
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**PROSPECÇÃO DE BIOPRODUTOS DE
INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DA
FERMENTAÇÃO DO GLICEROL POR
LEVEDURAS.**

PAULO MARCELO AVILA NETO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada.

Rio Claro
- 2009 -

PAULO MARCELO AVILA NETO

**PROSPECÇÃO DE BIOPRODUTOS DE
INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DA
FERMENTAÇÃO DO GLICEROL POR
LEVEDURAS.**

Orientador: Dr. Jonas Contiero

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista, Campus de Rio Claro, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas,
área de Microbiologia Aplicada.

547.29 Avila Neto, Paulo Marcelo
A958p Prospecção de bioprodutos de interesse industrial a partir
da fermentação do glicerol por leveduras / Paulo Marcelo
Avila Neto. - Rio Claro : [s.n.], 2010
84 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero

1. Fermentação. 2. Microbiologia industrial. 3. *Yarrowia
lipolytica*. 4. Ácido cítrico. I. Título.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

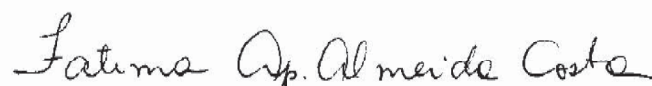
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO defendida em 23.04.2010

**“PROSPECÇÃO DE BIOPRODUTOS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR
DA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL POR LEVEDURAS”**

PAULO MARCELO AVILA NETO

COMISSÃO EXAMINADORA:


Prof. Dr. Jonas Contiero


Prof. Dr. Fátima Aparecida de Almeida Costa


Prof. Dr. Edwil Aparecida de Lucca Gattás

DEDICATÓRIA

Ao meu pai e à minha Avó Maria de Lourdes, obrigado pelo todo apoio, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Obrigado a UNESP Rio Claro, e ao Prog. de Pós Graduação em Microbiologia Aplicada pela oportunidade de realização deste trabalho. Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia e todo seu corpo docente e técnico pela ajuda quando precisei. Ao CNPq, obrigado pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Rio Claro-SP, ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, campus de Palmas-TO, e o Lab. de Engenharia de Bioprocessos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, obrigado pelas cepas cedidas para realização dos experimentos.

Agradeço a minha família pelo suporte, inclusive financeiro dado para realização do mestrado. Em especial, a minha mãe, pelo apoio, amor e dedicação. A meu pai, obrigado pelo apoio durante todo esse tempo. Aos familiares, obrigado por me receberem em São Paulo para tentar o mestrado. Amo todos vocês.

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero, orientador e amigo, um especial obrigado, pela cobrança e ajuda, por todo apoio dado durante o mestrado.

Aos Técnicos: Beto, Carmen, Lu e Fátima pelo socorro quando precisei de vocês.

Aos colegas e amigos do Lab. de Microbiologia Industrial. Sem vocês, meu mestrado não aconteceria. Obrigado pelo apoio, ajuda e conhecimento compartilhado. Sidd, Mariana, Guilherme, Luciana, Gervásio, Roberta, Cristian, Fabrício, Rodrigo, Kate, Mary, Tulio, Marcela, Vinícios, Paola, Saulo, Irina, e todos aqueles que eu convivi esses dois anos, obrigado pelo ótimo astral de trabalhar com vocês.

Aos colegas e amigos do curso de pós-graduação, César, Adriano Uemura, Alex, Adriana, Bill, Paulo, Tati, Paula, Aline, Thaís, Grazy e Heide, valeu gente pelo apoio, pelos momentos de descontração, e nossas festinhas e momentos de mesa de bar discutindo problemas com nossos experimentos, decepções, alegrias, comemorando os aniversários, bolsas, conquistas, defesas, finais de semana e confraternizações.

Aos amigos de Rio Claro, Neto, Mário, Danilo, Daniel, Junior, Márcio, Franco, Maíra e Déia, e aos companheiros das Repúblicas, Dinho, Cris, Thiago, Jean e Rafael, obrigado pelos conselhos, pelos bons momentos, e pelas alegrias compartilhadas. Aos amigos de Cuiabá-MT, Marcelo, Camila, Rodrigo Anselmo, Vitor, Katiuska, Vitor Hugo, Jackson, Alessandro, Ivan, Luciana, e a Prof^a Edna Hardoim, obrigado por me apoiarem a agüentarem a distancia sem comprometer a amizade.

RESUMO

Com a utilização crescente do biodiesel no mundo, houve uma grande disponibilidade de glicerol no mercado. No Brasil, é esperado um mercado de 200 mil toneladas de glicerol de biodiesel com a utilização de 5% de biodiesel ao diesel. Apesar disso, a clarificação e purificação deste glicerol ainda é um processo muito oneroso, sendo que a utilização do glicerol na forma bruta, além de gerar produtos de alto valor agregado, pode contribuir para diminuir o valor do biodiesel no mercado, uma vez que os custos de armazenamento ou descarte do glicerol bruto estão atrelados ao preço do biodiesel. O glicerol de biodiesel preferencialmente é utilizado para produção de 1,3 propanodiol por bactérias, porém pouco se tem estudado a respeito da sua fermentação por leveduras, que podem utilizar maiores quantidades de glicerol e maiores taxas de conversão. Foram realizadas fermentações com 30 cepas de leveduras capazes de assimilar o glicerol utilizando frascos tipo erlenmeyer e glicerol como única fonte de carbono. O caldo fermentado foi analisado em HPLC equipado com detector UV e IR na busca de etanol, propanol, butanol, lactato, propionato, citrato, succinato e acetato, 1,3 propanodiol, 1,2 propanodiol, e 2,3 butanodiol. Foi utilizado o método de planejamento experimental para otimização do crescimento em frascos e três fermentações em reator para avaliação do meio otimizado. Também foram realizados dois planejamentos experimentais para otimização do meio de produção em frascos e seis fermentações em reator variando a aeração e a agitação. Foi verificado que *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 foi a cepa maior promissora na utilização de glicerol para produção de citrato. O meio de crescimento foi otimizado em glicerol 50 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹, sulfato de amônia 1 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 7 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 2,5 g.L⁻¹, FeCl₃ 0,65 mg.L⁻¹, ZnSO₄ 1,2 mg.L⁻¹, CuSO₄.5H₂O 0,31 mg.L⁻¹ e MnSO₄ 0,27 mg.L⁻¹, atingindo 6,32 g.L⁻¹ de massa seca em frascos e 23 g.L⁻¹ em fermentação em reator. Verificou-se que o glicerol foi o único fator a ter significância na produção de citrato e isocitrato utilizando um planejamento experimental variando glicerol e MgSO₄. Além disso, observou-se que o oxigênio dissolvido foi fator importantíssimo, e utilizando fermentação em reator, com aeração de 1,0 vvm e 800rpm, obteve-se 59 g.L⁻¹ de ácido cítrico.

ABSTRACT

With the increasing use of biodiesel in the world, there is great availability of glycerol in the market. In Brazil, it is expected a availability of 200 thousand tons of biodiesel glycerol with the mixture of 5% biodiesel into mineral biodiesel. Nevertheless, the purification and clarification of glycerol is a very costly process, and the use of raw glycerol to generate products with high added value, may reduce the price of biodiesel in the market, since raw glycerol storing and disposing costs are put on the biodiesel price. Raw glycerol is preferably used to produce 1,3 propanediol by bacteria, but little has been studied about its fermentation by yeasts, which can use larger amounts of glycerol and have higher conversion rates. Fermentations were performed with 30 yeast strains able to use glycerol as the sole carbon source using Erlenmeyer flask. The fermented broth was analyzed on HPLC equipped with UV and RI detector searching ethanol, propanol, butanol, lactate, propionate, citrate, succinate and acetate, 1,3 propanediol, 1,2 propanediol, and 2,3 butanediol. The method of experimental design was used for growth optimization and three fermentation were performed in fermentor vase to evaluate the optimized medium. Two experimental designs were made for the evaluate the production medium and six fermentation in fermentor vase varying aeration and agitation. It was found that *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 strain was the most promising in the use of glycerol to produce citrate. The growth medium was optimized in glycerol 50.0 g.L⁻¹, yeast extract 5.0 g.L⁻¹, ammonium sulfate 1.0 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 7.0 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ 2.5 g.L⁻¹, FeCl₃ 0.65 mg.L⁻¹, ZnSO₄ 1.2 mg.L⁻¹, CuSO₄.5H₂O 0.31 mg.L⁻¹ and MnSO₄ 0.27 mg.L⁻¹, reaching 6.32 g.L⁻¹ of dry weight in bottles and 23g.L⁻¹ in fermentation reactor. It was found that glycerol was the only significant factor in the production of citrate and isocitrate using an experimental design varying glycerol and MgSO₄. Also was observed that the dissolved oxygen was a important factor, and using fermentation reactor with 1.0 vvm of aeration and 800 rpm, was obtained 59 g L⁻¹ citric acid.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1 Biodiesel	9
2.2 Glicerol	12
2.3 Fermentação do glicerol para obtenção de produtos de alto valor agregado.....	14
2.4 Produção de ácido cítrico por leveduras.....	17
2.5 Ácido Cítrico	21
2.6 Espécies estudadas e seus metabólitos	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Cepas estudadas para prospecção	26
4.2 Prospecção de metabólitos a partir da fermentação do Glicerol	26
4.2.1 Detecção de metabólitos produzidos	28
4.3 Obtenção da curva de Absorbância e Massa Seca.....	29
4.4 Otimização utilizando Planejamento Experimental	29
4.4.1 Otimização do crescimento celular.....	30
4.4.2 Otimização da produção de citrato	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Prospecção.....	33
5.2 Otimização do crescimento celular.....	41
5.3 Otimização da Produção de Citrato	53
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO 1	74
ANEXO 2	75
ANEXO 3	76
ANEXO 4	77
ANEXO 5	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota de assimilação de glicerol por <i>Clostridium butiricum</i> . I Glicerol desidratase, II ativador da enzima glicerol desidratase, III 1,3 propanodiol, IV glicerol desidrogenase, V dihidroxiacetona kinase, Fd Ferredoxina. (De YAZDANI; GONZALES 2007).....	16
Figura 2 - Produção de ácido cítrico mundial. Adaptado de Berovic e Legisa (2007)	22
Figura 3 – Metabólitos produzidos e o glicerol restante utilizando 30,0 g.L ⁻¹ de glicerol, 0,5 g.L ⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g.L ⁻¹ de sulfato de amônia, 0,2 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄ , e 0,15 g.L ⁻¹ de FeCl ₃ após 96 h.	34
Figura 4 – Quarto ensaio: Produção de metabólitos por cepas de <i>Y. lipolytica</i> utilizando meio mineral proposto por Papanikolaou <i>et al.</i> (2002), modificado: 20g.L ⁻¹ de glicerol e adição de 5 mg.L ⁻¹ de tiamina.....	36
Figura 5 – Fermentação utilizando 6 g.L ⁻¹ de CaCO ₃ e 5 mg.L ⁻¹ de vitamina B1.	37
Figura 6 – Fermentação utilizando 6,0 g.L ⁻¹ de CaCO ₃ e 0,25 mg.L ⁻¹ de vitamina B1.....	37
Figura 7 – Fermentação utilizando 0,15 g.L ⁻¹ de CaCO ₃ e 5m g.L ⁻¹ de vitamina B1.	38
Figura 8 – Fermentação utilizando 0,15 g.L ⁻¹ de CaCO ₃ e 0,25 mg.L ⁻¹ de vitamina B1.	38
Figura 9 – Fermentação realizada com frascos aletados, com 100g.L de glicerol e 2,0 g.L ⁻¹ de uréia, 28°C e 200 rpm, após 96 h de cultivo.....	39
Figura 10 – Fermentação com frascos aletados, com 75 g.L de glicerol e 2,0 g.L ⁻¹ de sulfato de amônia, 28°C e 200 rpm , após 96 h de cultivo.	40
Figura 11 – Fermentação com frascos aletados, realizado em duas etapas: trofofase com 75 g.L ⁻¹ de glicerol e 2,0 g.L ⁻¹ de sulfato de amônia; e idiofase com 100 g.L ⁻¹ de glicerol após 144 h.	40
Figura 12 - Valores de massa seca (g.L ⁻¹) obtidos do planejamento experimental 01 com equações ajustadas. A- Glicerol x NH ₄ Cl; B- Glicerol x Extrato de levedura; C- NH ₄ Cl x Ex. levedura; D- Valores Experimentais x Valores previstos.....	42
Figura 13 – Resultados de massa seca obtidos do segundo planejamento experimental com equações ajustadas. A- Superfície de resposta de Glicerol x Extrato de levedura; B- Curvas de Contorno Glicerol x Extrato de levedura C- Valores Experimentais x Valores previstos para massa seca.	44
Figura 14 – Superfícies de resposta de nutrientes residuais (g.L ⁻¹) em frascos. A – Extrato de levedura residual; B – Glicerol residual	45
Figura 15 – Planejamento experimental usando glicerol, extrato de levedura e sulfato de amônia para produção de biomassa. A – Glicerol e Ext. Levedura; B – Glicerol e Sulfato de	

Amônia; C – Extrato de Levedura e Sulfato de Amônia; D – Valores Experimentais X Valores Preditos. 47

Figura 16 – Superfícies de resposta e Valores Experimentais X Valores Preditos da produção de citrato em frascos utilizando Glicerol e MgSO_4 nos tempos de 48 e 96 horas. 54

Figura 17 – Cinética de produção de ácido cítrico no planejamento experimental utilizando Glicerol e MgSO_4 55

Figura 18 – Superfície de resposta (A) e Valores Experimentais X Valores Preditos (B) da produção de ácido isocítrico no planejamento experimental com Glicerol e MgSO_4 no tempo de 144 horas. 56

Figura 19 – Cinética de produção de ácido isocítrico no planejamento experimental utilizando Glicerol e MgSO_4 57

Figura 20 – Cinética de produção de citrato (A e B) e isocitrato (C e D) do planejamento experimental com as variáveis glicerol, KH_2PO_4 , MgSO_4 e Tiamina. 58

Figura 21 – Cinética de fermentação realizada em reator com diferentes níveis de aeração e agitação, utilizando 28°C , pH mantido em 5,5, fase de crescimento de 72 h usando meio de crescimento otimizado; e fase de produção adicionando meio de produção concentrado (glicerol 100 g.L^{-1} , CaCl_2 $0,15\text{ g.L}^{-1}$, MgSO_4 $0,4\text{ g.L}^{-1}$, e KH_2PO_4 $0,1\text{ g.L}^{-1}$). 61

Figura 22 – Fermentação no tempo 144 horas conforme os seis experimentos realizados (1 – $1,0\text{ vvm} \times 500\text{ rpm}$; 2 - $1,5\text{ vvm} \times 500\text{ rpm}$; 3 - $3,0\text{ vvm} \times 500\text{ rpm}$; 4 - $1,0\text{ vvm} \times 800\text{ rpm}$; 5 - $1,5\text{ vvm} \times 800\text{ rpm}$; 6 - $2,0\text{ vvm} \times 800\text{ rpm}$), utilizando 28°C , pH mantido em 5,5, fase de crescimento de 72 h usando meio de crescimento otimizado; e fase de produção adicionando meio de produção concentrado. 62

Figura 23 – Fermentação no tempo 168 horas conforme os seis experimentos realizados (1 – $1,0\text{ vvm} \times 500\text{ rpm}$; 2 - $1,5\text{ vvm} \times 500\text{ rpm}$; 3 - $3,0\text{ vvm} \times 500\text{ rpm}$; 4 - $1,0\text{ vvm} \times 800\text{ rpm}$; 5 - $1,5\text{ vvm} \times 800\text{ rpm}$; 6 - $2,0\text{ vvm} \times 800\text{ rpm}$) utilizando 28°C , pH mantido em 5,5, fase de crescimento de 72 h usando meio de crescimento otimizado; e fase de produção adicionando meio de produção concentrado. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das leveduras estudadas nos primeiro e segundo ensaios.....	27
Tabela 2 – Composição do meio mineral modificado (g.L ⁻¹).....	28
Tabela 3 – Metabólitos (g.L ⁻¹) identificados no primeiro ensaio usando 20 g.L de glicerol, 0,5 g.L ⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g.L ⁻¹ de sulfato de amônia, 0,2 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄ , e 0,15 g.L ⁻¹ de FeCl ₃ após 96h de cultivo.	33
Tabela 4 – Terceiro ensaio: Fermentação com as cepas de <i>Y. lipolytica</i> utilizando meio proposto por Papanikolaou <i>et al.</i> (2002), 20 g.L ⁻¹ de glicerol e sem adição de tiamina.	35
Tabela 5 – pH final dos ensaios com meio mineral modificado de Crolla e Kennedy (2001), com adição de diferentes concentrações CaCO ₃ (g.L ⁻¹) e Tiamina (Vit B1 mg.L ⁻¹).	36
Tabela 6 – Valores decodificados (g.L ⁻¹) utilizados no planejamento experimental variando glicerol, sulfato de amônia e extrato de levedura.	41
Tabela 7 – Valores decodificados (g.L ⁻¹) utilizados no planejamento experimental variando glicerol e extrato de levedura.....	43
Tabela 8 – Planejamento composto central realizado para crescimento celular.	46
Tabela 9 – Valores (g.L ⁻¹) utilizados por Costa (2000) em seu segundo e terceiro planejamento composto central.	48
Tabela 10 – Valores decodificados utilizados no planejamento composto central e os resultados obtidos de Massa Seca (g.L ⁻¹).	49
Tabela 11 – Valores reais das variáveis usadas no delineamento composto central do primeiro planejamento para produção.....	53
Tabela 12 – Valores reais (g.L ⁻¹) das variáveis usadas no delineamento composto central do segundo planejamento para produção.....	57
Tabela 13 – Concentração de oxigênio dissolvido nas fermentações realizadas em reator, em diferentes tempos.	64

1. INTRODUÇÃO

Em 2005, o governo brasileiro autorizou o uso comercial do biodiesel, onde este era adicionado ao diesel comum a uma proporção de 2% (B2). Em 2008, tornou-se obrigatório o seu uso, e a partir de 2010 a proporção passa a ser de 5% (B5) (FARIA *et al.*, 2007, BRASIL, 2005). Somente com o uso do B2, foi gerado um mercado de 800 milhões de litros de biodiesel por ano (ALMEIDA; PINTO, 2007), sendo que com a B5, a produção será de 2 milhões de litros por ano (BULHÕES, 2007). E com a crescente produção de biocombustíveis, é esperada uma grande disponibilidade de glicerol, pois este é um subproduto abundante da produção do biodiesel. A utilização de óleos vegetais, como o de mamona e de canola para a produção do biodiesel gera para cada 10 kg de biodiesel, 1 kg de glicerol (YAZDANI; GONZALES, 2007). Isto significou uma produção atual de 200 milhões de litros de glicerina por ano no Brasil.

A conversão desse glicerol em outras moléculas é um desafio e uma alternativa para reduzir os custos da produção do biodiesel (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002). Todavia, novas aplicações estão sendo procuradas para grandes volumes de glicerol, pois este, não pode ser utilizado para uso direto em alimentos e cosméticos sem um processo de limpeza e refino (PACHAURI; HE, 2006).

Sabe-se que o glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono em bioprocessos para fabricação de moléculas de alto valor agregado, a partir da fermentação (ALMEIDA; PINTO, 2007). Dentre as principais espécies estudadas estão os gêneros *Clostridium*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (CÁRDENAS *et al.*, 2006; CHENG *et al.*, 2004; DECKWER, 1995; GALDEANO-VILLEGAS *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2000; PACHAURI; HE, 2006; SOLAIMAN *et al.*, 2006; YAZDANI; GONZALES, 2007;).

Uma das aplicações estudadas é a utilização do glicerol residual do biodiesel para produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum* em anaerobiose. Vias alternativas para utilização do glicerol em larga escala estão também sendo estudadas em relação à sua transformação em ácido cítrico e óleo de origem unicelular (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002; RYMOWICZ *et al.*, 2006).

Pouco se sabe sobre a fermentação de glicerol por leveduras e seus metabólitos, e apesar de algumas leveduras serem capazes de fermentar glicerol a ácido cítrico, suas potencialidades foram pouco exploradas no passado (LEVINSON *et al.*, 2007). Há necessidade de se investigar as potencialidades de outras leveduras na fermentação do glicerol uma vez que esse subproduto do biodiesel trará problemas ambientais caso o mesmo não

tenha um destino, assim como agregar valor a produção desse bicomcombustível, barateando seus custos de produção. Na literatura há um número considerável de trabalhos utilizando açúcares para formação de citrato através da levedura *Yarrowia lipolytica* (anamorfo *Candida lipolytica*), mas poucos trabalhos foram publicados fazendo uso de glicerol e glicerol residual do biodiesel como fonte de carbono (RYMOWICZ *et al.*, 2006).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biodiesel

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém de combustíveis fósseis, como o petróleo, carvão e o gás natural. É quase unânime na literatura que essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento no futuro. Há uma tendência de crescimento contínuo do consumo, a uma taxa média de 3% ao ano no mundo desde 1985. Entretanto as reservas de petróleo, comercialmente exploráveis, são descobertas a taxas menores que o consumo. As reservas mundiais de petróleo em 2005 totalizavam 1,147 trilhões de barris, e o consumo anual deste combustível fóssil em torno de 80 milhões de barris. Estima-se que as reservas mundiais de petróleo se esgotarão por volta do ano de 2046, isto sem levar em consideração a taxa de crescimento no consumo (RATHMAN *et al.* 2005).

A busca por fontes alternativas tem sido objeto de estudo no mundo todo. Neste contexto, os biocombustíveis surgem como alternativa para substituir os combustíveis derivados do petróleo, e sua demanda vem crescendo rapidamente, sendo a utilização de biomassa para sua produção uma alternativa promissora (SILVA, *et al.* 2009). Além disso, com o advento dos problemas ambientais causados pela queima dos combustíveis fósseis, alternativas com menor impacto ambiental do que as vias tradicionais têm sido pesquisadas (FERRARI, 2005). Estudos já apontam que, a utilização da biomassa para fins energéticos vem tendo uma participação crescente perante matriz energética mundial, levando a estimativa de que até o ano de 2050 deverá dobrar o uso mundial de biomassa disponível (FISCHER, 2001).

