosidade cinemática a 40°C (mm <sup>2</sup> /s)	Índice de Iodo (g I <sub>2</sub> /100g)	Poder Calorífico – HHV (MJ/m <sup>3</sup> )	Número de Cetano
<b>Europa (EN14214)</b>	860 - 900	3.5 - 5.0	< 120	-	>51
<b>Brasil (RANP 07/2008)</b>	850-900	3.0 – 6.0	< 120	34 – 43	>47
<b>Soja (<i>G. max</i>)</b>	885	3.95	132	41.27	43
<b>Sebo bovino</b>	870	4.46	41	41.51	62
<b>Microalga (<i>C. protothecoides</i>)</b>	874	3.37	122	41.01	40
<b>Fungo filamentososo (<i>M. isabellina</i>)</b>	869	4.47	60	41.51	59
<b>Levedura (<i>R. toruloides</i>)</b>	795	4.07	51	41.33	59
<b><i>Y. lipolytica</i> QU31</b>	811	4.06	67	41.32	56

De forma geral, o óleo de *Y. lipolytica* QU31 está dentro dos parâmetros de qualidade e é apropriado para a síntese de biodiesel. A correção do valor de densidade, o único abaixo do limite das normas, pode ser feito através da mistura deste biodiesel com outro, como o de soja. Sendo assim, a mistura resultante faria com que os problemas de elevado índice de iodo e baixo número de cetano do biodiesel de soja também fossem mitigados, pois estes valores são ótimos no óleo de *Y. lipolytica* QU31.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados alcançados neste trabalho utilizando resíduos industriais são promissores mas ainda são inferiores a outros estudos utilizando meio sintético. Li (2007) conduziu um experimento com a levedura *R. toruloides* Y4 em um meio composto por glicose, peptona e extrato de levedura, atingindo 106,5 g/L de biomassa, 67,5% de rendimento de lipídios e 0,54 g/L.h de produtividade de lipídios após 134 horas de cultivo em fermentador de 15 litros. Este é um resultado excelente, no entanto, a utilização de meios ricos e

contendo substratos comerciais como estes é inviável do ponto de vista econômico da produção de matéria-prima para biodiesel. Sendo assim, tais formas de cultivo não seriam adequadas para este fim, visto que o biodiesel microbiano precisa ser capaz de competir em preços de mercado com o biodiesel produzido a partir de fontes tradicionais, e ambos não podem ser muito custosos em comparação ao diesel fóssil.

A utilização destes resíduos diretamente da forma como são produzidos pela indústria, sem nenhum tipo de pré-tratamento, é um fator que facilita a implementação do processo em escala industrial. Além de ser menos oneroso, torna desnecessária uma estrutura especializada para este processo (como seria o caso da produção de etanol lignocelulósico, onde é essencial o pré-tratamento do material) e economiza tempo, pois o resíduo recebido pode ser encaminhado diretamente para a fermentação. E se tratando de um meio composto de resíduo de cervejaria, com baixo pH, e glicerina residual, de alto pH, pode ser feita a mistura desses resíduos, de forma que seja atingido um pH intermediário e a adição de ácido ou base para atingir o valor ótimo seja mínima.

É importante apontar que os resíduos de cervejaria apresentam composição variada, devido aos inúmeros tipos de fermentos cervejeiros e também à composição do mosto cervejeiro fermentado. A composição ideal do meio, aqui encontrada, pode ser extrapolada para lamas provenientes de outras fermentações, realizando-se apenas alguns testes para verificar se o comportamento do cultivo sofre um desvio demasiado em relação ao desejado.

Considerando a possibilidade da construção de uma indústria de biodiesel microbiano a partir da estratégia aqui estabelecida, a região metropolitana de Porto Alegre se apresenta como um local favorável para a instalação dessa indústria, pois existe a produção em grandes quantidades dos substratos de cultivo. No município de Canoas está situada a indústria Bianchini S.A., com capacidade de produção de 900 m<sup>3</sup> de biodiesel/dia, o que equivale a 90 m<sup>3</sup> do subproduto glicerina podendo ser gerado diariamente (ANP, 2015). Além desta, o Rio Grande do Sul conta com outras 8 grandes empresas de biodiesel. A lama cervejeira pode ser obtida em abundância nesta região também pois o município de Porto Alegre conta com um polo cervejeiro

composto por 9 microcervejarias, além de um setor de fermentação da empresa Ambev no município de Viamão.

Um biocombustível, para ser utilizado como substituto ou lado a lado a um combustível fóssil, não deve apenas apresentar vantagens quanto a ele no aspecto ambiental. Também deve ser economicamente competitivo, alcançar uma produção que seja condizente com a demanda de energia e, acima de tudo, proporcionar um ganho energético no processo acima da quantidade de energia gasta para produzi-lo (Hill *et al.*, 2006). É um grande desafio. Sendo assim, a estratégia de produção estabelecida neste trabalho contribuiu para que um passo seja dado em direção a este cenário.