O Brasil foi pioneiro no uso de uma fonte combustível limpa (em balanço de CO₂) quando implementou, em 1973, o uso de álcool combustível, sendo que em meados de 1980, a maior parte dos carros fabricados no país foi adaptada para uso de álcool. Em 2003, cerca de 80% dos carros vendidos no Brasil utilizam tecnologia flex (capazes de utilizar álcool ou

gasolina em qualquer proporção). Na última década a utilização de biocombustíveis aumentou consideravelmente, e em 2003, seu consumo anual foi de aproximadamente 30 bilhões de litros (DERMBIAS; BALAT, 2006). Atualmente, 46% da matriz energética brasileira provém de fontes renováveis, enquanto que a média mundial é de 13,6%. Certamente a utilização de biocombustíveis tende a aumentar uma vez que a disponibilidade de combustíveis fósseis é limitada (SILVA, *et al.* 2009).

Outro biocombustível promissor é o biodiesel. Assim como o álcool pode substituir a gasolina em motores com ciclo Otto (ou com faísca elétrica), o biodiesel pode substituir o diesel em motores de ignição por compressão (SILVA, *et al.* 2009), sendo que o biodiesel tem 85% do poder energético do diesel de petróleo (CÁRDENAS, 2006).

O biodiesel é um combustível não fóssil formado a partir de alquil-monoésteres derivados da transesterificação de óleos e gorduras. A adição de alcoóis de baixa massa molar, como o metanol e o etanol e um catalisador ácido ou básico (MA; HANNA, 1999) resulta na transformação dos triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos. O metanol é o mais utilizado devido ao seu baixo custo, e às suas vantagens físico-químicas (polaridade, álcool de cadeia mais curta, reage rapidamente com o triacilglicerídeo e dissolve facilmente o catalisador básico). Já a utilização do álcool etílico necessita que este seja anidro e exige o uso de óleos com baixo teor de água, pois a água no sistema resulta na saponificação dos triglicerídeos (MA; HANNA, 1999).

Vários são os benefícios e motivações de caráter ambiental no uso do biodiesel. O biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, permite que seja feito um ciclo fechado de carbono, ou seja, o CO₂ emitido de sua queima é reabsorvido pela cultura de oleaginosas, e ainda pode diminuir em 90% as emissões de fumaça, inclusive as emissões de óxido de enxofre, causador da chuva ácida e de irritações das vias respiratórias (CARVALHO, 2006). Além disso, possui características melhores que o diesel comum, como alto número de octano; teor médio de oxigênio; maior ponto de fulgor; menor emissão de partículas HC, CO e CO₂; caráter não tóxico e biodegradável, além de ser proveniente de fontes renováveis (FARIA *et al.*, 2007; FERRARI *et al.*, 2005).

O maior produtor mundial de biodiesel é a União Européia, com 82% da produção mundial em 2003 (DEMIRBAS; BALAT, 2006), sendo que utiliza amplamente este combustível renovável desde 1991. A Alemanha é a maior produtora e consumidora de biodiesel no mundo, sendo este utilizado em carros de passeio a veículos de carga e agrícolas (CARVALHO, 2006).

Os Estados Unidos também incentiva a produção de biodiesel, com o “Programa Ecodiesel”, onde é bastante cogitado o uso da B-20, mistura de 20% de biodiesel ao diesel comum. A política de produção emana da “*National Biodiesel Board*”, onde uma lei do senado propõe uma meta anual de 20 milhões de litros de biodiesel sendo produzidos. Vários estados americanos incentivam o uso dos estoques de óleo de soja excedentes na produção do biodiesel, sendo que estudos da Comissão de Segurança Ambiental americana recomendam a utilização do biodiesel em transporte escolar, e a NASA e as Forças Armadas Americanas consideram-no um combustível de excelência para ser usado em qualquer motor diesel. Uma vez que um litro de biodiesel equivale em capacidade energética veicular a 2,5 litros de álcool etílico, o programa americano de biodiesel equivale a sete vezes o máximo atingido do programa brasileiro do álcool (RATHMAN *et al.*, 2005).

No Brasil, com a crise energética de 1973, o governo brasileiro começou uma série de experimentos na produção de biodiesel, com o programa PRÓDIESEL em 1979, e o PRÓSENE, a fim de verificar a utilização de biodiesel e querosene vegetal, o que deu origem a duas patentes mundiais. Mas com a queda do preço do petróleo, o preço do combustível estabilizou, e a idéia de biocombustíveis a partir de óleos vegetais foi abandonada no Brasil, as patentes caíram em domínio público devido ao desuso, enquanto que na Europa a idéia prosperou (PARENTE, 2003).

O biodiesel somente se insere na matriz energética brasileira a partir de 2005, com a criação do marco regulatório, Lei 11.097/2005, que torna facultativo seu uso, em uma mistura de 2% ao diesel comum, a partir da sua publicação. Após 2008, o uso da mistura de 2% se torna obrigatória e a de 5%, prevista por lei para iniciar em 2013 (LIMA, 2007; RATHMAN *et al.*, 2005), foi antecipada para janeiro de 2010. Atualmente, o Brasil consome cerca de 35 milhões de toneladas por ano de óleo diesel, e com o uso da B2, isto traria uma economia ao país de U\$160 milhões em importação de petróleo. Com o uso da B5, essa economia poderia chegar a U\$400 milhões (FERREIRA, 2006). Além disso, o país contém grandes plantações de oleaginosas e, conseqüentemente, pode fazer uso dessa diversidade para produção de biodiesel a partir de plantas como palma, babaçu, soja, girassol, amendoim, mamona e dendê (GERIS *et al.* 2007; FERRARI, 2005).

O Brasil, com mais de 90 milhões de hectares de terras, que podem ser incorporados ao processo produtivo de maneira sustentável, desponta como o país com as maiores oportunidades com a agricultura de energia. Nos próximos anos, apenas na região do Cerrado, mais de 20 milhões de hectares podem ser disponibilizados para plantio de grãos, pela integração lavoura-pecuária. No nordeste, onde, além da cana de açúcar, é possível cultivar

mamona, amendoim, gergelim, babaçu, entre outras oleaginosas. Somente para mamona, existe uma área de mais de 4,5 milhões de hectares aptas ao seu cultivo. Segundo a “*National Biodiesel Board*”, o Brasil teria condições de ser o líder mundial na produção de biodiesel, podendo substituir em 60% a demanda atual de diesel mineral no mundo (FERREIRA, 2006).

Além de fontes oleaginosas cultiváveis para produção do biodiesel, está sendo investigada a produção de biodiesel de óleo de origem unicelular por algas e leveduras, dado a necessidade urgente de se investigar novas fontes de biocombustíveis produzidos a partir de biomassa que não comprometa fontes de alimentos (YAZDANI; GONZALES, 2007). Outra possibilidade é a utilização de óleo de fritura, óleo usado em restaurantes e lanchonetes, pois se estima que haja um mercado de 30 mil toneladas desse resíduo que pode ser aproveitado para fabricação do biodiesel (PARENTE, 2003).

2.2 Glicerol

O glicerol é conhecido desde 1779, quando foi descoberto por Scheele no processo de saponificação do azeite de oliva. Foi também observado por Pasteur no processo de fermentação etanólica. O glicerol, ou 1,2,3 propanotriol ($\text{OH-CH}_2\text{-CH (OH)-CH}_2\text{-OH}$), é um poliálcool, atóxico, de sabor adocicado, incolor, viscoso, higroscópico, com ponto de fusão de $17,8^\circ\text{C}$, ponto de ebulição a 290°C e solúvel em álcool e éter, e insolúvel em hidrocarbonetos. O termo glicerol aplica-se somente ao composto puro, 1,2,3propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se à purificação de compostos comerciais que contém normalmente quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol. É raramente encontrado em sua forma livre na natureza, pois está geralmente associado a ácidos graxos, como ácidos oléico e palmítico, em óleos e azeites como o de coco, dendê, soja, algodão e oliva, e também em gorduras de animais como a banha de porco e sebo (ARRUDA *et al.*, 2007).

O glicerol é utilizado amplamente nas indústrias alimentícias, farmacêutica, têxtil, química e de cosméticos. Como exemplo pode se citar o papel do glicerol na produção de resinas e poliésteres devido à sua reatividade poli funcional e também como lubrificante na indústria alimentícia e têxtil (PACHAURI; HE, 2006).

Outra característica do glicerol é seu papel como osmorregulador, importante mecanismo que ocorre nas células como reação a fatores ambientais (ARRUDA *et al.*, 2007). Este mecanismo é utilizado pela levedura *Sacharomyces cerevisiae*, em resposta a stress hiperosmótico (redução da água extracelular) (WANG *et al.* 2001).

O glicerol pode ser produzido por saponificação de óleos e gorduras, assim como a sua produção a partir de petróleo utilizando cloração em altas temperaturas. Ambas as rotas não são mais utilizadas para produção em grande escala. Outras vias de produção do glicerol envolvem a fermentação por bactérias, fungos, leveduras, algas ou protozoários utilizando diferentes substratos como açúcares, amidos ou celulose. A formação do glicerol dentro da célula é feita pela redução da dihidroxiacetona, catalizada pela NAD^+ , a glicerol-3-fosfato, e este é desfosforilado a glicerol (ARRUDA *et al.*, 2007).

Como subproduto da transesterificação para a fabricação do biodiesel, um triglicerídeo reage com o álcool na presença de uma base ou ácido forte, e produz uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol (GERIS *et al.* 2007). A fase mais densa é composta de glicerina bruta, impregnada dos excessos utilizados de álcool, de água, e de impurezas inerentes à matéria prima. A fase menos densa é constituída de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, conforme a natureza do álcool originalmente adotado. O glicerol produzido pode ser retirado por centrifugação (MA e HANNA, 1999), ou pela adição de água (HAJÉK *et al.*, 2006). Durante a transesterificação, são produzidos 10% de glicerol (m/m) em proporção ao total de biodiesel produzido (MU *et al.*, 2006; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002).

Entretanto, é economicamente inviável a utilização do glicerol residual do biodiesel obtido a partir da produção do biodiesel na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, uma vez que este exige purificação como branqueamento, desodorização e trocador de íons para remover qualquer traço de outros elementos tornando o processo oneroso (PACHAURI; HE, 2006). Alguns processos geram de forma tão impura que acaba não tendo aceitação comercial. Nesse caso, a glicerina torna-se um efluente da planta, exigindo adequado tratamento, o que demanda investimentos adicionais, com os custos de descarte atribuídos à produção do biodiesel (FERREIRA; CRISTO, 2006; YAZDANI; GONZALEZ, 2007).

O aproveitamento do glicerol residual do biodiesel no uso industrial pode tornar a produção do biodiesel competitivo no mercado de combustíveis, reduzindo o custo de produção do mesmo (ARRUDA, 2007). Mesmo assim, a inserção da cadeia produtiva do biodiesel na matriz energética brasileira deverá gerar um aumento significativo da oferta interna de glicerina (RATHMAN, *et al.*, 2005). Também, o preço do glicerol vem se tornando competitivo com o dos açúcares usados na produção de químicos via fermentação microbiana (DHARMADI *et al.*, 2006), e esta fonte de carbono está se tornando uma promissora e abundante alternativa devido a produção do biodiesel (SILVA *et al.*, 2009), sendo esperado cerca de 700 a 900 milhões de toneladas de glicerol disponíveis em 2010 (VOLLENWEIDER

et al., 2004), e estando o preço do glicerol bruto do biodiesel entre 60 a 80 euros por tonelada no mercado europeu (RYMOWICZ *et al.*, 2008). A disponibilidade de glicerol no mercado tem sido tão grande que a Dow Chemical e a Procter & Gamble Chemicals desativaram em 2006 suas plantas de produção de glicerol sintético (MCCOY, 2006).

Recentemente novas aplicações do glicerol vêm sendo descobertas, como substrato para fermentações bacterianas com a finalidade de se obter metabólitos de alto valor agregado como polímeros biodegradáveis, ramnolipídios, biosurfactantes, dentre outros (ARRUDA, 2007). Apesar de vários microrganismos serem capazes de utilizar o glicerol na presença deceptor final de elétrons (no caso o oxigênio), poucos são capazes de fermentá-lo, e para aqueles capazes de fermentar o glicerol em compostos de alto valor agregado, existem limitações para sua efetiva manipulação, como a patogenicidade, requerimento de anaerobiose restrita, a necessidade de suplementação com nutrientes complexos, falta de capacidade genética e conhecimento fisiológico do organismo em questão (YAZDANI; GONZALES, 2007).

2.3 Fermentação do glicerol para obtenção de produtos de alto valor agregado

O glicerol começa a ser metabolizado já na membrana celular, dependendo das concentrações e das condições de oxigênio, onde pode ser fosforilado para glicerol-3-fosfato, ou catabolizado pela glicerol desidrogenase. Algumas espécies de bactérias apresentam em sua membrana canais facilitadores de glicerol (GlpF) e aquagliceroporinas, que conduzem tanto água, como também glicerol (com menos afinidade para este último). Os canais facilitadores de glicerol que fazem a fosforilação do glicerol são descritas em *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Nocardia*, *Enterococcus*, *L. lactis*, e espécies de *Pseudomonas*. Entretanto, em leveduras o glicerol exige um sistema de transporte dependente de energia para ser carregado para o interior celular e metabolizado, sendo este fosforilado e reduzido a piruvato, onde é consumido pelo ciclo de Krebs (PASTERIS; SAAD, 2008). Sabe-se que o catabolismo de açúcares no sistema respiratório de leveduras é especialmente realizado por ambas as vias pentose-fosfato e Embden-Meyerhof (EMP). Contudo, o catabolismo do glicerol em leveduras é principalmente realizado pela via C₃ da EMP. Em comparação a utilização de açúcares isto é visto como uma vantagem, pois a apresenta menor rendimento que o catabolismo de glicerol, uma vez que a via pentose-fosfato leva diretamente a formação de NADPH+H⁺ (PAPANIKOLAOU, AGGELIS, 2003).

Com a grande disponibilidade de glicerol e glicerol residual de biodiesel torna-se interessante a sua utilização como fonte de carbono para fermentação. Um dos subprodutos que podem ser obtido a partir de fermentação utilizando o glicerol como fonte de carbono é o 1,3-propanodiol produzido por algumas espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae, e pelas espécies de *Clostridium butyricum*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae* (HOMANN *et al.*, 1990), ácido succínico utilizando *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (YAZDANI; GONZALES, 2007; LEE *et al.*, 2001), butanol pela fermentação por *Clostridium pasteurianum*, ácido propiônico por *Propionibacteria acidipropionici*, ácido acético, ácido láctico, 1,3-butanodiol (DECKWER, 1995), dihidroxiacetonas, hidrogênio e polidrohalcanoatos (PACHAURI; HE, 2006; SOLAIMAN *et al.*, 2006; ASHBY *et al.*, 2005).

O maior destaque está na produção de 1,3 propanodiol, (1,3PD), que é amplamente empregado para produção de polímeros do tipo politirmetilentereftalatos (PTT), conhecido por suas propriedades elásticas, empregado amplamente na fabricação de resinas e tintas aquosas. Já existem vários estudos com *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum* e *C. acetobutlicum*, que são capazes de converter o glicerol residual do biodiesel em 1,3PD. Dentre estas bactérias, se destaca a *C. butyricum* que também é capaz de produzir dihidroxiacetona, etanol, acetato e butirato. A ampla variedade de aplicações do 1,3PD permite estimar que em 2020 exista um mercado potencial de 230 mil toneladas por ano (CÁRDENAS *et al.*, 2006).

A produção do 1,3 propanodiol está ligada a um processo oxidativo do glicerol, onde ele é desidrogenado por uma (Coenzima) NAD ligada a uma glicerol desidrogenase (glyDH), tornando-se uma dihidroxiacetona (DHA), sendo fosforilada por DHA quinases dependente de ATP. Através do processo paralelo, o glicerol é desidratado pela coenzima B12-dependente de glicerol desidratase, para formar 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA). O 3-HPA então é reduzido para 1,3PD (Figura 1) pela NADH ligada ao 1,3PDO desidrogenase (YAZDANI; GONZALES, 2007).

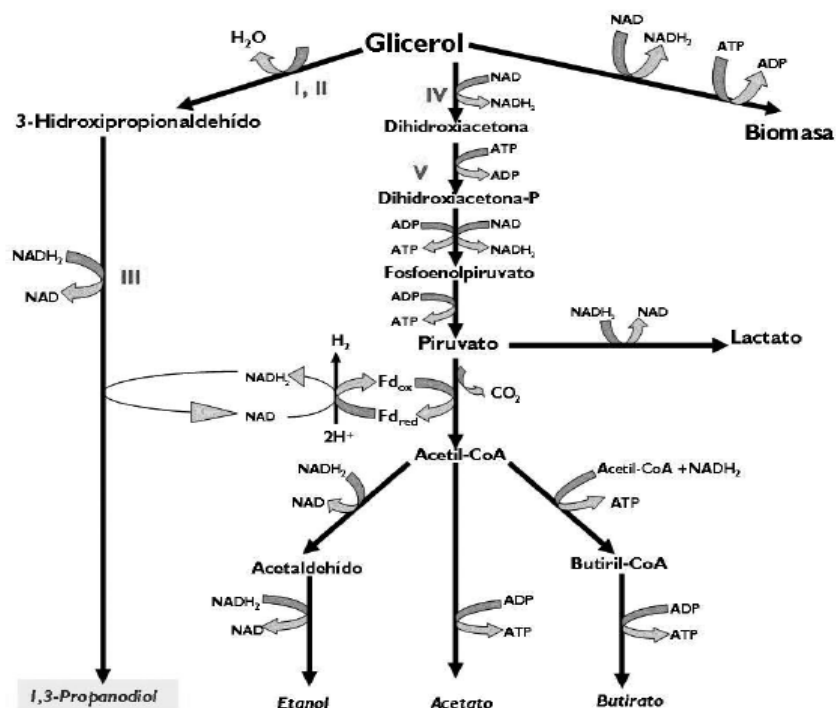


Figura 1 - Rota de assimilação de glicerol por *Clostridium butiricum*. I Glicerol desidratase, II ativador da enzima glicerol desidratase, III 1,3 propanodiol, IV glicerol desidrogenase, V dihidroxiacetona kinase, Fd Ferredoxina. (De YAZDANI; GONZALES 2007).

A dihidroxiacetona (DHA) é outra molécula obtida industrialmente através da fermentação do glicerol amplamente utilizada na indústria farmacêutica e química. A bactéria *Gluconobacter oxydans* é capaz de oxidar o glicerol com facilidade, pois a enzima glicerol desidrogenase presente em sua membrana celular, trabalha independente de NAD, sendo que em sua cadeia respiratória, a ubiquinona e o citocromo *o* permitem que o oxigênio aceite os elétrons formados pela oxidação do glicerol. No entanto, altas concentrações de glicerol inicial e o aumento na concentração de DHA no meio têm efeito inibitório na síntese da molécula. A enzima responsável pela produção do DHA é encontrada tanto na face externa ou interna da membrana celular, entretanto, pelo fato do DHA ser altamente tóxico à célula, este deve ser produzido diretamente na face externa da membrana, ou a célula possui um eficiente sistema excretor, pois não se encontra DHA em nenhum momento no citoplasma celular (CLARET, *et al.*, 1994).

A conversão do glicerol para ácido succínico por *Anaerobiospirillum succiniciproducens* também é descrita e a sua produção pode ser obtida junto com a pequena

formação de ácido acético. A máxima produção realizada através de fermentação alimentada de glicerol e extrato de levedura resultou em uma produção máxima de 49 g.L^{-1} de ácido (YAZDANI; GONZALES, 2007).

Alguns microorganismos têm a capacidade de produzir metabólitos menos tóxicos como alcoóis e glicóis para escapar da diminuição progressiva do pH do meio conforme produzem ácidos orgânicos. É o caso de *Clostridium acetobutlicum* que forma ácidos acético e butírico em pH neutro e logo após a acidificação do meio, passa a produzir acetona e butanol. O mesmo acontece com as bactérias do gênero *Klebsiella*, que são capazes de adaptar a formação de metabólitos segundo o pH do meio, como *Klebsiella pneumoniae*, que a partir da fermentação do glicerol, troca da produção de ácido acético para 2,3 butanodiol assim que o pH cai para 5,5 (BIEBL *et al.*, 1998).

Outro composto de interesse econômico são os (Poli) hidroxialcanoatos (PHA's, um poliéster microbiano) que são sintetizados e sequestrados como grânulos intracelulares, sendo considerados fontes de carbono e energia durante períodos de estresse nutricional. Ashby *et al.* (2005) descreve a utilização de glicerol para crescimento de *Pseudomonas oleovorans* e *P. corrugata*, produtoras de PHAs.

Phaffia rhodozyma pode conter mais de 80% da concentração de seus carotenóides a astaxantina, que é utilizada na fabricação de ração de salmão, crustáceos e trutas, para dar-lhes a cor atrativa aos consumidores. Kusdiyantini *et al.* (1998) em seu trabalho, descreve a produção de 28 mg.L^{-1} de astaxantina por *P. rhodozyma* a partir de 28 g.L^{-1} de glicerol inicial, e uma biomassa de $18,2 \text{ g.L}^{-1}$ após 162 h de fermentação.

2.4 Produção de ácido cítrico por leveduras

Há muitas teorias sobre a síntese de citrato tanto em leveduras como em fungos, no entanto nenhum dos mecanismos é completamente conhecido. Pode-se dizer que o ácido cítrico, acumula-se por uma anormalidade induzida no metabolismo do fungo durante o ciclo do ácido tricarboxílico, ou ciclo de Krebs, que é uma seqüência cíclica de reações bioquímicas de ocorrência quase universal na mitocôndria de organismos aeróbicos, e é catalisada por um sistema multienzimático, que aceita o grupo acetil, do acetil-Coenzima A, como combustível. Em cada viragem no ciclo, uma molécula de Acetil-Coenzima A (dois carbonos) se liga a uma molécula de ácido oxalacético (quatro carbonos) para formar o ácido cítrico, de seis átomos de carbono. Este ácido cítrico é então degradado e recuperado na forma de ácido oxalacético utilizado no próximo ciclo.

A produção fermentativa de ácido cítrico por leveduras pode ser classificada como uma fermentação do tipo II, porque a produção de ácido cítrico surge de um metabolismo de energia primária, embora seja não associada ao crescimento (RANE; SIMS, 1996). A produção de ácido cítrico por fermentação mostra claramente uma fase de crescimento da biomassa, seguido da chamada fase de produção do produto, durante o qual o ácido cítrico acumula. A transição do crescimento da biomassa para a produção de ácido ocorre no final do crescimento exponencial provocadas por condições de limitação de nitrogênio (CROLLA; KENNEDY, 2004).

Extensivos estudos têm mostrado que três fatores são fundamentais no excesso de metabólitos. Um deles é a rápida absorção de fonte de carbono por difusão simples, pois é um fenômeno meramente físico, não dependente de regulação metabólica do organismo. O segundo é o irrestrito fluxo metabólico através da glicólise, produzindo precursores para a síntese de intermediários do ciclo do TCA. E o terceiro é re-oxidação do NADH, resultando em níveis mais baixos de ATP e, portanto, diminuição das reações anabólicas. No entanto, o desregulamentado fluxo metabólico através da glicólise é um pré-requisito para a síntese rápida de ácido cítrico (BEROVIC; LEGISA, 2007).

O acúmulo de ácido cítrico é bastante influenciado pelo tipo e pela concentração da fonte de carbono. A presença de carboidratos que podem ser facilmente assimiladas e metabolizadas pelo microrganismo é determinante na produção de citrato. Diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas para a produção de ácido cítrico por leveduras, dentre elas podem ser citados n-parafinas, óleos naturais, ácidos graxos, glicerol, etanol, glicose, sacarose e lactose. Essas fontes de carbono oferecem resultados diferentes dependendo da variedade de levedura com a qual se está trabalhando. Os melaços são preferidos para produção do ácido cítrico por fungos e leveduras devido a seu baixo custo e grande quantidade de açúcares. Mas outros substratos e resíduos industriais também podem ser utilizados para produção de ácido cítrico, como óleos vegetais (coco, palma, oliva, soja), n-parafina e o glicerol, sendo que *Yarrowia lipolytica* N-5704 é capaz de fermentá-los (ARMILIATO, 2004). Recentemente glicerol bruto, subproduto do biodiesel, tem sido utilizado para biossíntese de ácido cítrico por *Y. lipolytica* (LEVINSON *et al.*, 2007; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2003; RYMOWICZ *et al.*, 2008).

Outros fatores como fontes de nitrogênio e de fósforo tem grande importância na formação do ácido cítrico. Baixos níveis de fosfato têm efeito positivo sobre a produção de ácido cítrico, atuando na atividade enzimática. Por outro lado, a presença de excesso de fosfato estimula o crescimento celular. Com relação ao nitrogênio, fisiologicamente, sais de

amônio são preferidos, como a uréia, sulfato e nitrato de amônio, assim como peptona, extrato de malte e extrato de levedura. A concentração da fonte de nitrogênio necessário para a síntese de ácido cítrico é de 0,1 a 0,4 g.L⁻¹. Altas concentrações de nitrogênio levam ao aumento de biomassa e consequente consumo de fonte de carbono, diminuindo a quantidade de ácido cítrico produzido (SOCCOL *et al.* 2006). A produção de citrato ocorre apenas na deficiência de nitrogênio do meio de cultura, e desta forma, a ausência de nitrogênio livre no meio aumenta a produção de citrato (RYMOWICZ *et al.*, 2008), sendo que somente em caso de fermentação contínua, o nitrogênio adicionado ao meio de cultivo será somente para manutenção da viabilidade celular (RANE; SIMS, 1996).

Óleos e gorduras são utilizados na produção de ácido cítrico para controlar a formação de espuma. Além disso, alguns óleos estimulam a produtividade e manutenção dos processos de fermentação, e estes podem também ser utilizados como fonte de carbono, sendo consumidos durante a fermentação, onde é necessário manter o seu nível entre 0,05-0,3% (SOCCOL *et al.* 2006).

O pH de uma cultura pode mudar em resposta as atividades metabólicas microbiana devido a secreção de ácidos orgânicos, como ácido cítrico. No cultivo de *Aspergillus niger*, por exemplo, o pH pode cair rapidamente para menos de 3,0. A natureza do substrato e técnica de produção também influenciam a cinética de pH. Desta forma, o pH inicial deve ser bem definido e otimizado, dependendo do microrganismo, substrato e técnica de produção (SOCCOL *et al.* 2006).

Várias leveduras têm a capacidade de produzir ácido cítrico. Todavia, *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir este ácido utilizando diferentes fontes de carbono. Nesta levedura, a produção de ácidos orgânicos ocorre através do ciclo do ácido tricarboxílico, ou ciclo de Krebs, onde a Acetil-CoA reage com o oxaloacetato, através da citrato-sintase para formar o ácido cítrico (CROLLA; KENNEDY, 2004). Algumas cepas dessa espécie, na limitação de fonte de nitrogênio, podem ter aumentada a produção do ácido cítrico devido à alta produção de citrato-sintase (PAPANIKOLAOU *et al.* 2002). Ou seja, interrompida a fase de crescimento celular (trofofase) com a diminuição na concentração de íons NH₄⁺ no meio, ocorre o aumento da produção de citrato-sintase, resultando em uma produção excessiva de ácido cítrico (idiofase). Os fatores limitantes do crescimento mais significativos para que isso ocorra são, em primeiro lugar, a falta de nitrogênio, e em segundo, a falta de íons fosfato (RYWIŃSKA *et al.* 2006).

Em meio de cultivo contendo tiamina, observa-se que o ácido cítrico acumulado tem sua excreção facilitada para o meio extracelular. A produção de ácido cítrico está intrinsecamente ligada a concentrações limitantes de macro nutrientes (nitrogênio e o fósforo), e concentrações ótimas de micronutrientes como o íons de ferro, tiamina, controle de pH e saturação de oxigênio dissolvido. Este último é muito importante, pois a falta de oxigênio pode levar a não produção de ácido cítrico ou produção elevada de ácido isocítrico (LEVINSON *et al.*, 2007; ARMILIATO, 2004; I'LCHENKO *et al.*, 2002; ANASTASSIADIS *et al.*, 2006). Em *Aspergillus niger*, altas concentrações de oxigênio são exigidas para formação do ácido cítrico, maiores do que as requeridas para o crescimento vegetativo, isto por que as cepas produtoras possuem via respiratória alternativa, constituída por uma oxidase resistente a cianidas, que é requerida para reoxidação de NADH produzida por via glicolítica.

Desde que a produção de ácido cítrico é um processo aeróbio, o oxigênio ofertado tem um efeito determinante sobre a sua produção. O aumento da taxa de aeração conduz a bons rendimentos e reduz o tempo de processo. Uma interrupção da aeração durante fermentação é bastante prejudicial, pois o fornecimento de oxigênio influencia diretamente na formação do ácido cítrico. A alta demanda de oxigênio é atingida através de dispositivos de aeração, e é dependente da viscosidade do caldo de fermentação (SOCCOL *et al.* 2006). Oxigênio puro pode ser misturado ao ar bombeado no reator, e comprovadamente aumenta a quantidade e produtividade, mas se mostra economicamente inviável. Além disso, devido a alta taxa de aeração, há uma grande formação de espuma, que deve ser controlada com anti-espumantes ou mecanismos de quebra de espuma. Quando o organismo se desenvolve na forma de filamentos, a tensão de oxigênio dissolvido rapidamente cai para menos de 50% do seu valor anterior, mesmo sem o aumento significativo da massa seca (SOCCOL *et al.* 2006). Isto é importante no caso de *Yarrowia lipolytica* por ser uma levedura dimórfica.

Kamzolova *et al.* (2003) descreve *Yarrowia lipolytica* como sendo uma levedura especial devido sua habilidade de secretar grande quantidade de ácido cítrico, assim como uma grande variedade de ácidos orgânicos pertencentes ao ciclo de Krebs, incluindo o ácido isocítrico. No caso específico de *Y. lipolytica*, em concentrações mais elevadas de oxigênio dissolvido no meio de fermentação há favorecimento de acúmulo de ácido cítrico. Em concentrações de oxigênio dissolvido entre 50 e 60%, observa-se uma concentração de ácido isocítrico maior que a concentração de ácido cítrico. Para níveis de oxigênio dissolvido maiores do que 70% o acúmulo de ácido cítrico é favorecido, enquanto que a produção de

ácido isocítrico não sofre grandes alterações. Porém, a adição de inibidores de aconitase, como íons de cálcio, e limitação de íons de ferro, favorece o acúmulo de ácido cítrico e menor produção de ácido isocítrico (ARMILIATO, 2004).

Em geral, as leveduras apresentam algumas vantagens em relação aos fungos, como maior tolerância a altas concentrações de substrato, maior taxa de conversão, maior produtividade, e permitem um maior controle do processo por serem de natureza unicelular (ARMILATO, 2004). O grande problema em se produzir ácido cítrico a partir de leveduras está na formação do ácido isocítrico (RYMOWICZ *et al.*, 2006), e por não se obter uma produção competitiva como a de *Aspergillus niger* (SOCCOL *et al.*, 2006). Papanikolaou e Angelis (2002) mostraram que a taxa de conversão do glicerol para citrato na fermentação por *Y. lipolytica* mostra-se maiores do que utilizando açúcares, o que não acontece para o crescimento celular, onde a taxa de crescimento utilizando açúcares é maior. Sabe-se que a respiração de leveduras utilizando açúcares ocorre por duas vias: pentose-fosfato e Embden-Meyerhof-Pathway (EMP). No caso do glicerol, a oxidação ocorre somente pela via C_3 da glicólise da EMP. Por esse motivo, a produção de citrato é mais favorecida usando glicerol, pois leva direto ao piruvato, enquanto que a via pentose-fosfato é direcionada para produção principalmente a compostos NADPH⁺.

2.5 Ácido Cítrico

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) é o principal ácido orgânico produzido hoje pela fermentação. A história de ácido cítrico começou em 1784 com W. Scheele, que primeiro isolou o citrato de cálcio do suco de limão, o qual tratado com ácido sulfúrico liberava o ácido cítrico na forma livre. Em 1893, Wehmer foi o primeiro que observou a produção de ácido cítrico como subproduto do oxalato de cálcio, fermentado por uma cultura de *Penicillium glaucum* a partir da fermentação de açúcar, o que lhe gerou uma patente. Em 1984, foi construída a primeira planta industrial para produção de ácido cítrico usando sistema de fermentação em estado sólido em bandejas abertas, mas que dez anos depois, a fábrica fechou devido a fermentação ser considerada longa demais e contaminações freqüentes ocorriam. Zahorsky, em 1913, seguindo as pesquisas para produção de ácido cítrico, patenteou uma nova cepa, *Aspergillus niger*, sendo que Currie, em 1917 abriu um novo caminho para fermentação industrial pois constatou que a cepa crescia bem em baixo pH (por volta de 2,5 a 3,0), o que impedia o crescimento de outros microrganismos. A partir de 1928, o ácido cítrico começou a ser produzido em escala industrial pela via fermentativa

usando melado de beterraba, uma fonte de carbono barato, mas, apresentava teor de metais elevado, problema este resolvido em 1938 pela adição de ferrocianeto de potássio como agente quelante (BEROVIC; LEGISA, 2007; SOCCOL *et al.*, 2006).

Em meados de 1960, começou no Japão a primeira produção de ácido cítrico a partir de levedura do gênero *Candida*, que utilizava n-alcanos como fonte de carbono resultando em quantidades consideráveis de ácido cítrico e isocítrico (TANAKA *et al.*, 1968).

Hoje, praticamente 99% da produção mundial de ácido cítrico é realizada via fermentação de vários substratos por diferentes microrganismos. Sua extração a partir de restos de frutas cítricas ainda é praticada, entretanto, torna-se insignificante quando comparada ao processo fermentativo. A produção mundial de ácido cítrico atingiu 1,4 milhões de toneladas, em 2004, e estima-se um aumento de 3,5 a 4% por ano, podendo alcançar 1,6 milhões de toneladas em 2010 (Figura 2) com um preço de mercado chegando a 1,3 dólares por quilograma (RYMOWICZ *et al.*, 2008). Com isto, espera-se que o mercado de ácido cítrico possa ultrapassar os 2 bilhões de dólares (SOCCOL *et al.*, 2006).

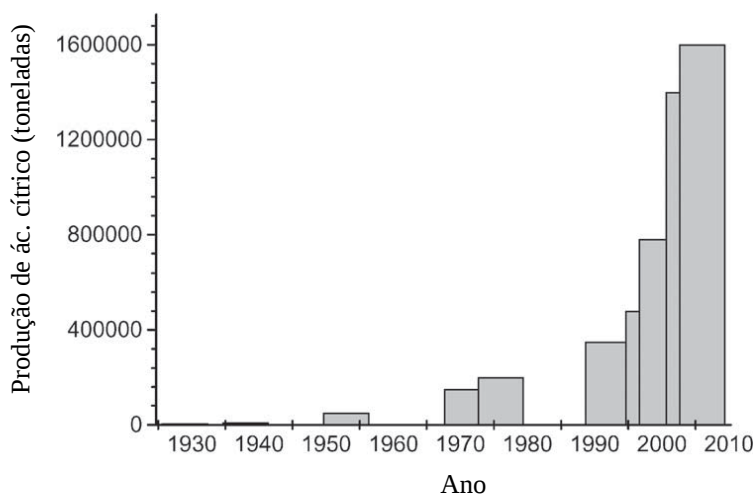


Figura 2 - Produção de ácido cítrico mundial. Adaptado de Berovic e Legisa (2007)

Cerca de 60 a 70% do ácido cítrico produzido é consumido pela indústria de alimentos, o que representa 60% do mercado total de acidulantes. O restante, 18%, é utilizado na indústria farmacêutica. Nos maiores produtores, China, Estados Unidos e a Europa, quase toda a produção é feita por via microbiológica (BEROVIC; LEGISA, 2007). A China sozinha é responsável por cerca de 40% da produção mundial. Entre as maiores produtoras pode-se citar a ADM, Cargill, Tate & Lile, DSM, Gadot Biochemical Industries (Israel) e a Anhui BBCh Biochemical (China). A intensa competição e os preços relativamente baixos do ácido

cítrico levaram pequenas produtoras a abandonarem as linhas de produção de citrato na última década. Isto por que a indústria do ácido cítrico tem passado por muita pressão e oscilação de preços nos últimos anos, com preços do quilo do citrato entre US\$2,00 a US\$0,70, onde os fornecedores chineses tem sido os mais competitivos, vendendo ao preço mais barato possível para vencer a concorrência européia (SOCCOL *et al.*, 2006).

No Brasil, o consumo anual de ácido cítrico e citrato de sódio compreendem cerca de 30 mil toneladas ano. O fato do ácido cítrico ser muito apreciado na indústria de alimentos deve-se a sua baixa toxicidade, solubilidade, palatabilidade e por ser facilmente metabolizado pelo organismo. Também é utilizado para limpeza de equipamentos na indústria, e juntamente com os seus sais, como tampão e estabilizante em vários produtos alimentícios (ARMILIATO, 2004; RYMOWICZ *et al.*, 2008; BEROVIC; LEGISA, 2007). A produção mundial de ácido cítrico ocorre principalmente através de fermentação microbiana, sendo que é o segundo metabólito em volume mais produzido, perdendo apenas para o etanol. Enquanto que a maior parte do citrato produzido por via fermentativa é realizada pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger*, várias leveduras são capazes de sintetizar o ácido tricarboxílico, a maior parte do gênero *Candida*, como *Candida tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *C. fibriae*, *C. subtropicalis* e *C. oleophila* (BEROVIC; LEGISA, 2007). *Yarrowia lipolytica* em especial é capaz de fazê-lo em grandes quantidades e produtividade (LEVINSON *et al.*, 2007).

2.6 Espécies estudadas e seus metabólitos

Dentre as leveduras que serão pesquisadas neste trabalho, *Pichia anomala* é capaz de produzir etanol, acetato, e arabitol por fermentação a partir de outras fontes de carbono (FREDLUND *et al.*, 2004). *Pichia guilliermondii* é capaz de assimilar glicerol (ALCANTARILLA, 1999) e de produzir alfa-galactosidase na presença de lactose (CHURCH JR; MEYERS, 1980). *Candida smithsonii*, *Pichia caribicca* e *Pichia anomala* são capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono pela fermentação (SUH; BLACKWELL, 2004), mas não foi encontrado referência a respeito dos metabólitos produzidos.

Yarrowia lipolytica tem sido a mais estudada na produção de ácido cítrico a partir de vários substratos oxidáveis à Acetil-CoA, como açúcares, alcanos, óleos vegetais, hidrolisados de amido, etanol e glicerol. A razão entre nitrogênio/fonte de carbono afeta

diretamente a de produção de citrato e isocitrato, onde a otimização do meio de cultura pode levar a razões de citrato/isocitrato bastante elevadas (LEVINSON *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho é avaliar os subprodutos do processo fermentativo a partir do glicerol, utilizando espécies de leveduras já isoladas e que o utilizam como fonte de carbono e energia. Como objetivos específicos foram verificados:

- 3.1. A escolha do microrganismo com maior potencial biotecnológico dentre as cepas estudadas;
- 3.2. A definição das condições ótimas de fermentação para a levedura selecionada visando crescimento celular e síntese do metabólito.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas estudadas para prospecção

Foram avaliadas várias cepas de leveduras isoladas pelo Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP, Rio Claro-SP, que foram capazes de assimilar glicerol. Algumas leveduras foram identificadas presuntivamente através de provas bioquímicas, entre estas estão os *Candida smithsonii* (MB160306-9a), *C. parapsilosis* (MY1-1 e MY1-3), *Candida sp.* (MY6-1), *Pichia anomala*, *P. caribbica* (MB160306-11A), *P. guilliermondii* (78b2, 16a2, 10a, 16a1, MY4-2 e M6270406-1a4) e *P. subpelliculosa* (MY6-2). Além dessas, foram selecionadas cepas, algumas ainda não identificadas, para realização dos ensaios (T1, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T11, T24, 459a, 575, 576, 581 e LS425). Também se avaliou cepas de *Yarrowia lipolytica* NRRL Y109, CCT7401 e CCT6770, anamorfo *Candida lipolytica*, pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Industrial, Depto. de Bioquímica e Microbiologia UNESP – Rio Claro, as cepas *Y. lipolytica* YLI e YLII do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, campus de Palmas-TO, e a cepa *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 cedida pelo Lab. de Engenharia de Bioprocessos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Os microrganismos foram preservados em tubos contendo ágar inclinado e refrigerados a 8°C, e também em meio líquido com glicerol 30% (p/v) conservados a -20°C, sendo realizado repiques para manutenção da viabilidade das culturas regularmente. As culturas depois de descongeladas foram crescidas em erlenmeyers contendo 50mL de caldo YM (extrato de malte 3 g.L⁻¹, extrato de levedura 3 g.L⁻¹, peptona 5 g.L⁻¹, dextrose 10 g.L⁻¹), e incubados a 28°C e 200 rpm por 48h. Em seguida houve repique em placas de petri contendo YM ágar, a fim de produzir biomassa para manutenção das culturas e para os ensaios de fermentação.

4.2 Prospecção de metabólitos a partir da fermentação do Glicerol

As cepas foram crescidas em 50mL de caldo YM estéril, e cultivadas a 200 rpm, 28°C por 48 h para obtenção do pré inóculo, e deste transferiu-se 10ml para os frascos com capacidade de 300 mL contendo 90 mL de meio, para avaliação dos metabólitos obtidos a

partir do glicerol. Todos os ensaios foram realizados em estufa tipo shaker com 28°C e 200rpm de agitação.

Os primeiro e segundo ensaios foram realizados com as cepas isoladas pelo Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais - UNESP Rio Claro, apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Relação das leveduras estudadas nos primeiro e segundo ensaios.

1º Ensaio	2º Ensaio
<i>Pichia caribbica</i> (MB160306-11A)	T1
<i>Candida</i> sp. (MY6-1)	T4 (<i>Pichia guilliermondii</i>)
<i>P. subpelliculosa</i> (MY6-2)	T5 (<i>Pichia guilliermondii</i>)
<i>P. guilliermondii</i> (M6270406-1a4)	T6
<i>C. parapsilosis</i> (MY1-3)	T7 (<i>Pichia caribbica</i>)
<i>C. parapsilosis</i> (MY1-1)	T8 (<i>Candida naeodendra</i>)
<i>P. guilliermondii</i> (MY4-2)	T9 (<i>Candida naeodendra</i>)
<i>C. smithsonii</i> (MB160306-9a)	T11
<i>P. guilliermondii</i> (78b2)	459a
<i>P. guilliermondii</i> (16a2)	575
<i>P. guilliermondii</i> (10a)	576
<i>P. guilliermondii</i> (16a1)	LS425

Nestes ensaios, foi utilizados para as prospecções um meio mínimo, com base no proposto por Papanikolaou (2002), cuja composição foi 0,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de amônia, 0,2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, e 0,15 g.L⁻¹ de FeCl₃. No primeiro ensaio foram utilizados 2% de glicerol (p/v) e no segundo ensaio foram utilizados 3% de glicerol (p/v), e os microrganismos cultivados durante 72 horas.

Em uma segunda etapa, foram realizados os ensaios com as cepas de *Yarrowia lipolytica* CCT7401, CCT6440, NRRL Y109, YLI e YLII. O terceiro e quarto ensaio foi utilizado o meio tamponado proposto por Papanikolaou (2002), pois de acordo com a literatura, esta espécie é capaz de produzir grande quantidade de ácido. O meio mínimo utilizado foi composto por 20 g.L⁻¹ de glicerol, 0,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de amônia, 12,0 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 7,5 g.L⁻¹ de NaHPO₄ e 0,15 g.L⁻¹ de FeCl₃. O quarto ensaio foi suplementado com tiamina 5 mg.L⁻¹.

O quinto ensaio foi realizado com base no meio mínimo proposto por Crolla e Kennedy (2004), composto por glicerol 30 g.L⁻¹, 2,0 g.L⁻¹ de uréia, KH₂PO₄ 0,75 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,4 g.L⁻¹, FeCl₃ 0,65 mg.L⁻¹, ZnSO₄ 1,2 mg.L⁻¹, CuSO₄.5H₂O 0,31 mg.L⁻¹, MnSO₄ 0,27 mg.L⁻¹, e foram testados dois níveis de CaCO₃, 0,15 e 6,0 g.L⁻¹ e dois níveis de tiamina, 0,25 e 5 mg.L⁻¹.