## REFERÊNCIAS

ABREU, Frederique R. *et al.* Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols. **Journal of molecular catalysis A: Chemical**, v. 209, n. 1, p. 29-33, 2004.

ATHENSTAEDT, K. Neutral Lipids in Yeast: Synthesis, Storage and Degradation. In: **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 471-480.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução nº 37, de 22 de dezembro de 2005. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes\\_anp/2005/dezembro/ranp%2037%20-%202005.xml](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2005/dezembro/ranp%2037%20-%202005.xml)>. Acesso em maio de 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução nº 7, de 19 de março de 2008. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes\\_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml)>. Acesso em maio de 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Boletim mensal do Biodiesel, abril de 2015. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?dw=75424>. Acesso em maio de 2015.

AGEITOS, Jose Manuel *et al.* Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1219-1227, 2011.

AGROANALYSIS – A revista de agronegócio da Fundação Getúlio Vargas. v. 35, n. 2. Fev 2015.

BAILEY, Richard B. *et al.* Production of carotenoids in oleaginous yeast and fungi. U.S. Patent Application 12/937,204, 10 abr. 2009.

BELLOU, Stamatia *et al.* Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. **Microbiology**, v. 160, n. Pt 4, p. 807-817, 2014.

BEOPOULOS, Athanasios *et al.* Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7779-7789, 2008.

BEOPOULOS, Athanasios *et al.* *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in lipid research**, v. 48, n. 6, p. 375-387, 2009.

BABEL W, Pöhland H-D, Soyez K. Single cell proteins. In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Wiley Online Library, 1–21, 2000.

BLAZECK, John *et al.* Harnessing *Yarrowia lipolytica* lipogenesis to create a platform for lipid and biofuel production. **Nature communications**, v. 5, 2014.

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

BORDES, Florence *et al.* Isolation of a thermostable variant of Lip2 lipase from *Yarrowia lipolytica* by directed evolution and deeper insight into the denaturation mechanisms involved. **Journal of biotechnology**, v. 156, n. 2, p. 117-124, 2011.

BOULTON, CHRISTOPHER A.; RATLEDGE, COLIN. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: citrate lyase. **Journal of General Microbiology**, v. 127, n. 1, p. 169-176, 1981.

BOURNAY, L. *et al.* 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, n. 1, p. 190-192, 2005.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BOROWITZKA, Michael A.; MOHEIMANI, Navid R. Algae for biofuels and energy. *Developments in Applied Phycology*. v.5, 2013.

CESCUT, Julien *et al.* Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 164, 2014.

CHATTOPADHYAY, S. *et al.* Rapid and precise estimation of biodiesel by high performance thin layer chromatography. *Appl Energy* v. 88, 5188–5192, 2011.

CHEIRSILP, Benjamas; LOUHASAKUL, Yasmi. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. **Bioresource technology**, v. 142, p. 329-337, 2013.

CHI, Zhanyou *et al.* Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 442-453, 2011.

DAMUDE, Howard G. *et al.* Identification of bifunctional  $\Delta^{12}/\omega^3$  fatty acid desaturases for improving the ratio of  $\omega^3$  to  $\omega^6$  fatty acids in microbes and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 25, p. 9446-9451, 2006.

DEMIRBAS, Ayhan. Relationships derived from physical properties of vegetable oil and biodiesel fuels. **Fuel**, v. 87, n. 8, p. 1743-1748, 2008.

DEMIRBAS, Ayhan. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy conversion and management**, v. 50, n. 1, p. 14-34, 2009.

DUTRA, R. C. D. *et al.*, A evolução dos preços do diesel e do biodiesel no Brasil: consequências econômicas da alteração da mistura obrigatória. In: Rio Oil & Gas Expo and Conference, Rio de Janeiro, 2014.

EN 14103 – Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. **European Committee for Standardization**, 2011.

EN 14214 – Biodiesel standards. **European Committee for Standardization**, 2008.

FEI, Qiang *et al.* High-cell-density cultivation of an engineered *Rhodococcus opacus* strain for lipid production via co-fermentation of glucose and xylose. **Process Biochemistry**, 2015.

FICKERS, Patrick *et al.* Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 6-7, p. 527-543, 2005.

FONTANILLE, Pierre *et al.* Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource technology**, v. 114, p. 443-449, 2012.

FRIED, John H. Method of producing citric acid by fermentation. U.S. Patent n. 3,632,476, 4 jan. 1972.