Verificou-se em uma terceira etapa, a influência da aeração utilizando-se frascos aletados de 500mL de capacidade com cepas de *Y. lipolytica*. O meio de mineral era composto por: KH₂PO₄ 0,2 g.L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,4 g.L⁻¹, CaCO₃ 6,0 g.L⁻¹, FeCl₃ 0,65mg.L⁻¹, ZnSO₄ 1,2 mg.L⁻¹, CuSO₄.5H₂O 0,31 mg.L⁻¹, MnSO₄ 0,27 mg.L⁻¹ e tiamina 5mg.L⁻¹. Foi utilizado um volume útil de 100 mL, 150rpm e 28°C. Três ensaios diferentes com as cepas CCT6440, NRRL Y109, YLI, YLII e NRRL Y-1095 foram realizados em réplicas, usando as condições acima em diferentes concentrações de fonte de carbono e nitrogênio, mostrado na tabela 2.

Tabela 2 – Composição do meio mineral modificado (g.L⁻¹).

Ensaio	1	2	3
Glicerol	100	75	75 + 100
Uréia	2	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	2	2
Tempo (h)	96	96	144

No ensaio de número 3 a fermentação foi realizada em duas fases: a primeira fase de crescimento celular começou com 75 g.L⁻¹ de glicerol, e após 72 h, foi adicionado glicerol até a concentração final de 100 g.L⁻¹.

4.2.1 Detecção de metabólitos produzidos

No final de cada fermentação, foram realizadas as leituras de pH e centrifugou-se alíquotas de 1mL das culturas a 12000g durante 10 minutos. O sobrenadante livre de células foi transferido para microtubos e armazenados a -20°C, para posterior análise em cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Foi utilizado cromatógrafo da marca Thermo Separation Products, com detector ultravioleta à 210nm e detector de índice de refração, coluna de troca iônica Phenomenex – Rezex Organic Acids (300 mm x 7,8 mm) a uma temperatura de 60°C, e solução de H₂SO₄ 0,005M a 0,4 mL/min como fase móvel.

Para detecção e quantificação de metabólitos foram utilizados padrões de moléculas de interesse industrial, como etanol, propanol, butanol, lactato, propionato, citrato, succinato e acetato, 1,3 propanodiol, 1,2 propanodiol, 2,3 butanodiol. Também foi quantificado o glicerol residual.

4.3 Obtenção da curva de Absorbância e Massa Seca

Realizou-se um cultivo em duplicatas utilizando 50 mL de meio YMB em frascos de 300 mL de capacidade. Após 48 horas de fermentação, uma alíquota de 10 mL foi filtrada sob vácuo com filtro poroso de 0,45µm previamente pesado e depois deixado para secar a 80°C até peso constante.

Outra alíquota de 10 mL foi centrifugada a 12.000g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 5mL de solução de NaCl a 0,9%, sendo centrifugado novamente conforme as condições citadas. Novamente o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas usando solução de NaCl a 0,9% até o volume final de 10mL. Foram realizadas sucessivas diluições da suspensão celular e leituras feitas usando espectrometria ótica a 610 nm, com leituras no intervalo de 0,2 a 0,8 de absorbância.

A Massa Seca total foi multiplicada pelo inverso das diluições realizadas, e correlacionada com os valores de absorbância obtidos. O resultados deram origem a uma curva padrão $y = 0,6067 * x - 0,012$ com um $r = 0,996$, onde y representa a massa seca e x representa a absorbância da amostra.

4.4 Otimização utilizando Planejamento Experimental

As técnicas tradicionais de otimização de sistemas multivariados não só consomem tempo, mas também não mostram possíveis alternativas de interações entre os fatores testados, além de utilizar um grande número de experimentos para determinar pontos ótimos que podem não ser significativos. O planejamento experimental surge como alternativa para melhorar processos e verificar correlações e interações sinérgicas ou antagônicas entre os fatores testados coletivamente, minimizando o número de experimentos, e sendo possível analisar os resultados usando um método de superfície de resposta (IMANDI *et al.*, 2007; RYMOWICZ; CIBIS, 2006). Foram utilizadas técnicas de planejamento fatorial completo para duas variáveis, com três níveis para cada variável, sendo as corridas realizadas em

réplicas e com quatro repetições no ponto central, e adicionalmente, delineamento composto central rotacional utilizando três variáveis.

4.4.1 Otimização do crescimento celular

Realizaram-se planejamentos experimentais e foram selecionados aqueles que mostraram resultados estatisticamente significantes ($R^2 \geq 0,9$). Para diminuir o número de experimentos fixaram-se alguns valores que já foram pré-definidos na literatura. Costa (2000) otimizou o crescimento de *Yarrowia lipolítica* NRRL Y-1095 utilizando glicose, extrato de levedura, NH_4Cl , MgSO_4 , KH_2PO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , FeSO_4 , e tiamina observando que somente a fonte de carbono e nitrogênio foram significantes no crescimento celular, e que outras fontes não apresentaram significância, sendo utilizados o valor mínimo ou retirados da formulação.

O cultivo foi realizado em estufa tipo shaker a 28°C e a 200rpm, em meio tamponado com KH_2PO_4 7 g.L⁻¹, Na_2HPO_4 2,5 g.L⁻¹, FeCl_3 0,65 mg.L⁻¹, ZnSO_4 1,2 mg.L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,31 mg.L⁻¹ e MnSO_4 0,27 mg.L⁻¹.

Coletou-se 5 mL em réplicas nos intervalos de 24 e 48 horas de cultivo, e centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos a 25°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação de glicerol residual em HPLC, e o precipitado celular utilizado para medida de massa seca. As análises de nitrogênio residual foram realizadas pelo método KJELDAHL, e o resultado convertido para g.L⁻¹ de extrato de levedura. As análises foram realizadas utilizando regressão múltipla, e análise de superfície de resposta, utilizando o programa STATISTICA 7.1 (STATSOFT INC., 2005).

Para avaliação do meio proposto, foram realizadas fermentações em reator, utilizando o ponto ótimo definido sem adição de sulfato de amônia e comparando com outros dois meios propostos com a adição de sulfato de amônia. Para esta etapa, utilizou-se um fermentador marca Infors, agitador tipo turbina de Rushton, reator de 10L de capacidade com 4L de volume de trabalho, 28°C, 500rpm de agitação, controle de espuma por FG-1520, controle de pH com NaOH 5 M, 1vvm de aeração, utilizando filtro autoclavável de PTFE com 0,45µm de poro. O conjunto reator, solução de controle de pH e de espuma, mangueiras e meio de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 bar durante 30 minutos. Foram utilizados 400 mL (10% do volume de trabalho do reator) de pré inóculo cultivado por 24h, sendo o cultivo

realizado por 72 horas. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para avaliação da massa seca e análise de HPLC.

4.4.2 Otimização da produção de citrato

Depois de otimizado o meio de cultura que favorece o crescimento da levedura, pode-se prosseguir para maximizar a produção do citrato. Para isto empregou-se o planejamento fatorial completo com duas variáveis e três níveis, e um planejamento composto central com quatro variáveis e cinco níveis.

Foi realizado cultivo de 24 horas em frascos tipo erlenmeyer de 300mL, utilizando 50 mL de meio de cultivo YMB em cada frasco para obtenção do pré inóculo, em seguida 5mL do pré inóculo foram utilizados para inocular frascos de 300 mL de capacidade contendo 45 mL do meio de crescimento otimizado. Após 48 horas de incubação, o conteúdo de todos os frascos foi reunido em um único frasco estéril para homogeneização, e em seguida 50 ml desse meio, foi adicionado a frascos de 300 ml contendo e 6 g.L^{-1} de CaCO_3 e o meio de produção concentrado estéril, conforme determinado pelo planejamento experimental correspondente. Os frascos foram incubados a 28°C e 200 rpm, com retiradas de amostras a cada 48h para determinação de ácido cítrico e isocítrico. As amostras foram adicionadas de 0,06M de ácido sulfúrico, suficiente para reagir com todo CaCO_3 e com citrato de cálcio, formando CaSO_4 , que é insolúvel e precipita, liberando o ácido cítrico e isocitrato na sua forma livre. O citrato e isocitrato produzidos durante a fase de crescimento não foi considerado nas análises estatísticas do planejamento de produção.

Foi realizado um total de seis fermentações utilizando dois níveis de agitação (500 e 800 rpm) e três níveis de aeração (1,0, e 1,5 e 2,0 vvm). Nesta etapa, utilizou-se um fermentador marca Infors, conforme descrito na otimização do crescimento. O cultivo em reator foi realizado em duas etapas, uma fase de crescimento, utilizando meio de crescimento otimizado, e outra fase de produção. O período de crescimento celular foi de 72 horas. Ao final da fase de crescimento foi retirado assepticamente 350mL de meio do reator, e adicionado meio de produção concentrado, para concentração final no reator de 100 g.L^{-1} de glicerol, $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCl_2 , $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de MgSO_4 , $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , previamente esterilizados em autoclave, e $0,005 \text{ g.L}^{-1}$ de tiamina esterilizada a frio usando filtro de $0,22\mu\text{m}$ estéril. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise de ácido cítrico, isocítrico e massa seca.

As análises de ácido cítrico e isocítrico foram realizadas em colaboração da Universidade do Estado da Bahia, Campus de Senhor do Bonfim – BA, no laboratório de microbiologia (LAM) do Depto. de Educação, utilizando um cromatógrafo líquido da marca Dionex Ultimate 3000, com injetor de 20 μ L Ultimate 3000 Autosampler Columnm Compartment, detecção de absorção de luz UV a 210nm UV Ultimate 3000 RS Variable Wavelength Detector com 11 μ L de cela de detecção. Foi utilizado uma coluna Dionex Aclaim OA 150mm x 4mm, capaz de separar o ácido cítrico do isocítrico, e fase móvel a um fluxo de 1.0mL/min, constituída por água Milli-Q a 18M Ω , 100mM de KH₂PO₄ e acidificada com ácido metanosulfônico até um pH 2,65. Destaca-se que a coluna Aclaim Organic Acids (OA) não tem interação com o glicerol, então as análises de glicerol foram realizadas utilizando a coluna Dionex AS-1 250mm x 4,6mm, utilizando H₂SO₄ 0,005M como eluente e detector de Índice de Refração Shodex 101.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção

As cepas *P. guilliermondii* (78b2) e *P. guilliermondii* (16a2) não cresceram quando cultivadas nas condições de cultivo descritas. Os resultados obtidos mostram que as leveduras que obtiveram maior crescimento foram as cepas *Pichia caribbica* (MB160306-11A), *C. parapsilosis* (MY1-1), *P. guilliermondii* (MY4-2), *P. guilliermondii* (10a), *P. guilliermondii* (16a1). Não houve alterações de pH neste ensaio, mantendo-se ao redor de 6,5, e não obstante, não houve concentrações elevadas de ácidos ou alcoóis, sendo que estas cepas não mostraram potencial biotecnológico. Os metabólitos identificados encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Metabólitos (g.L^{-1}) identificados no primeiro ensaio usando 20 g.L de glicerol, 0,5 g.L^{-1} de extrato de levedura, 0,5 g.L^{-1} de sulfato de amônia, 0,2 g.L^{-1} de KH_2PO_4 , e 0,15 g.L^{-1} de FeCl_3 após 96h de cultivo.

	Citrato	Succinato	Lactato	Acetato	Fumarato	Butirato	Etanol	Glicerol restante
<i>Pichia caribbica</i> (MB160306-11A)	-	0,56	0,187	0,41	-	-	0,29	2,07
<i>Candida sp.</i> (MY6-1)	0,16	-	-	0,73	-	-	-	2,05
<i>P. subpeliculosa</i> (MY6-2)	0,17	0,72	-	1,67	-	0,19	-	1,70
<i>P. guilliermondii</i> (M6270406-1a4)	-	-	-	-	-	-	-	9,34
<i>C. parapsilosis</i> (MY1-3)	-	-	-	-	-	-	-	3,95
<i>C. parapsilosis</i> (MY1-1)	-	-	-	-	-	0,43	-	3,98
<i>P. guilliermondii</i> (MY4-2)	-	0,34	-	-	-	-	-	7,88
<i>C. smithsonii</i> (MB160306-9a)	-	0,30	-	-	-	-	-	15,88
<i>P. guilliermondii</i> (10a)	0,09	0,60	-	-	0,02	-	-	11,90
<i>P. guilliermondii</i> (16a1)	-	-	-	-	-	0,44	-	3,25

(-) Não Detectado

Observa-se que apesar de uma boa assimilação do glicerol pelas cepas *Pichia caribbica* (MB160306-11A), *Candida sp.* (MY6-1), *P. subpeliculosa* (MY6-2),

C.parapsilosis (MY1-3), *C. parapsilosis* (MY1-1) e *P. guilliermondii* (16a1), mesmo assim, não apresentaram uma grande produção de metabólitos em relação à fonte de carbono consumido, e para outras quatro leveduras estudadas, cerca de 50% ou mais de glicerol inicial permanecia no meio. O melhor rendimento foi da cepa 3LP na produção de acetato, todavia, foi extremamente baixo ($Y_{\text{acet/glol}} = 0,09$).

No segundo ensaio, utilizou-se 3% de glicerol e também não se obteve sucesso em relação à produção de metabólitos, apresentando baixos rendimentos. Os resultados de produção e consumo de glicerol podem ser observados na figura 3.

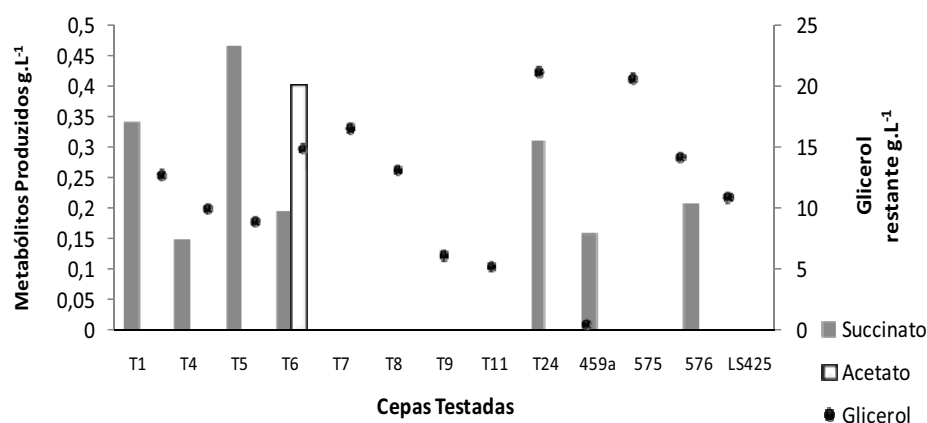


Figura 3 – Metabólitos produzidos e o glicerol restante utilizando 30,0 g.L⁻¹ de glicerol, 0,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de amônia, 0,2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, e 0,15 g.L⁻¹ de FeCl₃ após 96 h.

Como se pode observar, não houve uma grande assimilação de glicerol, mesmo após 96 horas de cultivo. Foram produzidas quantidades baixas de ácido succínico e o acetato foi produzido somente por uma cepa. Os melhores rendimentos nesse caso ocorreram com as cepas T5 e T6, com $Y_{\text{suc/glol}}$ de 0,04 para ambas as cepas. O pH manteve-se em torno de 6, indicando que não houve grande produção de ácido.

Não foi encontrado um grande número de picos nos cromatogramas, indicando que não houve a formação de muitos metabólitos secundários. Pelo fato dessas cepas serem selvagens e até o momento nem todas foram identificadas, pode ser que exijam condições ou nutrientes (vitaminas) específicas para seu desenvolvimento. Não foi encontrado referências de metabólitos produzidos pelas espécies identificadas.

Na prospecção realizada com as cepas de *Y. lipolytica*, houve diminuição do pH do meio de cultura, indicando que houve a produção de ácido. Nos cromatogramas houve

ocorrência de vários picos diferentes, que não puderam ser identificados pela falta de padrões. Os resultados dessas fermentações encontram-se na tabela 4. Nota-se que não houve grande produção de ácidos detectados, apesar de ter havido um bom consumo de glicerol. O maior rendimento de citrato/glicerol foi com a cepa NRRL Y109 ($Y_{\text{cit/gol}} = 0,01$), que foi extremamente baixo.

Tabela 4 – Terceiro ensaio: Fermentação com as cepas de *Y. lipolytica* utilizando meio proposto por Papanikolaou *et al.* (2002), 20 g.L⁻¹ de glicerol e sem adição de tiamina.

(g.L ⁻¹)	CCT6770	CCT7401	NRRLY109	YLI	YLII
Citrato	0	0,084	0,10	0,10	0,05
Succinato	0	0,12	0,12	0	0
Glicerol	5,84	5,83	6,42	5,68	6,46
pH final	3,30	5,52	3,39	3,50	3,91

Yarrowia lipolytica é uma levedura capaz de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos. A produção de ácidos por *Y. lipolytica* deve-se a desregulação no ciclo do ácido cítrico. Após a fase de crescimento celular, o consumo de ATP fica limitado e devido ao estresse causado pela falta de nitrogênio, impede a reprodução celular. Em resposta a essa perturbação, a célula inicia a produção de citrato-sintase devido a uma grande quantidade de substrato remanescente, levando a produção de ácido cítrico em excesso (I'LCHENKO *et al.*, 2002).

Na falta de vitamina B1 (tiamina), não há excreção do excesso de ácido cítrico para o meio extracelular e a levedura o consome produzindo α -cetoglutarato, o qual é excretado no meio em grande quantidade. Também se deve ressaltar que ao contrário da produção de ácido cítrico, a produção de α -cetoglutarato não é limitada por baixas concentrações de oxigênio (I'LCHENKO *et al.*, 2002).

Para o quarto ensaio, o meio foi suplementado com 5,0 mg.L⁻¹ de tiamina esterilizada com filtro de 0,2 μ m. Papanikolaou *et al.* (2002) não cita em seu trabalho a necessidade de tal vitamina. A quantidade de extrato de levedura adicionado ao meio, (YAZDANI; GONZALES, 2007, SCIOLI; VOLLARO, 1997) pode suprir as necessidades de vitaminas e micronutrientes ao crescimento e produção das células, no entanto, a esterilização do meio em autoclave pode alterar as propriedades químicas do extrato de levedura, justificando a necessidade de suplementação de vitaminas. Os resultados referentes a esta fermentação encontram-se na figura 4.

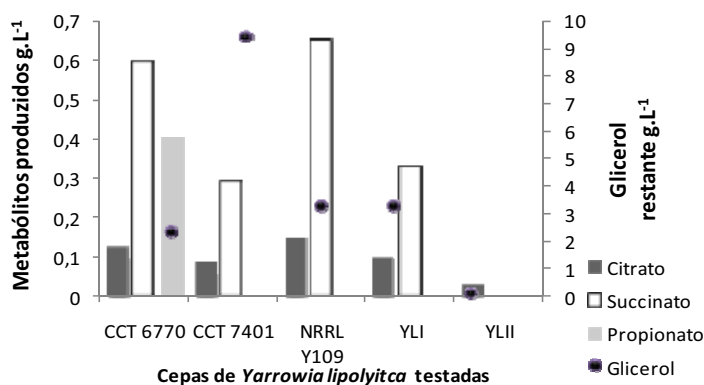


Figura 4 – Quarto ensaio: Produção de metabólitos por cepas de *Y. lipolytica* utilizando meio mineral proposto por Papanikolaou *et al.* (2002), modificado: 20g.L⁻¹ de glicerol e adição de 5 mg.L⁻¹ de tiamina.

Mesmo com a suplementação, não foi possível detectar grande produção de citrato, com um rendimento de 0,009 g_{cit}/g_{glol}. Apesar de ácido succínico ser detectado, não se encontra na literatura a sua produção por *Yarrowia lipolytica*, sugerindo que o tempo de retenção deste metabólito coincide com algum outro subproduto da fermentação. Para os ensaios seguintes, mudou-se o meio de cultura, passando-se a utilizar o meio mineral proposto por CROLLA; KENNEDY (2004), o qual possui quantidade de íons de ferro (0,65 mg.L⁻¹) inferior ao meio proposto por Papanikolaou (2002). Foi aumentado a quantidade de glicerol para 30 g.L⁻¹, a fim de aumentar a relação C/N e verificar a produção do citrato.

Nos experimentos seguintes verificou-se a influência de duas concentrações de tiamina, 5 mg.L⁻¹ com citado em Hamissa *et al.*, (1980), e 0,25 mg de acordo com Antonucci *et al.* (2001). Foi feita a adição de 6 g.L⁻¹ de CaCO₃ ao meio, como tamponante do pH, conforme proposto por Armiliato (2004) e em outro experimento foram adicionados 0,15 g de CaCO₃ sem a função de controle de pH. Os resultados de pH final dessas fermentações encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – pH final dos ensaios com meio mineral modificado de Crolla e Kennedy (2001), com adição de diferentes concentrações CaCO₃ (g.L⁻¹) e Tiamina (Vit B1 mg.L⁻¹).

	CaCO3 6g Vit B1 5mg	CaCO3 6g Vit B1 0,25mg	CaCO3 0,15g Vit B1 5mg	CaCO3 0,15g Vit B1 0,25mg
CCT 6770	4,9	5,05	3,33	3,09
CCT 7401	5,31	5,22	3,34	3,25
NRRL Y109	5,08	5,08	2,71	2,74
YL I	5,08	4,93	2,75	2,76
YL II	6,25	6,07	4,52	3,41

Como observado, o meio contendo maior quantidade de carbonato apresentou queda menos acentuada no pH. Todavia, o pH não parece ter sido fator limitante na produção de ácidos, conforme os resultados dos cromatogramas realizados após as 120h de fermentação, e que se encontram nas figuras de 5 à 8.

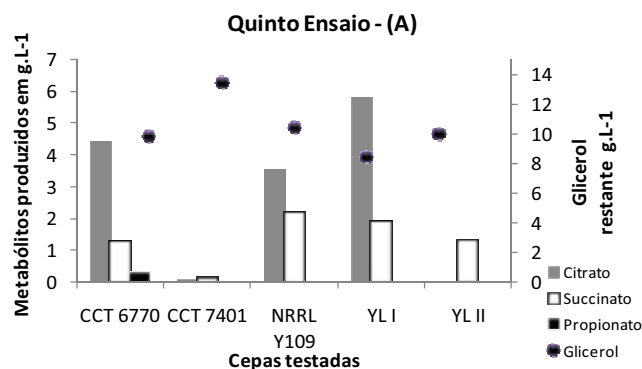


Figura 5 – Fermentação utilizando 6 g.L⁻¹ de CaCO₃ e 5 mg.L⁻¹ de vitamina B1.

Na fig. 5, pode-se observar que neste ensaio houve um aumento significativo na produção de citrato quando comparado aos ensaios anteriores, atingindo 5,8 g.L⁻¹ pela cepa YLI e com um rendimento de 0,27 g_{cit}/g_{glol}.

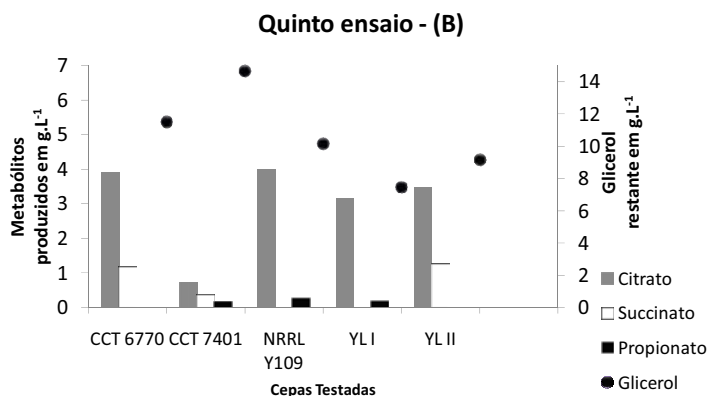


Figura 6 – Fermentação utilizando 6,0 g.L⁻¹ de CaCO₃ e 0,25 mg.L⁻¹ de vitamina B1.

Comparando os dois ensaios (fig. 5 e 6), pode-se observar que houve aumento de rendimento das cepas CCT 6770 ($Y_{cit/Glöl} = 0,45$) e da NRRL Y109, ($Y_{cit/Glöl} = 0,40$). Pode ser observado uma quantidade muito elevada de glicerol residual, mesmo após 96 horas.

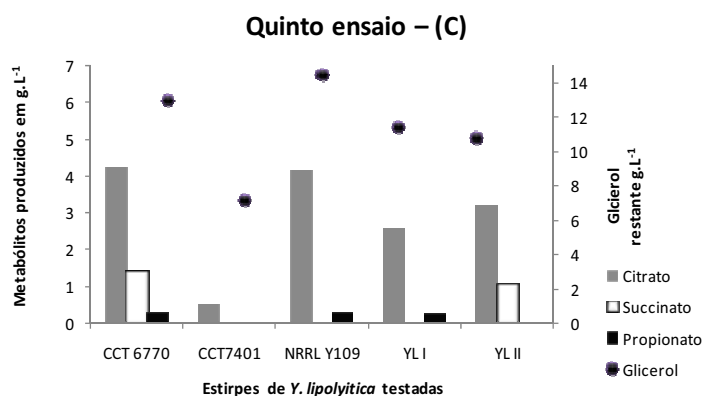


Figura 7 – Fermentação utilizando 0,15 g.L⁻¹ de CaCO₃ e 5m g.L⁻¹ de vitamina B1.

Com a diminuição do carbonato de cálcio, não houve grande diferença na produção de citrato, mas o rendimento da cepa CCT 6770 chegou a 0,49 g_{Cit}/g_{GloI}, e da NRRL Y109 foi de 0,42 g_{Cit}/g_{GloI}.

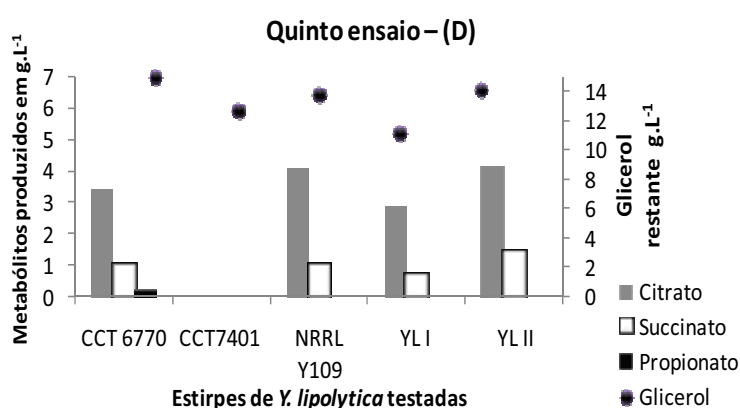


Figura 8 – Fermentação utilizando 0,15 g.L⁻¹ de CaCO₃ e 0,25 mg.L⁻¹ de vitamina B1.

A utilização do meio mineral modificado, proposto por Crolla e Kennedy (2001), utilizado nestas fermentações resultou em uma maior produção de citrato quando comparado com o meio mineral proposto por Papanikolaou (2002), utilizado nas fermentações anteriores. Isto provavelmente é devido à redução dos íons de ferro no meio de cultura e à adição de CaCO₃, favorecendo a inibição da enzima aconitase.

A quantidade de glicerol residual nos ensaios com *Y. lipolytica* indicou a necessidade de um ajuste quanto a oxigenação dos frascos. Sabe-se que a fermentação para produção de ácido cítrico depende de um ambiente altamente aeróbio (CROLLA; KENNEDY, 2001), e

considerando-se que *Y. lipolytica* é um aeróbio estrito (KAMZOLOVA, 2003), a limitação de transferência de oxigênio em frascos poderia ter influenciado negativamente na assimilação do glicerol e também na produção de citrato.

Armiliato (2004) concluiu que o tipo de pás do fermentador, a aeração e quantidade de oxigênio dissolvido interferem na produção de citrato. Vários autores sustentam a afirmativa que a quantidade de oxigênio deve estar saturada ou superior a 70% para a respiração de *Yarrowia lipolytica* NRRL-1095 (ANASTASSIADIS; REHM, 2006; ARANTES *et al.* 2001; ARMILIATO, 2004; CABELLO; LEONEL, 1994; CROLLA; KENNEDY, 2004; I'LCHENKO *et al.*, 2001; PAPANIKOLOAU *et al.*, 2008; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002). Também, a utilização de baixas concentrações de íons de ferro no meio de cultura favorece a produção de citrato por não ativar a enzima aconitase, responsável em transformar o citrato, em isocitrato (ANASTASSIADIS; REHM, 2006; CROLLA; KENNEDY, 2001), assim como elevadas concentrações de sais de cálcio, como o CaCO_3 , que além de funcionar como um agente tamponante, os íons de cálcio podem inibir a atividade da enzima aconitase. (ARMILIATO, 2004).

Com base nos resultados e na literatura, outros três ensaios foram realizados em usando frascos aletados, com o intuito de aumentar a aeração. Nestes ensaios utilizou-se o meio mineral descrito no item 4.2 da metodologia, com as cepas anteriores e também com *Y. lipolytica* NRRL Y-1095, descrita na literatura como boa produtora de citrato (ARMILIATO, 2004; CROLLA; KENNEDY, 2004; 2001; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; RANE; SIMS, 1996). Os resultados dos ensaios em frascos aletados são mostrados nas figuras de 9 a 11 respectivamente.

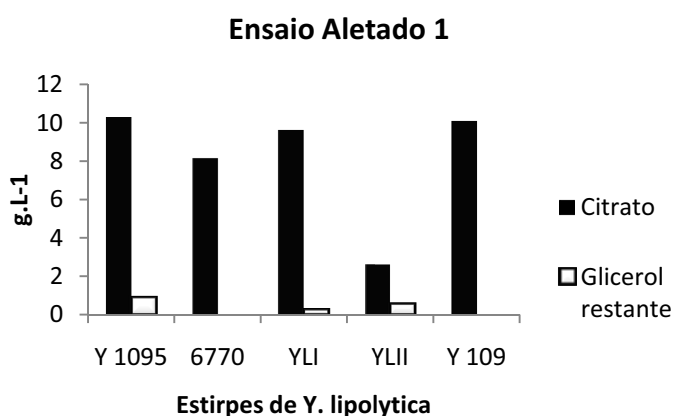


Figura 9 – Fermentação realizada com frascos aletados, com 100g.L de glicerol e 2,0 g.L⁻¹ de uréia, 28°C e 200 rpm, após 96 h de cultivo.

Na fig. 9 observa-se que o consumo de glicerol foi elevado, o rendimento para produção de ácido foi baixo. A produção máxima de citrato foi de $10,26 \text{ g.L}^{-1}$ pela cepa NRRL Y-1095. A cepa Y-109 também mostrou uma boa produção de citrato, $10,04 \text{ g.L}^{-1}$ e um consumo total de glicerol. Ambas as cepas tiveram um rendimento de $0,1 \text{ g}_{\text{cit}}/\text{g}_{\text{glol}}$. Observa-se que a produção total de citrato foi superior aos ensaios da primeira etapa.

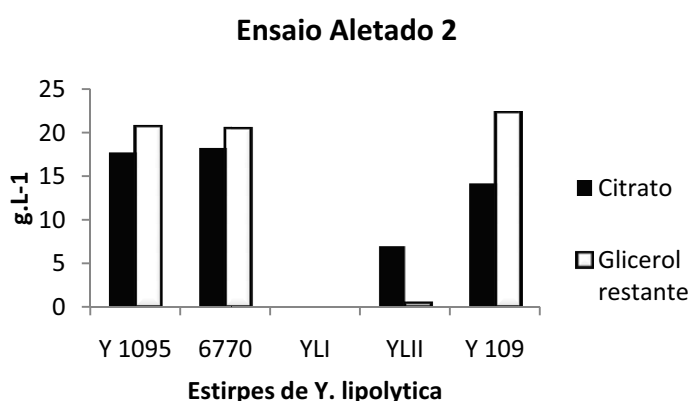


Figura 10 – Fermentação com frascos aletados, com 75 g.L de glicerol e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônia, 28°C e 200 rpm , após 96 h de cultivo.

Na fermentação utilizando 75 g.L de glicerol e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônia houve menor consumo de glicerol, entretanto foi produzida uma maior quantidade de citrato, sendo que a cepa NRRL Y 1095 apresentou uma produção de $17,67 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido e rendimento de $0,32 \text{ g}_{\text{cit}}/\text{g}_{\text{glol}}$. A cepa CCT6770 produziu $18,16 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido e um rendimento de $0,33 \text{ g}_{\text{cit}}/\text{g}_{\text{glol}}$. Este resultado é melhor quando comparado ao anterior ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de uréia), sugerindo que sulfato de amônia favorece a produção de citrato.

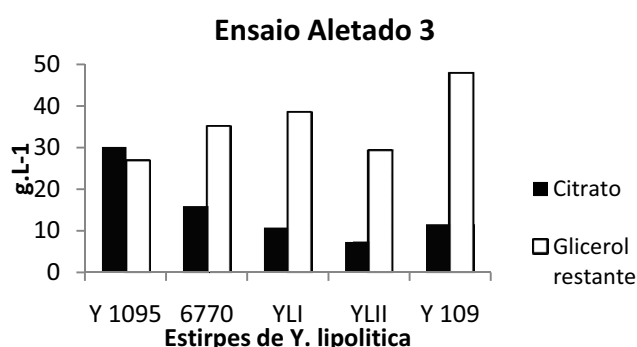


Figura 11 – Fermentação com frascos aletados, realizado em duas etapas: trofofase com 75 g.L^{-1} de glicerol e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônia; e idiofase com 100 g.L^{-1} de glicerol após 144 h .

O terceiro e último ensaio foi decisivo para escolha da cepa. Nas condições de cultivo em duas fases, uma de crescimento e outra de produção, adicionando a concentração de 100 g.L⁻¹ de glicerol após 72h, houve uma produção de 30,06 g.L⁻¹ de citrato pela cepa NRRL Y1095, com um rendimento de 0,30 g_{cit}/g_{glol}, além de uma produção consideravelmente alta em todos os ensaios, sendo esta escolhida para ser otimizada para produção de ácido cítrico, seu principal metabólito. Apesar da cepa CCT6770 ter sido boa produtora na segunda fermentação com frascos aletados, não obteve um bom rendimento nos dois outros ensaios usando concentrações mais elevadas de glicerol.

De acordo com Costa (2000) e Papanikolaou e Aggelis (2003), a fermentação de ácido cítrico por *Y. lipolytica* ocorre melhor em duas etapas, uma fase de crescimento celular, e outra de produção de citrato, após a depleção do nitrogênio extracelular. A afirmação colabora com o resultado, sendo produzida uma grande quantidade de ácido quando a produção foi realizada em duas etapas, além de ter sido realizada com um maior tempo e com uma maior quantidade de glicerol. Apesar disso, houve diferenças entre as réplicas com relação a produção de massa seca e de citrato produzido, provavelmente devido a desigualdade e tamanho das aletas, gerando muita espuma e a agitação excessiva, que joga o meio de cultivo para o tampão de algodão, mesmo a baixas rotações.

5.2 Otimização do crescimento celular

Após a escolha da cepa, passou-se para a fase de otimização do crescimento celular, variando-se as concentrações de carbono e nitrogênio.

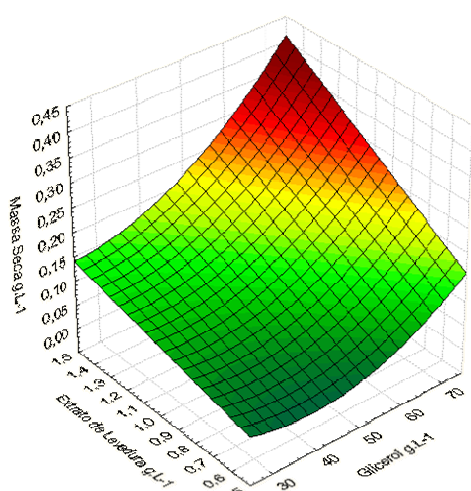
No primeiro planejamento utilizou-se três variáveis: glicerol, NH₄Cl e extrato de levedura em três níveis cada (3³), um total de 27 experimentos realizados em réplicas e com 4 repetições do ponto central. Os valores decodificados usados nos ensaios estão mostrados na tabela 6.

Tabela 6 – Valores decodificados (g.L⁻¹) utilizados no planejamento experimental variando glicerol, sulfato de amônia e extrato de levedura.

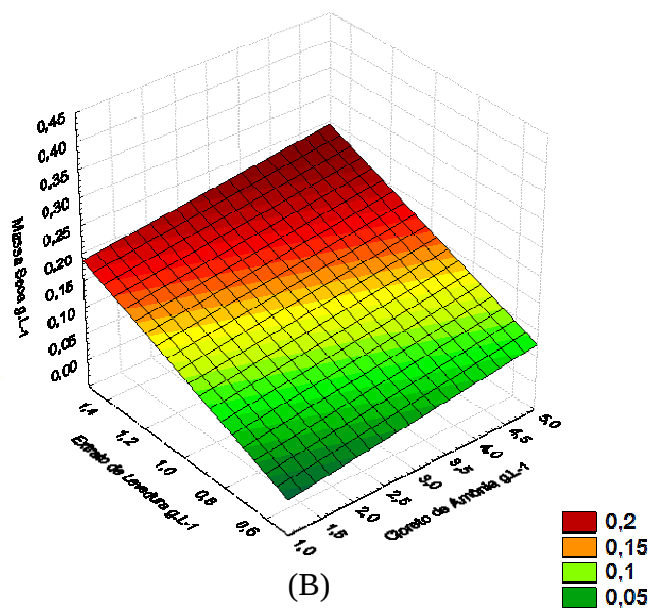
Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Glicerol	25	50	75
Ext. Levedura	0,5	1	1,5
NH ₄ Cl	1	3	5

Os resultados de massa seca foram analisados utilizando os gráficos de superfície de resposta gerados pelo software STATISTICA 7.1 (STATSOFT INC., 2007). As superfícies de resposta para massa seca encontram-se na figura 12.

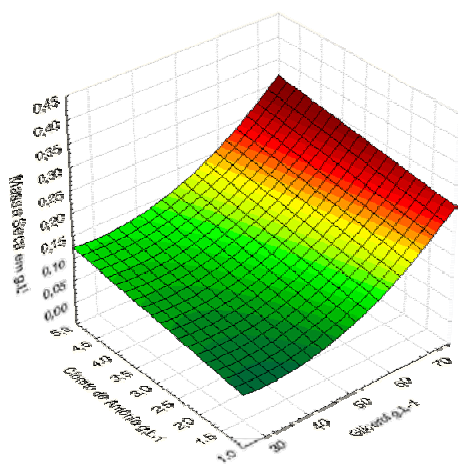
$$\text{Function} = 0,129910 + 0,095446 * ((X-50)/25) + 0,086404 * ((Y-1)/0,5) + 0,040535 * (((X-50)/25) * ((Y-1)/0,5)) + 0,060341 * (((X-50)/25)^2)$$



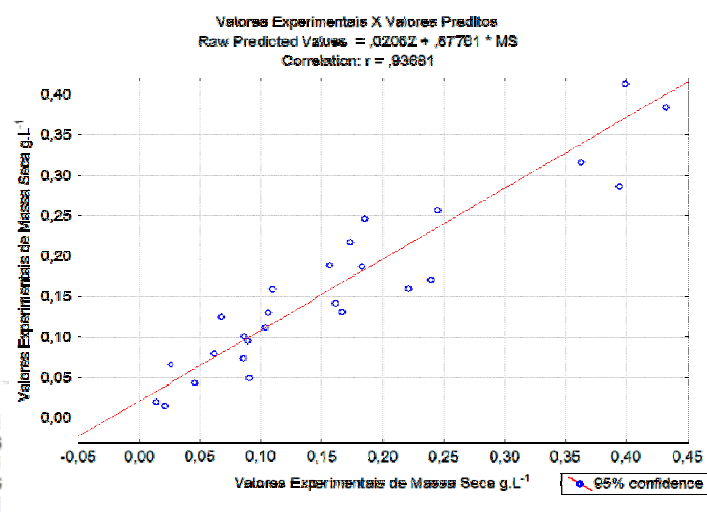
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 12 - Valores de massa seca (g.L^{-1}) obtidos do planejamento experimental 01 com equações ajustadas. A- Glicerol x NH_4Cl ; B- Glicerol x Extrato de levedura; C- NH_4Cl x Ex. levedura; D- Valores Experimentais x Valores previstos.

Pouca biomassa foi produzida, sendo o máximo obtido 400 mg.L^{-1} , resultado este insatisfatório. Provavelmente o uso de cloreto de amônia como fonte principal de nitrogênio não é viável para o crescimento celular, contribuindo com $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de aumento da biomassa. Por outro lado, o extrato de levedura e o glicerol são extremamente significantes em maiores quantidades, e apresentaram interação entre si. Apesar da baixa correlação ($R^2=0,93$) foi possível indicar um novo planejamento experimental, onde foi retirado o cloreto de amônia do planejamento, verificando a interação entre o extrato de levedura e o glicerol. As tabelas com os experimentos realizados com os valores codificados e os resultados, assim como a análises de regressão múltipla encontram-se no Anexo 1.

Para o segundo planejamento fatorial completo, foi usado duas únicas variáveis em três níveis (3^2), gerando um total de 9 experimentos, realizados em réplicas e com 4 repetições do ponto central. Os níveis descodificados utilizados neste planejamento estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Valores descodificados (g.L^{-1}) utilizados no planejamento experimental variando glicerol e extrato de levedura.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Glicerol	25	50	75
Ext. Levedura	3	5	7

A tabela com os valores codificados e as análises de regressão múltipla do segundo planejamento experimental encontram-se no Anexo 2. Os resultados de massa seca foram analisados utilizando os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno para massa seca, que podem ser observados na figura 13.

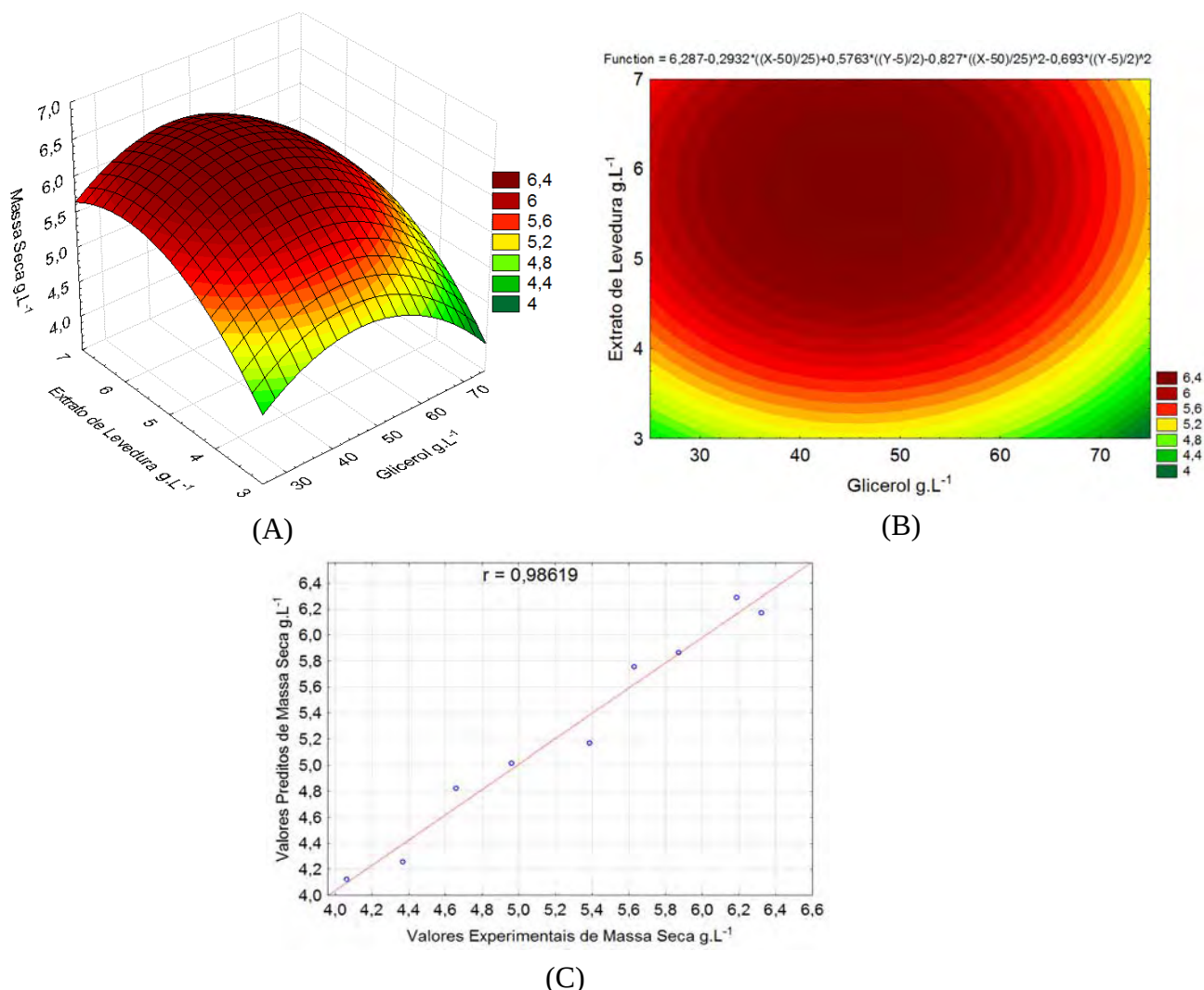


Figura 13 – Resultados de massa seca obtidos do segundo planejamento experimental com equações ajustadas. A- Superfície de resposta de Glicerol x Extrato de levedura; B- Curvas de Contorno Glicerol x Extrato de levedura C- Valores Experimentais x Valores previstos para massa seca.