GOMES, Nelma; TEIXEIRA, José A.; BELO, Isabel. Fed-batch versus batch cultures of *Yarrowia lipolytica* for  $\gamma$ -decalactone production from methyl ricinoleate. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 4, p. 649-654, 2012.

GREENSPAN, Phillip; MAYER, Eugene P.; FOWLER, Stanley D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **The Journal of cell biology**, v. 100, n. 3, p. 965-973, 1985.

GROENEWALD, Marizeth *et al.* *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 3, p. 187-206, 2013.

GUIEYSSE, David *et al.* New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, n. 22, p. 3539-3543, 2004.

HILL, Jason *et al.* Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11206-11210, 2006.

HELWANI, Z. *et al.* Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: a review. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 12, p. 1502-1514, 2009.

HUSSAIN, Javid *et al.* Lipid profiling and corresponding biodiesel quality of *Mortierella isabellina* using different drying and extraction methods. **Bioresource technology**, v. 169, p. 768-772, 2014.

KENNEDY, E.P. Biosynthesis of complex lipids. **Fed Proc**, v. 20, p. 934-40, 1961.

KHOT, Mahesh *et al.* Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2012.

KIRAN, Esra Uçkun; TRZCINSKI, Antoine; WEBB, Colin. Microbial oil produced from biodiesel by-products could enhance overall production. **Bioresource technology**, v. 129, p. 650-654, 2013.

KITCHA, Suleeporn; CHEIRSILP, Benjamas. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. **Energy Procedia**, v. 9, p. 274-282, 2011.

KNOTHE, Gerhard. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel processing technology**, v. 86, n. 10, p. 1059-1070, 2005.

KNOTHE, Gerhard; STEIDLEY, Kevin R. Kinematic viscosity of fatty acid methyl esters: prediction, calculated viscosity contribution of esters with unavailable data, and carbon-oxygen equivalents. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3217-3224, 2011.

KOUTINAS, Apostolis A. *et al.* Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. **Fuel**, v. 116, p. 566-577, 2014.

KURAT, Christoph F. *et al.* Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 491-500, 2006.

LANDELL, M. F. *et al.* Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**. 34, 49-55, 2006.

LAPUERTA, Magín; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, José; ARMAS, Octavio. Correlation for the estimation of the density of fatty acid esters fuels and its implications. A proposed biodiesel cetane index. **Chemistry and physics of lipids**, v. 163, n. 7, p. 720-727, 2010.

LEE, Sang Yup; KIM, Hye Mi; CHEON, Seungwoo. Metabolic engineering for the production of hydrocarbon fuels. **Current opinion in biotechnology**, v. 33, p. 15-22, 2015.

LEIVA-CANDIA, D. E. *et al.* The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v. 123, p. 33-42, 2014.

LI, Yonghong; ZHAO, Zongbao Kent; BAI, Fengwu. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 312-317, 2007.

LIANG, Yanna *et al.* Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 19, p. 7581-7586, 2010.

LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter & SCHMIDELL, Willibaldo. "Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica". Edgard Blücher, São Paulo, v. II, 2001

LIU, Bo; ZHAO, Zongbao Kent. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 8, p. 775-780, 2007.

LIU, Jin *et al.* Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 106-110, 2011.

LIU, Leqian; ALPER, Hal S. Draft genome sequence of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* PO1f, a commonly used metabolic engineering host. **Genome announcements**, v. 2, n. 4, p. e00652-14, 2014.

LÔBO, Ivon Pinheiro; FERREIRA, Sérgio Luis Costa; CRUZ, Rosenira Serpa. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

MA, Fangrui; HANNA, Milford A. Biodiesel production: a review. **Bioresource technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.

MA, Chao *et al.* A Review on Biodiesel Production: Breeding Technologies of Microalgae Containing Rich Lipid. **Applied Mechanics and Materials**, v. 472, p. 759-763, 2014.

MAKRI, Anna; FAKAS, Stylianos; AGGELIS, George. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2351-2358, 2010.

MATA, T. M. *et al.* Sustainable production of biodiesel from tallow, lard and poultry fat and its quality evaluation. **Chemical engineering transactions**, v. 19, p. 13-18, 2010.

MCGENITY, T.; VAN DER MEER, J. R.; DE LORENZO, V. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin/Heidelberg: Springer, 2010.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. Vidya; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.

MENG, Xin *et al.* Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MILLER, Joshua. Nationwide diesel sulfur limits. **International Council on Clean Transportation**, 2014. Disponível em [http://transportpolicy.net/index.php?title=Global\\_Comparison:\\_Fuels](http://transportpolicy.net/index.php?title=Global_Comparison:_Fuels)>. Acesso em: maio de 2015.

NAMBOU, Komi *et al.* Designing of a "cheap to run" fermentation platform for an enhanced production of single cell oil from *Yarrowia lipolytica* DSM3286 as a potential feedstock for biodiesel. **Bioresource technology**, v. 173, p. 324-333, 2014.