Observa-se que os resultados se encontram próximos a uma linha de tendência, com uma correlação de 98,62%, e se obteve uma superfície de resposta com uma região ótima de crescimento celular. Não houve interação significativa entre o glicerol e o extrato de levedura ($X \cdot Y$) neste caso, conforme apresentado pela função na figura 13-B. Isto significa que ambos os fatores agiram independentemente ao crescimento.

Com este resultado foi possível determinar um ponto ótimo para o extrato de levedura e o glicerol, determinado através do software Maple 9.5. Os resultados sugerem o uso de $55,97 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol e $5,90 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura para o melhor crescimento, com um resultado calculado de $6,45 \text{ g.L}^{-1}$ de massa seca usando as mesmas condições de cultivo. Realizou-se um cultivo em triplicata usando as condições estabelecidas pelo ponto ótimo e obteve-se $6,32 \text{ g.L}^{-1}$ de massa seca. A utilização do ponto central do planejamento (50 g.L^{-1} de

glicerol e 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura) apresenta mais vantagens de ser usado do que o ponto ótimo, uma vez que o ponto central garante um crescimento próximo ao experimentado (6,18 g.L⁻¹). Foram realizadas análises de glicerol e extrato de levedura residuais, e os resultados deram origem a superfícies de resposta, confrontadas com as fontes de nutrientes iniciais, apresentados na figura 14.

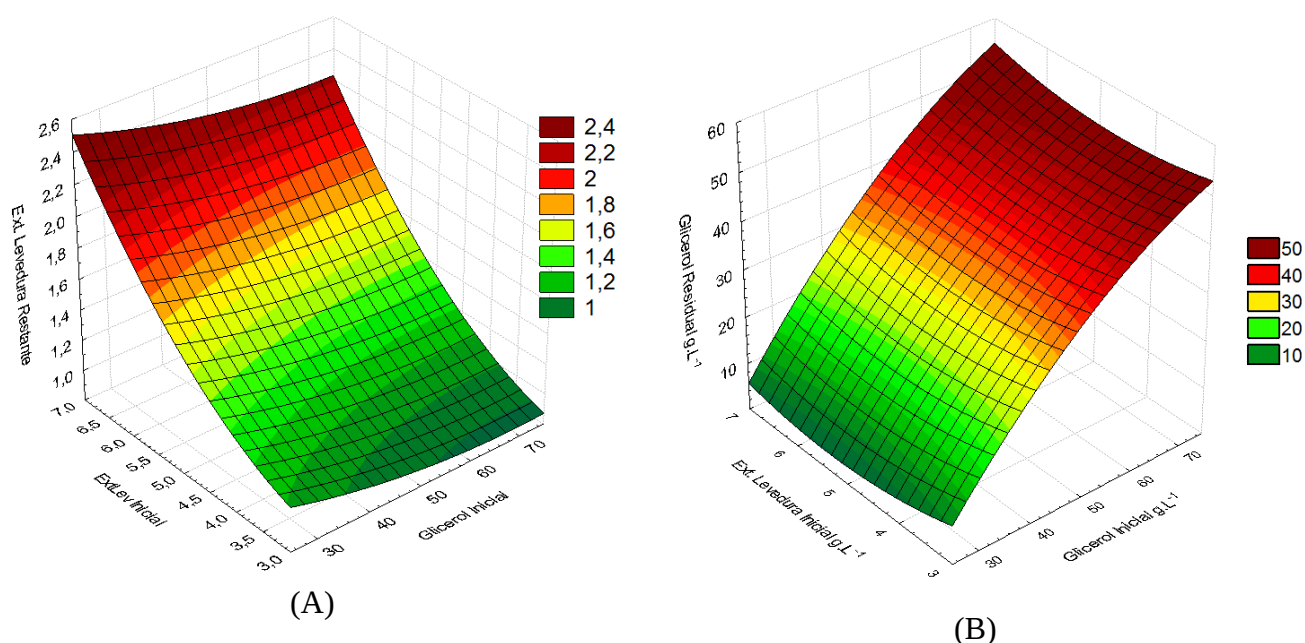


Figura 14 – Superfícies de resposta de nutrientes residuais (g.L⁻¹) em frascos. A – Extrato de levedura residual; B – Glicerol residual .

Como pode ser observado nos gráficos, ainda foram detectados glicerol e extrato de levedura. Se utilizado o ponto ótimo calculado (55,97 g.L⁻¹ de glicerol e 5,9 g.L⁻¹ de extrato de levedura), estima-se uma quantidade residual de 2 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 36 g.L⁻¹ de glicerol. Com a utilização do ponto central há uma menor quantidade de extrato de levedura residual após a fase de crescimento (em 1,2 g.L⁻¹). Com base nesses resultados, sendo sugerido a utilização de 50 g.L⁻¹ de glicerol e 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura.

Além desse planejamento, foi realizado um Planejamento Composto Central, utilizando três variáveis, três níveis, α e $-\alpha$ definidos pelo software STATISTICA 7.1, na tentativa de otimizar o meio de cultura para crescimento celular usando glicerol, sulfato de amônia e extrato de levedura. Os níveis utilizados são apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Planejamento composto central realizado para crescimento celular.

	-α -1,68	-1	0	1	+α 1,68
Glicerol	12,96	30	55,00	80	97,04
Ext. de Levedura	1,64	3	5	7	8,36
(NH₄)₂SO₄	0,16	0,5	1	1,5	1,84

As tabelas com os experimentos realizados com os valores codificados e os resultados, assim como a análises de regressão múltipla encontram-se no Anexo 3. Pode se observar que adicionando sulfato de amônia no meio de cultura, os padrões de crescimento celular mudaram, com o mesmo tempo de crescimento obteve-se uma quantidade maior de biomassa, mas não se obteve um ponto ótimo, conforme observado pela figura 15.

$$5,215+0,5774*((x-55)/25)+1,599*((y-5)/2)+0,523*((x-55)/25)*((y-5)/2)$$

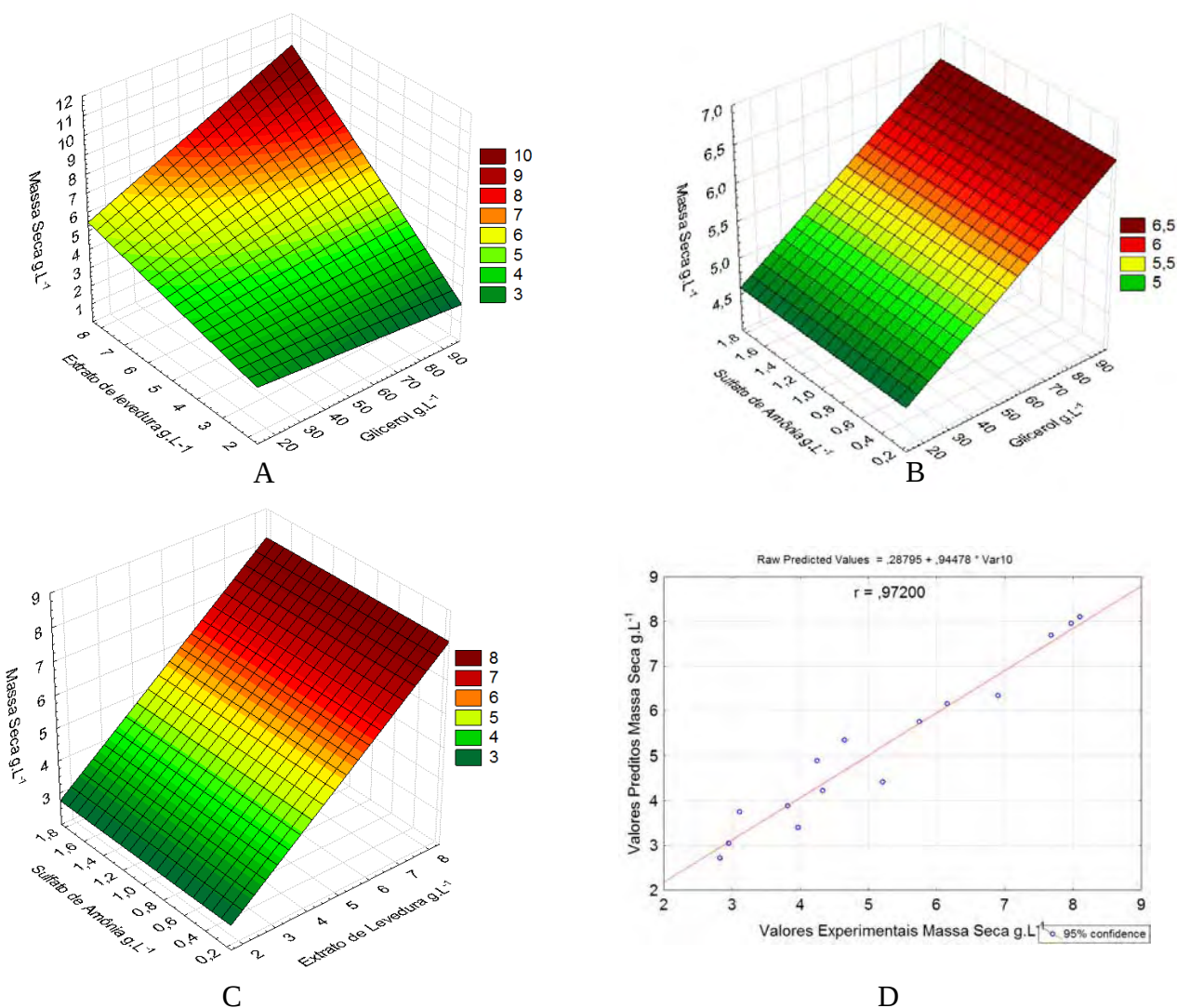


Figura 15 – Planejamento experimental usando glicerol, extrato de levedura e sulfato de amônia para produção de biomassa. A – Glicerol e Ext. Levedura; B – Glicerol e Sulfato de Amônia; C – Extrato de Levedura e Sulfato de Amônia; D – Valores Experimentais X Valores Preditos.

A utilização de sulfato de amônia não foi significativa para o crescimento, sendo que pode ser mantida na concentração mínima. Além disso, houve nesse planejamento interação significativa entre o extrato de levedura e o glicerol, podendo o nitrogênio amoniacal participar para que haja essa interação, conforme pode ser observado no gráfico ajustado, e pela equação apresentada na figura 15-A.

Costa (2000) realizou em um dos seus experimentos um planejamento composto central (PCC) para otimizar o crescimento celular utilizando 3 variáveis glicose, extrato de

levedura e NH_4Cl . Os experimentos foram conduzidos em frascos aletados. Os valores utilizados são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Valores (g.L^{-1}) utilizados por Costa (2000) em seu segundo e terceiro planejamento composto central.

Variáveis	Níveis 2º PCC					Níveis 3º PCC				
	-1.68	-1	0	1	+1.68	-1.41	-1	0	1	+1.41
Glicose	20	28	40	52	60	25	32,27	50	67,73	75
Ext. Levedura	0,5	1,41	2,75	4,1	5	2	2,87	5	7,13	8
NH_4Cl	0	0,4	1	1,6	2	1	1	1	1	1

Nestes planejamentos obtive 15 g.L^{-1} de massa seca no segundo PCC, e 17 g.L^{-1} no terceiro PCC. Sugeri que concentrações acima de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de cloreto de amônia têm um efeito negativo ao crescimento de *Y. lipolytica*. Com base nas análises de superfície de resposta de massa seca e glicose residual, estabeleceu o meio de crescimento em $30,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose, $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de NH_4Cl e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 . Mesmo assim, houve cerca de 8 g.L^{-1} e glicose residual. Outros elementos como MgSO_4 , KH_2PO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , FeSO_4 , e tiamina não se mostraram significativos para o crescimento celular.

Apesar do planejamento experimental usado apresentar uma linha de tendência em que maiores quantidades de glicerol e extrato de levedura são necessárias para o crescimento, o mesmo não corresponde aos valores obtidos experimentalmente, como pode ser observado na tabela 10.

Tabela 10 – Valores decodificados utilizados no planejamento composto central e os resultados obtidos de Massa Seca (g.L^{-1}).

Corrida	Glicerol	Extrato de Levedura	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Massa Seca
1	30	3	0,5	2,95
2	30	3	1,5	3,82
3	30	7	0,5	4,25
4	30	7	1,5	6,90
5	80	3	0,5	3,12
6	80	3	1,5	3,97
7	80	7	0,5	7,68
8	80	7	1,5	7,97
9	12,95	5	1	4,33
10	97,04	5	1	6,16
11	55	1,63	1	2,82
12	55	8,36	1	8,11
13	55	5	0,16	5,21
14	55	5	1,84	4,65
15	55	5	1	5,75
16	55	5	1	5,75

Sabe-se que leveduras suportam grandes pressões osmóticas, e apesar da utilização de grandes quantidades de glicerol e extrato de levedura, não houve inibição do crescimento pelo excesso de substrato neste último planejamento, pois a levedura continuou crescendo mesmo sob elevadas concentrações osmóticas. Com isso, os mesmos intervalos do planejamento não resultaram na mesma distância de resposta. Provavelmente, a adição de sulfato de amônia foi importante para que a levedura obtivesse um melhor desempenho em elevadas pressões osmóticas. Por este motivo, o software estatístico pode não ter considerado a resposta biológica obtida e prevê uma melhor resposta usando maiores quantidades de glicerol e extrato de levedura.

Como se pode observar, a utilização de 55 g.L^{-1} de glicerol, observado no experimento 12 (Tabela 10) foi o melhor resultado, e em contrapartida, a utilização de $97,04 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol não foi bom para o crescimento celular. Contudo, a utilização de 5,0 gramas de extrato de levedura no experimento 10, resultou em um valor de massa seca próximo ao ponto central. Isto pode significar que o modelo matemático julgue que o resultado de $6,15 \text{ g.L}^{-1}$ de massa seca se deve a diminuição do extrato de levedura, e não a alta concentração do glicerol.

Em relação à quantidade de glicerol para o crescimento celular, Rymowicz *et al.* (2006), apesar de não ter apresentado resultados de otimização deste, utilizaram em seus trabalhos 50 g.L⁻¹ de glicerol, 2 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 3 g.L⁻¹ de peptona, obtendo para as cepas K-1, AWG-7 e 1,31, uma quantidade de biomassa em fermentador de 26,5 g.L⁻¹, 22,1 g.L⁻¹ e 16,5 g.L⁻¹ respectivamente.

Kamzolova *et al.* (2003) observou que há diferenças significativas no crescimento de *Y. lipolytica* N1 usando diferentes concentrações de ferro e de oxigênio dissolvido. Usando 0,7 mg.L⁻¹ de FeSO₄, a biomassa teve um aumento de 2,8 para 6.9 g.L⁻¹ com o aumento na concentração de oxigênio de 5% para 20%. Usando saturações acima dos 60% não houve diferença entre as concentrações de ferro usadas. A concentração de 3,5 mg.L⁻¹ de FeSO₄ teve a maior concentração de biomassa independente das pO₂ testadas, indicando que o ferro é importante no suprimento de energia, e o uso de baixas concentrações de ferro pode ser compensado pela utilização de altas concentrações de oxigênio dissolvido. Isso se deve a dependência de íons ferro pela aconitase hidratase, que tem atividade baixa em baixas concentrações de ferro, limitando o crescimento pela falta de energia, e também o acúmulo de citrato. Não obstante, na presença de saturação acima dos 20% de oxigênio, a enzima volta a ser ativa, e pO₂ acima dos 60%, tem atividade igual a de concentrações elevadas de íons de ferro. Esse estudo é importante no ponto de vista de acelerar o crescimento, aumentar a produtividade e quantidade de citrato produzidas, porém também é interessante ressaltar que baixas concentrações de ferro inibem a isocitrato sintase, aumentando assim a razão citrato/isocitrato produzidos, e que cada cepa responde diferentemente às concentrações de oxigênio e ferro.

Costa (2000) observou que tanto concentrações de 2,5 e 5 mg.L⁻¹ de FeSO₄ causavam um efeito negativo na produção de citrato pela a cepa NRRL Y-1095, sendo retirado do meio de produção.

Papanikolaou e Angelis (2003) determinaram os modelos cinéticos de *Y. lipolytica*, para o crescimento celular, consumo de glicerol e produção de citrato e, usando frascos comuns em batelada e uma concentração de glicerol inicial de 80 g.L⁻¹ e nitrogênio total de 0,14 g.L⁻¹. A constante de saturação de nitrogênio obtida foi maior do que a constante de saturação de elementos minerais, que é de 10 a 20 mg.L⁻¹, o que pode ser atribuído ao fato de que a o crescimento desta espécie geralmente continua mesmo após a depleção do nitrogênio mineral extracelular, enquanto que as reservas de nitrogênio intracelular são consumidas.

Com base nos resultados, não foi possível estabelecer um ponto ótimo para o sulfato de amônia, sendo proposto que se mantenha esse sal em $1,0 \text{ g.L}^{-1}$. Provavelmente isso pode ter acontecido pelo uso de frascos de 300mL comuns, que não conferem uma maior oxigenação no meio de cultura, limitando o crescimento. Desta forma, foi sugerido o uso de glicerol 50 g.L^{-1} , extrato de levedura $5,0 \text{ g.L}^{-1}$, sulfato de amônia $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, KH_2PO_4 $7,0 \text{ g.L}^{-1}$, Na_2HPO_4 $2,5 \text{ g.L}^{-1}$, FeCl_3 $0,65 \text{ mg.L}^{-1}$, ZnSO_4 $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,31 \text{ mg.L}^{-1}$ e MnSO_4 $0,27 \text{ mg.L}^{-1}$.

Foram realizados ensaios em fermentador com o ponto ótimo calculado, o ponto central adicionado de sulfato de amônia e um ponto usando baixa concentração de extrato de levedura.

O crescimento celular em reator foi conduzido em fermentador conforme descrito no item 4.4.1 da metodologia. O meio base foi composto por $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , FeCl_3 $0,65 \text{ mg.L}^{-1}$, ZnSO_4 $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,31 \text{ mg.L}^{-1}$ e MnSO_4 $0,27 \text{ mg.L}^{-1}$, e variações das fontes de carbono e nitrogênio, conforme apresentado na tabela 13.

Tabela 13 – Variações dos meios de cultura realizados nos ensaios em fermentador.

	Glicerol	Ext. de Levedura	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
1	55,9	5,9	0
2	50	5	1
3	50	2,5	1

Com aeração e pH melhor controlados no reator, observou-se diferentes resultados com relação a quantidade de biomassa obtida, onde se pode observar na figura 18.

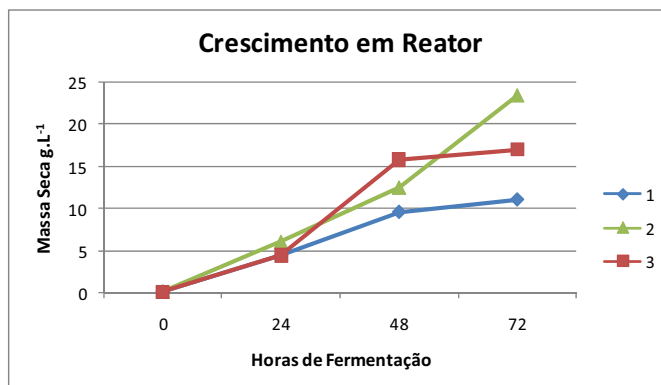


Figura 13 – Ensaio realizado em fermentador para o crescimento celular variando a concentração de nitrogênio.

Na fermentação sem o sulfato de amônia, o máximo de biomassa obtida foi $11,02 \text{ g.L}^{-1}$, resultado não satisfatório. Observou-se nesta fermentação que mesmo após 144 horas o crescimento ainda ocorria. Possivelmente isso se deve pela falta de sulfato de amônia, que de alguma forma deve acelerar o crescimento. Utilizando 50 g.L^{-1} de glicerol, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura e 1 g.L^{-1} de sulfato de amônia, obteve-se um bom crescimento, o qual cessou em 48 horas, e que é interessante no sentido de acelerar o tempo de processo. A menor quantidade de substrato, associada ao sulfato de amônia pode ter facilitado na assimilação de nutrientes, resultando em uma taxa de crescimento mais elevada.

Usando $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônia e $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol, se obteve o melhor resultado. Observa-se que a taxa de crescimento foi relativamente boa, e ao final de 72 horas de crescimento, obteve-se o melhor resultado com $23,43 \text{ g.L}^{-1}$ de massa seca.

Os resultados colaboram com o a otimização em frascos utilizando o delineamento composto central em que houve a adição de sulfato de amônia, onde houve melhora no crescimento da levedura. Isto se deve provavelmente por este sal auxiliar na tolerância de pressões osmóticas causadas pelo glicerol associado ao extrato de levedura, ou por ser uma fonte rápida de assimilação de nitrogênio, em comparação ao extrato de levedura.

5.3 Otimização da Produção de Citrato

Após a determinação do meio de crescimento, passou-se para avaliação e otimização na produção de ácido cítrico. Optou-se por realizar o planejamento experimental em frascos comuns de 300mL, pois, de acordo com os ensaios realizados anteriormente na escolha da cepa, verificou-se a formação de muita espuma, e a revolução no meio ocasiona respingos molhando a tampa de algodão. Desta forma, houve muita diferença nas réplicas, o que impossibilita o seu uso para o planejamento experimental.