OBOM, Kristina M.; MAGNO, Andrew; CUMMINGS, Patrick J. Operation of a Benchtop Bioreactor. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 79, 2013.

PAPANIKOLAOU, Seraphim *et al.* 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, n. 3-4, p. 215-224, 2001.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource technology**, v. 82, n. 1, p. 43-49, 2002a.

PAPANIKOLAOU, S. *et al.* *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 737-744, 2002b.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. **Current microbiology**, v. 46, n. 6, p. 0398-0402, 2003.

PAPANIKOLAOU, Seraphim *et al.* Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. **Current Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 0124-0130, 2003.

PAPANIKOLAOU, Seraphim *et al.* Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. **Current Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 134-142, 2006.

POLI, Jandora Severo *et al.* Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013.

POLI, Jandora Severo *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, 2014a.

POLI, Jandora Severo *et al.* An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. **Bioresource technology**, v. 151, p. 388-391, 2014b.

RAMÍREZ-CASTRILLÓN, Mauricio *et al.* (GTG) 5 MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated Yeasts?. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105870, 2014.

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

RUPČIĆ, Jasminka; BLAGOVIĆ, Branka; MARIĆ, Vladimir. Cell lipids of the *Candida lipolytica* yeast grown on methanol. **Journal of Chromatography A**, v. 755, n. 1, p. 75-80, 1996.

RYCKAERT, Stefan; LERONDEL, Guillaume. Methods and compositions for displaying a polypeptide on a yeast cell surface. U.S. Patent Application 13/574,126, 21 jan. 2011.

RYU, Byung-Gon *et al.* High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using organic waste from the brewery industry. **Bioresource technology**, v. 135, p. 357-364, 2013.

RYWIŃSKA, Anita *et al.* Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. **biomass and bioenergy**, v. 48, p. 148-166, 2013.

SAVALIYA, Mehulkumar L.; DHORAJIYA, Bhaveshkumar D.; DHOLAKIYA, Bharatkumar Z. Recent advancement in production of liquid biofuels from renewable resources: a review. **Research on Chemical Intermediates**, p. 1-35, 2013.

SCHRADER, J. *et al.* Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds—current industrial processes and future prospects. **Biotechnology letters**, v. 26, n. 6, p. 463-472, 2004.

SIVARAMAKRISHNAN, K.; RAVIKUMAR, P. Determination of higher heating value of biodiesels. *International Journal of Engineering Science and Technology*, v. 3, n. 11, p. 7981-7987, 2011.

SUAREZ, Paulo AZ *et al.* Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. *Química nova*, v. 30, n. 3, p. 667-676, 2007.

THIRU, Meikandhan; SANKH, Santosh; RANGASWAMY, Vidhya. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresource technology*, v. 102, n. 22, p. 10436-10440, 2011.

THLIVEROS, Panagiotis; KIRAN, Esra Uçkun; WEBB, Colin. Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. *Bioresource technology*, v. 157, p. 181-187, 2014.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering in Agriculture*, v. 22, n. 2, p. 261, 2006.

TOMASZEWSKA, Ludwika; RYWIŃSKA, Anita; GŁADKOWSKI, Witold. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 39, n. 9, p. 1333-1343, 2012.

TONG, Dongmei *et al.* Cetane number prediction of biodiesel from the composition of the fatty acid methyl esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 88, n. 3, p. 415-423, 2011.

UBRABIO - União Brasileira do Biodiesel e do Bioquerosene. Pronunciamento sobre o programa nacional de produção e uso do biodiesel (PNPB). Maio de 2014. Disponível em <<http://ubrablo.com.br/sites/1800/1891/Temporada/SaiunalImprensa/ProSPNPB.pdf>>. Acesso em maio de 2015.

VUKAŠINOVIĆ-MILIĆ, Tatjana; RAKIN, Marica; ŠILER-MARINKOVIĆ, Slavica. Utilization of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of yeast extract: effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 72, n. 5, p. 451-457, 2007.

YANG, Li-Bo *et al.* A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. *Bioresource technology*, v. 151, p. 120-127, 2014

YEN, Hong-Wei; YANG, Ya-Chun; YU, Yi-Huan. Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 114, n. 4, p. 453-456, 2012.

YKEMA, A. *et al.* Mathematical modelling of lipid production by oleaginous yeasts in continuous cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 52, n. 6, p. 491-506, 1986.

YU, Zongzhong *et al.* Enhanced  $\alpha$ -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy. *Bioresource technology*, v. 114, p. 597-602, 2012.

ZHANG, Jie *et al.* Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass and bioenergy*, v. 35, n. 5, p. 1906-1911, 2011.