Nesta etapa de produção, buscou-se verificar a produção com as variáveis glicerol e sulfato de magnésio, utilizando um planejamento experimental com três níveis pra cada variável. Desta forma, foi gerado um total de nove experimentos, realizados em réplicas, e com quatro repetições do ponto central. Os níveis utilizados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores reais das variáveis usadas no delineamento composto central do primeiro planejamento para produção.

	-1	0	1
Glicerol	25	75	125
MgSO₄	0,2	0,8	1,4

As tabelas dos experimentos realizados com os valores codificados e os resultados, assim como a análises de regressão múltipla para este planejamento experimental encontram-se no Anexo 4. Os níveis de ácido cítrico e isocítrico não foram satisfatórios. Foram produzidas grandes quantidades de ácido isocítrico, enquanto que foram produzidas baixas quantidades de ácido cítrico, conforme pode ser verificado na figura 16.

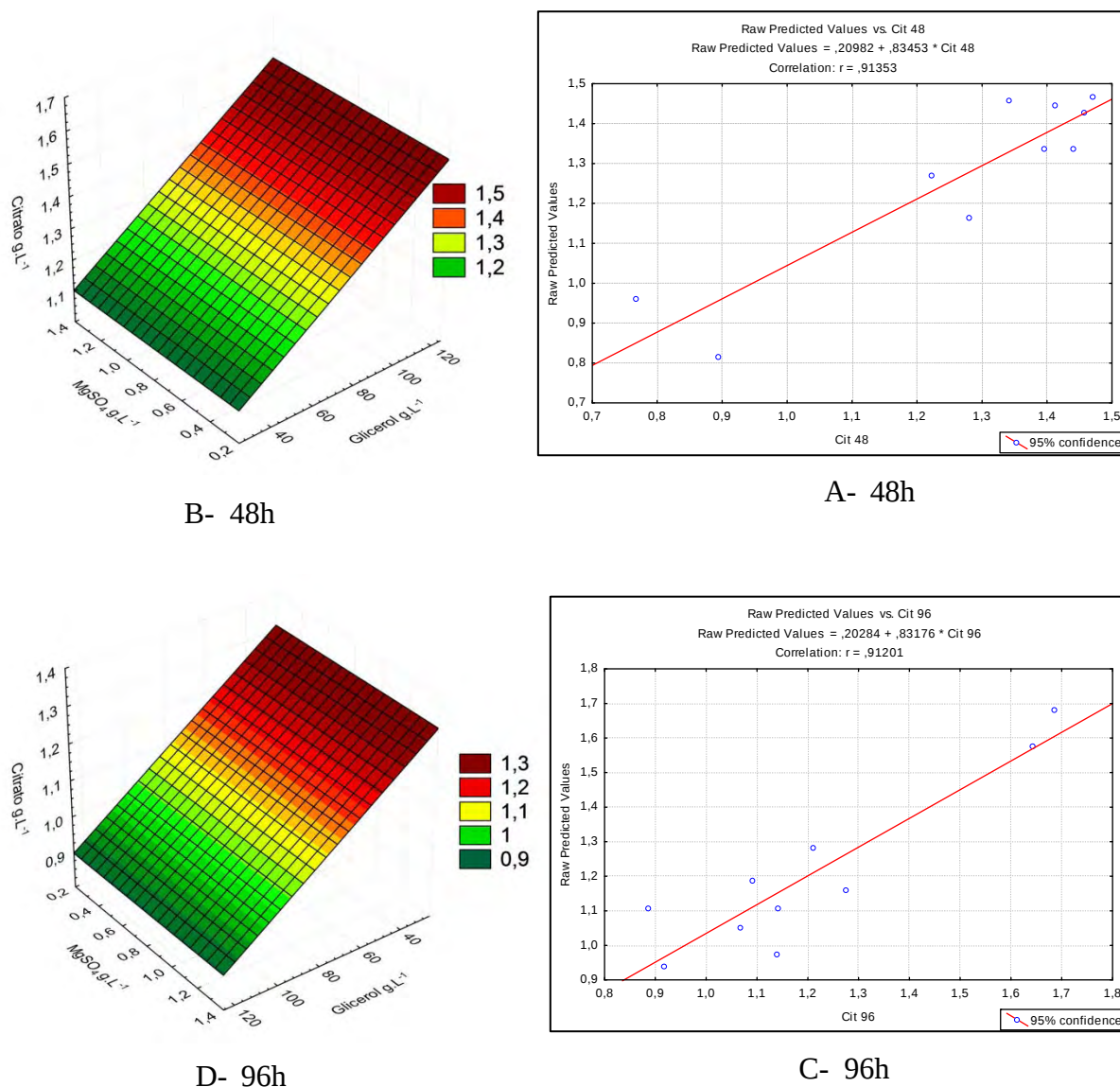


Figura 16 – Superfícies de resposta e Valores Experimentais X Valores Preditos da produção de citrato em frascos utilizando Glicerol e MgSO₄ nos tempos de 48 e 96 horas.

A análise estatística revelou que para estas condições de cultivo o MgSO₄ não houve influência significativa na produção de ácido cítrico, somente houve influencia significativa a quantidade de fonte de carbono no meio de cultura. Houve uma melhor produção de citrato nas primeiras 48 horas de fermentação. No entanto, após 96 horas de cultivo, houve uma inversão na produção, onde ocorreu a redução do citrato no meio com maior fonte de carbono, e uma maior produção no meio que possuía menor fonte de carbono. Apesar do baixo resultado, pode-se observar que houve correlação estatística entre os resultados apresentados, onde o r^2 foi superior a 0,9, havendo uma aproximação dos valores experimentais com os

valores calculados. Mas após 144 horas de cultivo, não foi encontrada correlação estatística na produção de ácido cítrico. Os dados deram origem a uma cinética de produção, onde pode ser avaliada a produção individual de cada experimento do planejamento. As médias obtidas nos experimentos de produção de ácido cítrico neste planejamento podem ser observadas na figura 17.

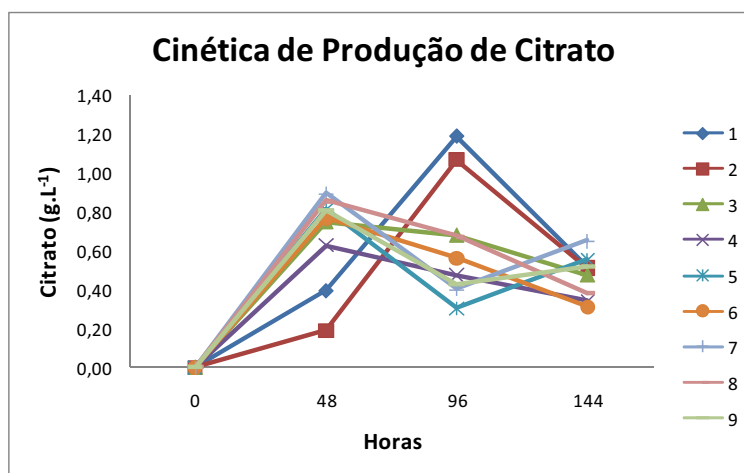


Figura 17 – Cinética de produção de ácido cítrico no planejamento experimental utilizando Glicerol e MgSO_4 .

Pode-se observar que houve uma melhor produção de ácido cítrico nas primeiras 48 horas, exceto pelos experimentos um e dois, que produziram uma maior quantidade de ácido em 96 horas, enquanto que houve queda na quantidade de ácido cítrico nos demais nesse mesmo tempo.

Foi avaliada também a produção do ácido isocítrico, que apesar de seu baixo valor de mercado, é de suma importância sua avaliação, uma vez que a levedura produz esses dois isômeros. Os dados relevantes a formação do ácido isocítrico encontram-se na figura 18.

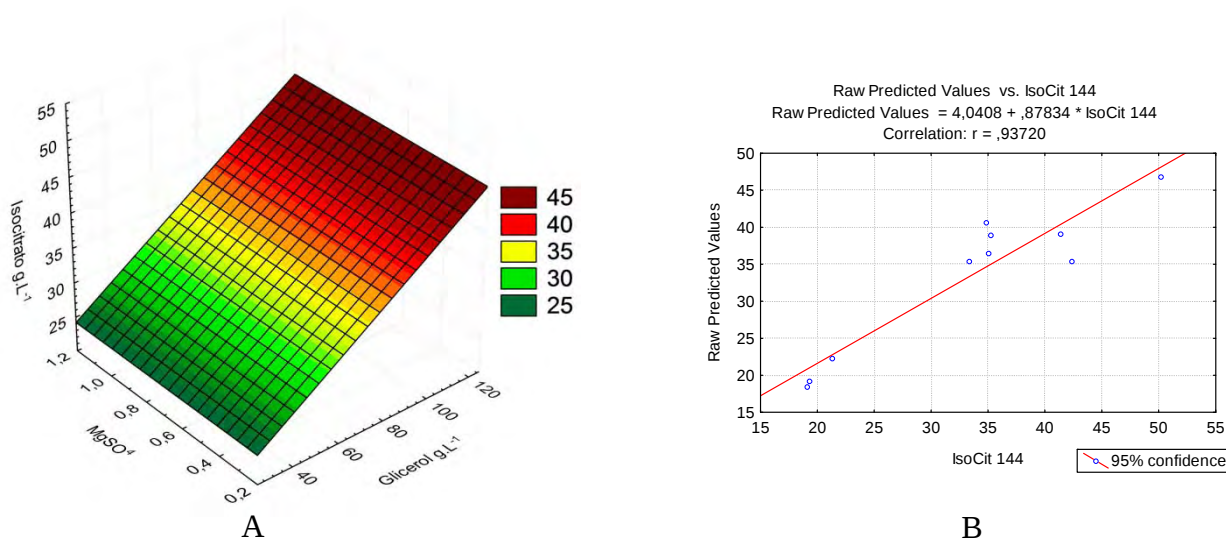


Figura 18 – Superfície de resposta (A) e Valores Experimentais X Valores Preditos (B) da produção de ácido isocítrico no planejamento experimental com Glicerol e MgSO₄ no tempo de 144 horas.

Pode-se observar que a produção de ácido isocítrico superou a quantidade de ácido cítrico, chegando a 50,225 g.L⁻¹. Isto significa que as condições para produção de ácido cítrico não foram satisfatórias. Mesmo assim, pode-se observar que o glicerol foi o único fator influenciando a produção de ácido isocítrico neste tempo, e que houve uma correlação estatística maior que 90%, onde os valores experimentais se aproximaram da linha de tendência dos valores preditos no tempo de 144h. Entretanto, não houve correlação estatística nos tempos anteriores de 48 e 96 horas de cultivo, podendo-se notar que o fator tempo foi importante na produção de citrato e de isocitrato.

Foi realizada também a cinética de produção de isocitrato, como pode ser verificado a produção de isocitrato em cada experimento na figura 19.

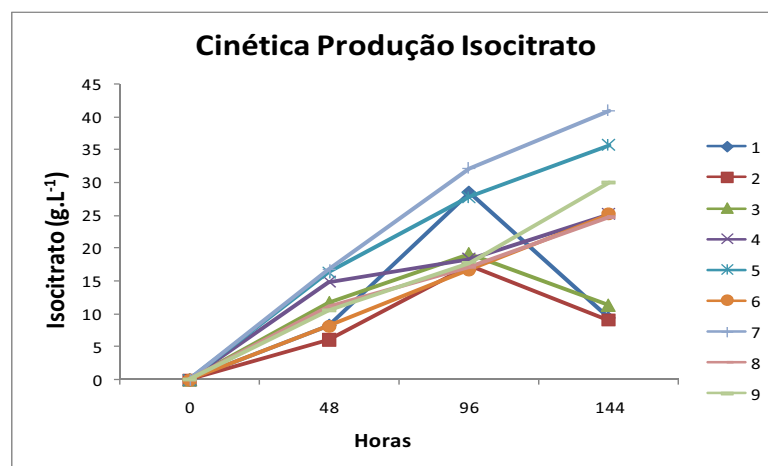


Figura 19 – Cinética de produção de ácido isocítrico no planejamento experimental utilizando Glicerol e MgSO₄.

Como se pode observar, houve uma produção quase contínua de isocitrato durante todos os tempos.

Desta forma, não foi possível otimizar a produção de ácido cítrico utilizando estas condições de cultivo.

Foi realizado um segundo planejamento experimental utilizando frascos, desta vez com quatro variáveis e cinco níveis. Os valores decodificados e os níveis utilizados podem ser verificados na tabela 12.

Tabela 12 – Valores reais (g.L⁻¹) das variáveis usadas no delineamento composto central do segundo planejamento para produção.

	Níveis				
	-2	-1	0	1	2
Glicerol	50	75	100	125	150
KH₂PO₄	0	0,25	0,5	0,75	1
MgSO₄	0	0,5	1	1,5	2
Tiamina	2x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁴	6x10 ⁻⁴	8x10 ⁻⁴	10x10 ⁻⁴

Neste planejamento não houve correlação estatística entre as variáveis. Mesmo assim houve grande produção de ácido isocítrico e pouca produção de ácido cítrico. Apesar de não haver significância estatística, a cinética dos experimentos estão apresentados na figura 20.

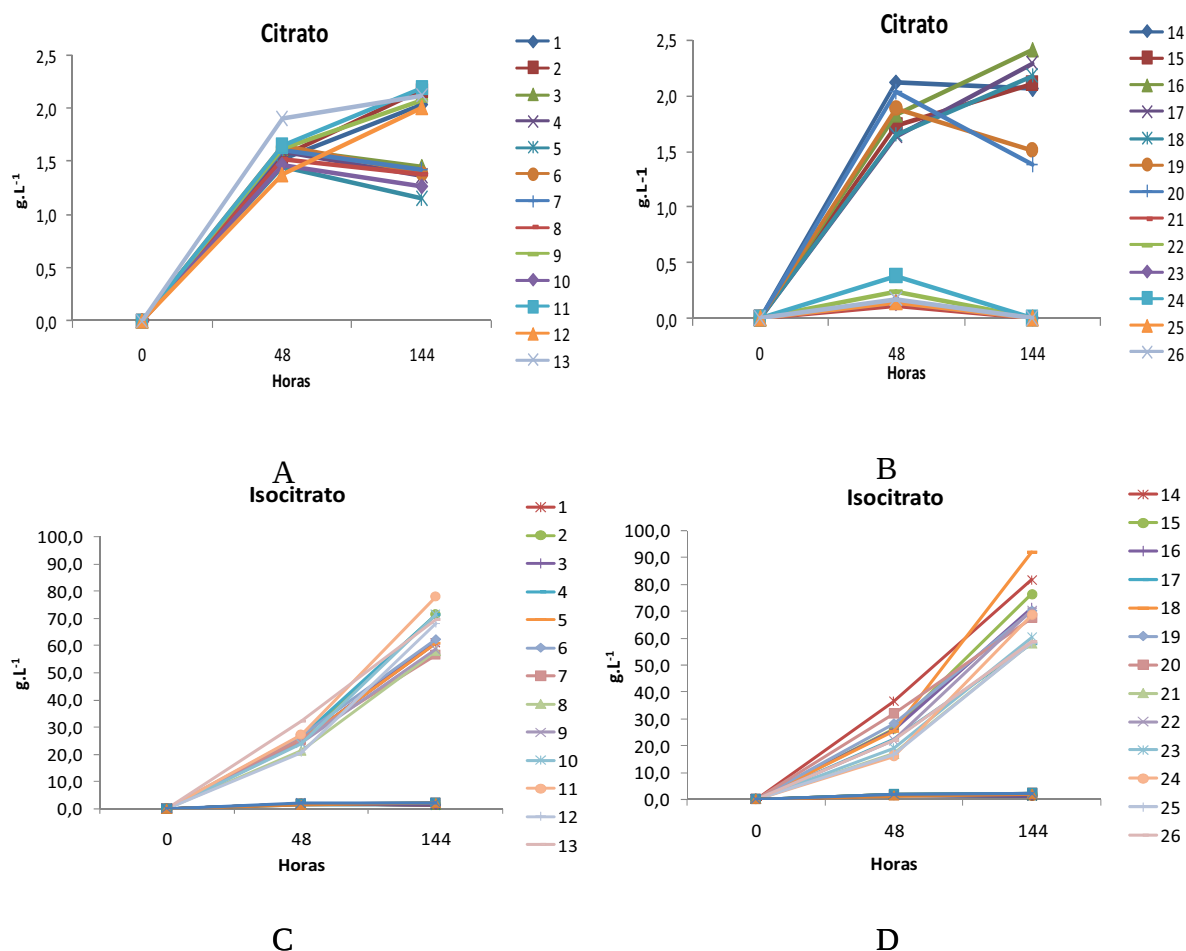


Figura 20 – Cinética de produção de citrato (A e B) e isocitrato (C e D) do planejamento experimental com as variáveis glicerol, KH_2PO_4 , MgSO_4 e Tiamina.

As tabelas dos experimentos realizados com os valores codificados e os resultados encontram-se no Anexo 5. Na maioria dos frascos, pode-se observar que não houve uma grande produção de ácido cítrico ($2,48 \text{ g.L}^{-1}$). Em contrapartida, a síntese de ácido isocítrico não foi prejudicada.

Papanikolaou *et al.* (2008) utilizaram em seus experimentos frascos cônicos com capacidade de 300mL e 50mL de volume de trabalho, e conseguiram, a partir da água de maceração de azeitona adicionado de glicose, produzir $28,9 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido cítrico, utilizando a cepa de *Y. lipolytica* LGAM(7)1.

Levinson *et al.* (2007) utilizaram 40 g.L^{-1} de glicerol e variaram a relação de carbono/nitrogênio para observar a produção de citrato e isocitrato. Os resultados sugeriram que uma razão de C/N entre 343 e 686 oferece uma maior produção de citrato, além de

favorecer uma melhor relação citrato/isocitrato, maior que 9.0, e que a taxa de conversão é diminuída em C/N maiores que 172.

Ribeiro *et al.* (2009) utilizando *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, realizaram dois planejamentos experimentais 2k-1, variando as concentrações de carbono e nitrogênio. O meio mineral era composto de KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. No primeiro planejamento (k=4) utilizaram duas concentrações de glicerol em 40 e 200 g/l, extrato de levedura na concentração de 0,5 e 10 g/l, sulfato de amônia na concentração de 0 e 10 g/l e agitação a 160 rpm e 250 rpm. Encontrou o melhor resultado (0,55 g.L⁻¹ de citrato) utilizando concentrações de 200 g.L⁻¹ de glicerol, 0,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, sem adição de sulfato de amônia, e agitação de 250rpm. No segundo planejamento (k=2) variaram glicerol em 150 g/l e 250 g/l e extrato de levedura na concentração de 0,1 e 0,9 g/l e obteve os melhores resultados (custo-benefício) em 45h de processo usando 150 g.L⁻¹ de glicerol e fonte de nitrogênio limitante.

Costa (2000) utilizando planejamento experimental verificou a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica* NRRL Y 1095, otimizando o meio de cultura com frascos aletados de 500mL de capacidade, onde observou que os sais KH_2PO_4 , MgSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 assim como a tiamina não tiveram efeito significativo sobre o crescimento celular e na produção de ácido cítrico, indicando que a quantidade presente no extrato de levedura é suficiente para suprir as necessidades da levedura. Destes, somente a glicose mostrou-se significativa, tendo sua concentração fixada em 75 g.L⁻¹, chegando a um máximo de 26 g.L⁻¹ de ácido cítrico sintetizado, mas com um rendimento abaixo dos 50%.

Com relação aos resultados obtidos neste trabalho, uma das possibilidades para as baixas produções de citrato poderia ser a fonte de carbono escolhida, onde o glicerol não seria uma boa fonte de carbono para o microrganismo, a relação carbono/nitrogênio ou o microrganismo escolhido não responder bem nas condições de cultivo.

Por outro lado, existem novas descobertas com relação a ácido isocítrico, cuja importância era meramente analítica e acadêmica. Este pode ser purificado e separado do ácido cítrico quando transformado em trimetil-ester de ácido isocítrico, que permanece na forma líquida, enquanto que o trimetil-ester de ácido cítrico precipita na forma cristalina. Separados, trimetil-ester de ácido isocítrico pode funcionar como bloco de construção quiral de outras moléculas de alto valor agregado, de interesse para indústria farmacêutica, como o 1,8-diazabicycloundec-7-eno. (HERETSCH, 2008).

A levedura *Yarrowia lipolytica* é uma das leveduras com potencial para produção também de grandes quantidades de ácido isocítrico, e de outros ácidos orgânicos que podem

servir na síntese mais fácil de outras moléculas na chamada “química verde” (HERETSCH, 2008; SAUER, 2008). Além disso, o isocitrato também é matéria prima para fabricação de medicamentos para trombose e anemia. Também o α -cetoglutarato, outro metabólito sintetizado por *Yarrowia lipolytica* em grande quantidade é fonte de matéria prima para fabricação de fármacos, poliéster, polióis, poliamidas, plastificantes e inibidores de corrosão (FINOGENOVA *et al.* 2005).

A produção de ácido cítrico é estimulada por um aumento na aeração em fermentação submersa. Kamzolova et al. (2003) destacam que a falta de oxigenação no meio de cultura pode levar a altas proporções na formação de isocitrato. O efeito na produção de ácido cítrico quando se interrompe a aeração depende da fase na qual a aeração foi interrompida e também da duração da interrupção.

Rymowicz *et al.* (2006), visando a síntese de citrato, utilizaram em seus experimentos frascos de 300mL com um volume de trabalho de 50mL, 30°C durante 72h de fase de produção, adicionado de 200 g.L⁻¹ de glicerol, 3.0 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 0,2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1,0 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e 1.0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, e selecionou a melhor cepa produtora, *Yarrowia lipolytica* 1.31. Em fermentador fixou a taxa de aeração em 0,2min⁻¹, 600rpm de agitação, pH 5,5 controlado com NaOH, atingiu um máximo de 124,5 g.L⁻¹ de citrato produzido pela cepa 1.31, equivalente a uma produtividade de 0,62g/g.

Optou-se por fazer a otimização utilizando reator, cuja aeração e a agitação, assim como o pH e espuma podem ser controlados com maior precisão. O resultado das seis fermentações, onde foram variados o vvm (volume de ar em relação ao volume de meio por minuto) e a agitação (RPM) podem ser observados na figura 21.

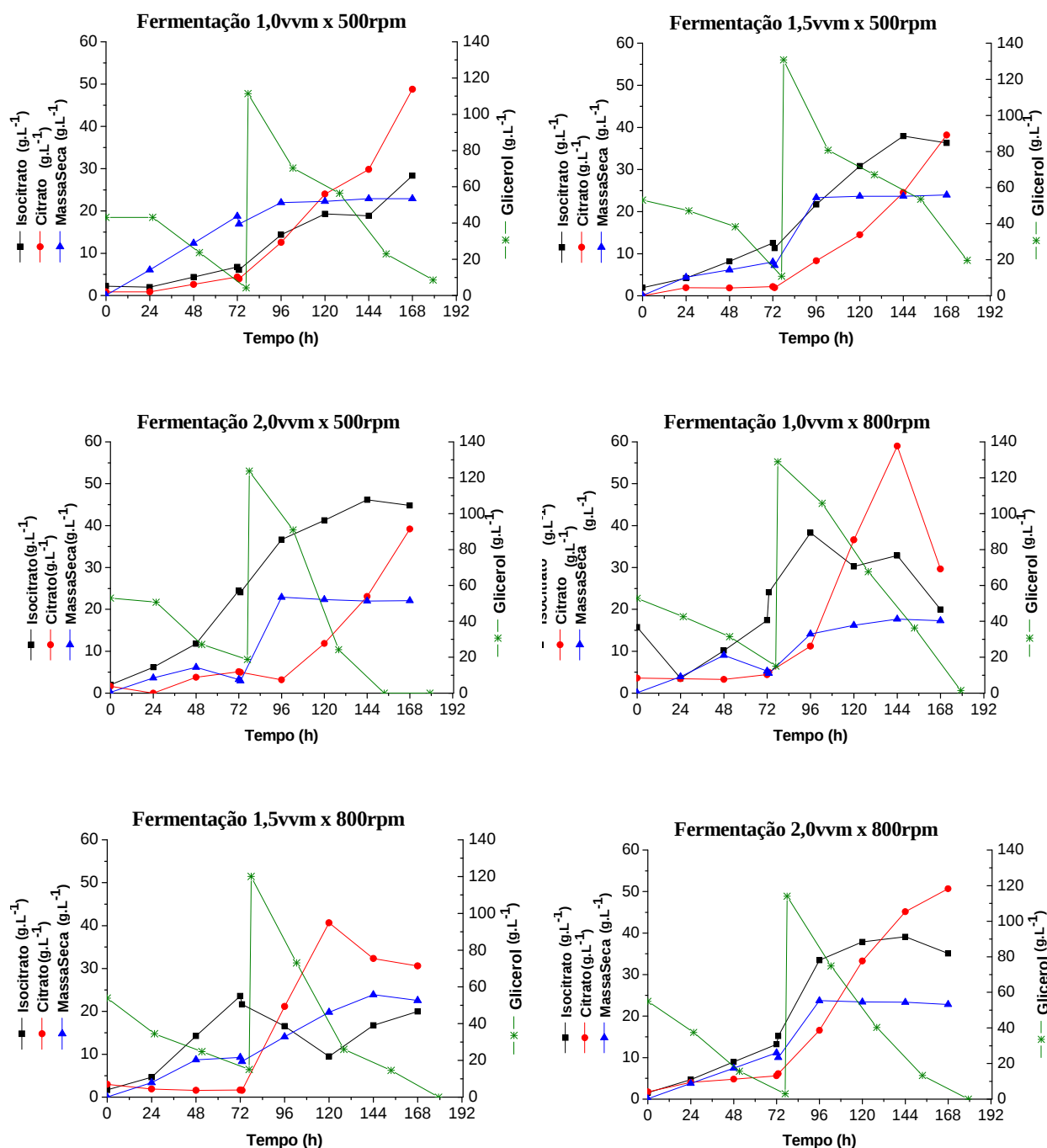


Figura 21 – Cinética de fermentação realizada em reator com diferentes níveis de aeração e agitação, utilizando 28° C, pH mantido em 5,5, fase de crescimento de 72 h usando meio de crescimento otimizado; e fase de produção adicionando meio de produção concentrado (glicerol 100 g.L^{-1} , CaCl_2 0,15 g.L^{-1} , MgSO_4 0,4 g.L^{-1} , e KH_2PO_4 0,1 g.L^{-1}).

Foi observado uma maior produção de ácido cítrico em relação aos experimentos em frascos, comprovando a necessidade de um experimento mais controlado em relação à aeração e a agitação, assim como controle de espuma e pH.

Com relação a biomassa, pode-se observar que houve uma estabilidade no crescimento entre 48 e 72 horas de cultivo na maioria dos experimentos, mas após a adição do meio de crescimento, a levedura continua a crescer estabilizando em cerca de 22 g.L^{-1} de biomassa seca. Vários fatores podem ter influenciado nesse resultado. Logo no começo do processo de fermentação, há formação de espuma, e esta, mesmo controlada, leva o acúmulo de biomassa na parede do vaso, e desta forma, interfere no crescimento no meio de cultura. Outro fator importante é a concentração de glicerol no meio de cultura, que mesmo sobrando no meio de cultura, ao chegar a determinada concentração, a célula para de absorvê-lo. Conforme citado anteriormente, o glicerol é interiorizado principalmente por transporte passivo para o interior da célula (PASTERIS e SAAD, 2008), e este chegando ao equilíbrio osmótico para de ser assimilado. Isto indica que a levedura necessita de uma maior quantidade de glicerol para o seu crescimento, mesmo que isto signifique sobras no meio de cultura após a fase de crescimento.

O melhor resultado para produção de citrato foi obtido pela fermentação de número quatro, utilizando 1,0vvm e 800rpm no tempo de 144h, chegou a 59 g.L^{-1} de ácido cítrico. Em segundo, obteve-se da sexta fermentação, com 2vvm e 800rpm, $45,13 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido cítrico. Todavia, obteve-se uma melhor relação de citrato:isocitrato (2:1) na fermentação com menor aeração, 1,0vvm a 800rpm. As outras fermentações não apresentaram uma grande quantidade de ácido produzido, sendo que nas fermentações 2 (1,5vvm x 500rpm) e 3 (2,0vvm x 500rpm), pode ser observado comparando as seis fermentações no mesmo tempo pela figura 22.

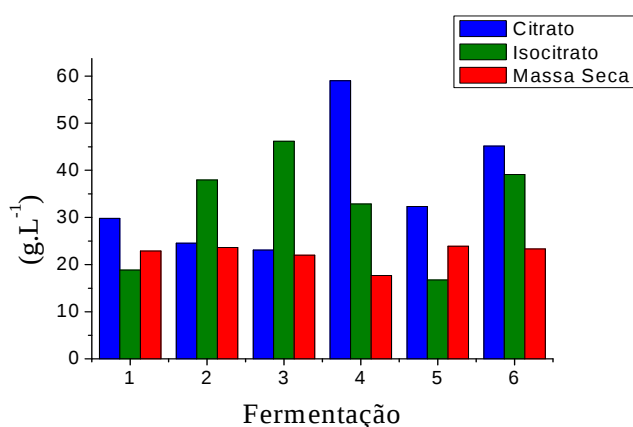


Figura 22 – Fermentação no tempo 144 horas conforme os seis experimentos realizados (1 – 1,0 vvm x 500 rpm; 2 - 1,5 vvm x 500 rpm; 3 - 3,0 vvm x 500 rpm; 4 - 1,0 vvm x 800 rpm; 5 - 1,5 vvm x 800 rpm; 6 - 2,0 vvm x 800 rpm), utilizando 28° C, pH mantido em 5,5, fase de crescimento de 72 h usando meio de crescimento otimizado; e fase de produção adicionando meio de produção concentrado.

No tempo 168 horas houve aumento da produção de citrato nas fermentações 1, 2 e 3, assim como na fermentação de número seis que obteve o segundo melhor resultado, conforme apresentado na figura 23.

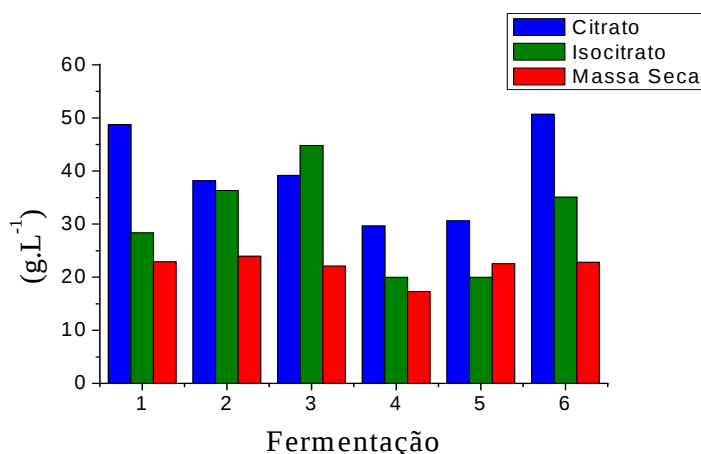


Figura 23 – Fermentação no tempo 168 horas conforme os seis experimentos realizados (1 – 1,0 vvm x 500 rpm; 2 - 1,5 vvm x 500 rpm; 3 - 3,0 vvm x 500 rpm; 4 - 1,0 vvm x 800 rpm; 5 - 1,5 vvm x 800 rpm; 6 - 2,0 vvm x 800 rpm) utilizando 28° C, pH mantido em 5,5, fase de crescimento de 72 h usando meio de crescimento otimizado; e fase de produção adicionando meio de produção concentrado.

A utilização de 1,0vvm e 800rpm apresentou, além da maior produção e relação citrato:isocitrato, um tempo de fermentação mais curto. Observa-se também que houve aumento nas primeiras três fermentações usando 500rpm no tempo de 168h, mas houve uma produção de isocitrato relativamente alta. Isto pode ser explicado pela baixa rotação não fornecer a transferência de oxigênio para o meio de cultura eficientemente, retardando a síntese de ácido cítrico. A utilização de grandes volumes de aeração também pode ter atrapalhado a produção devido ao aumento da espuma no reator, exigindo maiores quantidades de anti-espumante.

Desta forma, pode-se verificar que uma agitação maior foi benéfica na produção de ácido cítrico, mas condições ótimas de aeração e agitação devem ser determinados uma vez que agitação muito intensa pode causar estresse físico na célula e diminuir a interação com célula-substrato. Além disso, agitações muito altas podem causar maiores custos de projeto, construção de reatores em escala industrial e maiores custos energéticos para a produção (CROLLA; KENNEDY, 2004). Armiliato (2004) ressalta que os fatores agitação e aeração independentes não influenciam na produção de biomassa, ácido cítrico e isocítrico, sendo

mais influente a saturação de oxigênio (pO₂) no meio de cultivo. A concentração de oxigênio dissolvido, e os dados referentes a estas fermentações encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 – Concentração de oxigênio dissolvido nas fermentações realizadas em reator, em diferentes tempos.

	0h	72h	96h	144h
1 – 1,0vvm x 500rpm	100%	45%	0%	0%
2 – 1,5vvm x 500rpm	98,1%	44%	0%	0%
3 – 2,0vvm x 500rpm	99,4%	52%	0%	0%
4 – 1,0vvm x 800rpm	100%	92%	79,4%	88,3%
5 – 1,5vvm x 800rpm	99,6%	96,6%	83,6%	82,4%
6 – 2,0vvm x 800rpm	97,2%	96,6%	83,2%	81,4%

Utilizando uma agitação de 500rpm foi possível verificar que a levedura consumia todo o oxigênio, e devido à grande quantidade de biomassa, este não ficava disponível no meio de cultivo. Isto pode justificar o fato a produção de uma grande quantidade de ácido isocítrico em relação ao ácido cítrico nas fermentações que utilizaram essa agitação. Contudo, a utilização da agitação em 800rpm resultou em maior quantidade de oxigênio dissolvido disponível, o que explica a quantidade maior de ácido cítrico produzido e uma maior relação de citrato:isocitrato.

O aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura aumenta significativamente a produção de ácido cítrico utilizando *A. niger*. Experimentos em batelada alimentada revelaram que o aumento de oxigênio dissolvido de 25% para 75% resultaram num aumento na produtividade de 99 para 324mg/(g de células x h) enquanto o total de citrato produzido subiu de 41% para 60% (KAMZOLOVA et al. 2003). O aumento na concentração de oxigênio dissolvido, de 20 para 80% de saturação na fermentação de *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 em fermentador com reciclo de células, provoca um aumento da produtividade volumétrica e também um aumento na relação ácido cítrico:isocítrico (RANE & SIMS, 1995). Armiliato (2004) também chegou a mesma conclusão, observando que concentrações de oxigênio dissolvido acima de 70% resultam em uma maior produção de ácido cítrico, e uma menor produção de isocítrico, enquanto que concentrações de 50-60% apresentaram uma produção maior de ácido isocítrico do que ácido cítrico.

Crolla e Kennedy (2004), em fermentação de *Y. lipolytica* NRRL Y-1095, utilizaram quatro diferentes velocidades de agitação, 400, 800, 1000 e 1200rpm, na síntese de ácido cítrico a partir de n-parafinas. Utilizando aeração fixa de 1,0vvm e uma alimentação contínua de fonte de carbono a uma taxa fixa de um litro por dia após 96h de cultivo, determinou como a agitação influencia na formação de biomassa e síntese de ácido cítrico. Com relação a biomassa, observou que mesmo após o término da fase de crescimento exponencial, a biomassa continuou aumentando até ao final da fermentação. Além disso, observou que houve pequena diferença entre as quatro agitações usadas com relação a biomassa total, sendo que o maior impacto foi a queda de produtividade do crescimento celular com as velocidades de 1000 e 1200rpm, o que pode ser causado pela falta de interação física da célula com o substrato, assim como ter gerado maior gasto energético celular para suportar o estresse mecânico. Com relação a produção de ácido cítrico, os resultados foram os melhores utilizando uma agitação entre 800 e 1000rpm, sendo que a melhor produtividade ($0,41\text{g}_{\text{citrato}}/\text{g}_{\text{n-parafina}}$) foi obtida utilizando 800rpm de agitação.

Utilizando a cepa *Yarrowia lipolytica* N1, que apresenta como característica especial produzir somente citrato na fermentação de vários substratos, sendo o isocitrato produzido irrisório quando as condições de limitação de nitrogênio, Kamzolova et al. (2003) estudou o efeito de duas diferentes concentrações de ferro disponível no meio de cultura ($0,7\text{mg L}^{-1}$ e $3,5\text{mg L}^{-1}$) e três diferentes níveis de oxigênio dissolvido, 5, 20 e 60%. Na fase de produção de ácido cítrico, usando baixa concentração de ferro e baixa saturação de oxigênio, a produção de citrato obtido foi zero. Elevando a concentração de oxigênio dissolvido, para 60%, e mantendo baixa a concentração de ferro, obteve-se um total de citrato de $18,2\text{ g.L}^{-1}$. Contudo a utilização de uma concentração de ferro elevada, o pico de produção de ácido cítrico foi elevado utilizando-se apenas 20% de saturação de oxigênio. Isto indica que usando baixas concentrações de oxigênio e de ferro, o suprimento energético é limitado, sendo possível reverter esse processo aumentando a concentração de ferro, utilizando relativamente baixas concentrações de oxigênio dissolvido (KAMZOLOVA et al. 2003). Contudo, o aumento da concentração dos íons de ferro em outras cepas pode resultar num acúmulo de isocitrato, pois Kamzolova et al. (2003) ressalta no começo de seu estudo a especialidade da estirpe *Y. lipolytica* NI de produzir somente citrato.

Antonucci et al. (2001) numa fermentação em batelada com adição de dois meios de produção conseguiram na primeira adição de meio (150 g.L^{-1} de glicose) uma produção de 35 g.L^{-1} de ácido cítrico e 8 g.L^{-1} de ácido isocítrico; na segunda adição (100 g.L^{-1} de glicose) a

produção total de ácido cítrico chegou a 60 g.L^{-1} e a produção de ácido isocítrico chegou a 10 g.L^{-1} utilizando uma cepa de cujo coeficiente de rendimento para o ácido cítrico foi de 0,384.

Anastassiadis e Rehm. (2006) utilizando uma cepa de *Candida oleophila* ATCC 20177 em fermentador com volume útil de 600 mL e agitação magnética conseguiram, para um meio de produção com 209 g.L^{-1} de glicose, uma produção de $79,1 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido cítrico uma relação cítrico:isocítrico de 29,3 e um rendimento aproximado de 0,38.

6. CONCLUSÕES

Dos microrganismos estudados, as cepas de *Y. lipolytica* são as mais promissoras para fins biotecnológicos, na produção de ácido cítrico.

O melhor resultado foi proporcionado pela cepa *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 em fermentação realizada em frascos aletados. Com esta cepa, houve uma produção de 30 g.L^{-1} de citrato com a fermentação em duas etapas, trofofase com 75 g.L^{-1} de glicerol e idiofase, com 100 g.L^{-1} .

O meio de crescimento selecionado foi: $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol, $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,65 \text{ mg.L}^{-1}$ de FeCl_3 , $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de ZnSO_4 , $0,31 \text{ mg.L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $0,27 \text{ mg.L}^{-1}$ de MnSO_4 .

Foi verificado que o glicerol foi o fator mais importante na fermentação em frascos, tanto na produção de ácido cítrico quanto isocítrico.

A utilização de frascos comuns não favoreceu o acúmulo de citrato devido à limitação na transferência de oxigênio para o meio de cultura. Desta forma, não foi possível fazer otimização do meio de produção em frascos.

A produção em reator produziu maiores quantidades de citrato. Utilizando uma aeração de $1,0 \text{ vvm}$ e 800 rpm foi possível produzir 59 g.L^{-1} de ácido cítrico e 29 g.L^{-1} de ácido isocítrico, obtendo uma relação 2:1.

A utilização do glicerol para fermentação de ácido cítrico utilizando *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 pode ser uma alternativa rentável, sendo recomendados maiores estudos para otimizar o meio de produção para aumentar a produção e a relação citrato:isocitrato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARILLA, E.C. Microorganismos responsables de alteraciones em alimentos altamente azucarados. Tese de doutorado. Universidade Complutense de Madrid. 1999. Disponível em: <www.ucm.es/BUCM/tesis/19972000/X/3/X3049601.pdf> Acesso em: 25 fev. 2008.
- ALMEIDA, M. M. T.; PINTO, G. A. S. Utilização do glicerol para a produção de biomassa por fermentação submersa de *Rhodoturula glutinis*. **VII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, UFSCar, São Carlos**, 2007. Disponível em: <http://www.ufscar.br/cobeqic07/pdf/poster_iii/piii40.pdf> Acesso em 25 fev. 2008.
- ANASTASSIADIS, S.; REHM; H.J. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation. **Electronic Journal of Biotechnology**. Vol.9 No.1, 2006.
- ANTONUCCI, S.; BRAVI, M.; BUBBICO, R.; DI MICHELE, A. e VERDONE, N. Seletivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 28, p. 189–195, 2001.
- ARANTES, J. K.; ARMILIATO, L.; RODRIGUES, M. I. Efeito da agitação e da aeração na produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* y 1095. **IX Congresso interno de iniciação científica da UNICAMP**. 2001.
- ARMILIATO, L. Produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* NRRL-Y1095. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. p. 88, 2004
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, N°26, 2007. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm>> Acesso em 25 fev. 2008.
- ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. **Biomacromolecules**, Washington, v. 6, p. 2106-2112, 2005.
- BEROVIC, M.; LEGISA, M. Biotechnology Annual Review Volume 13. **Biotechnology Annual Review**. Vol. 13, p. 303-343, 2007.
- BIEBL, H.; ZENG, A.-P.; MENZEL, K.; DECKWER, W.-D. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 50, p. 24-29, 1998.
- BRASIL. Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. DOU de 14 de janeiro de 2005.
- BULHÕES, R. O Biodiesel e sua relação com a incorporação de novas áreas e produção de soja no Paraná. **Encontro de Economia Paranaense, V**. Curitiba, PR. Brasil, 2007. Disponível em: http://www.ecopar.ufpr.br/artigos/a4_070.pdf. Acesso em 28 de Fevereiro de 2010.

CABELLO, C.; LEONEL, M. P. Produção de ácido cítrico a partir de manipueira. In: CEREDA, M.P. **Resíduos da industrialização da Mandioca**. Cap. 6 p 109-118. São Paulo: Ed. Paulicéia, 1994.

CÁRDENAS, P.; PULIDO, C.; ARAGÓN, Ó. L.; ARISTIZÁBAL, F. A.; ROCÍO, S. Z.; MONTOYA, D. Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium* sp. mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiésel. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**. Vol. 35, p. 120-137, 2006.

CARVALHO, G.D. A indústria dos hidrocarbonetos no Brasil: o problema com o caso gasoduto Bolívia- Brasil e a solução com os combustíveis renováveis. **Papel Político Bogotá (Colombia)**. Vol. 11, . pp. 739-760, 2006.

CHENG, K.; LIU, D.; SUN, Y.; LIU, W. 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. **Biotechnology Letters**. vol. 26, p. 911-915, 2004.

CHURCH JR, F. C.; MEYERS, S. P. Alpha-Galactosidase from *Pichia guilliermondii*. **Mycologia**, Vol. 72, p. 279-287, 1980.

CLARET, C; SALMON, J.M.; ROMIEU, C. BORIES, A. Physiology of Glucanobacter oxydans during dihydroxyacetona production from glycerol. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 41, p. 359-365, 1994.

COSTA, F. A.A. Estudo da otimização do meio de cultura para produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica*. Tese de Doutorado. **Universidade Estadual de Campinas**. 2000.

CROLLA A.; KENNEDY, K.J. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using *n*-paraffin. **Journal of Biotechnology**. Vol. 89, p. 27–40, 2001.

CROLLA, A.; KENNEDY, K. J. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on *n*-paraffins. **Journal of Biotechnology**. Vol. 110. p. 73-84, 2004.

DECKWER, W. D.. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol. **FEMS Microbiology Reviews**. Vol. 16, p.143-149, 1995.

DEMIRBAS, M.; BALAT, M. Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: A global perspective. **Energy Conversion and Management**. Vol. 47, p. 2371-2381, 2006.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and bioengineering**. Vol. 94, nº5, p. 821-829, 2006.

FARIA, R. C. M.; REZENDE, M. J. C.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel:diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas **Química Nova**, Vol. 30, No. 8, p. 1900-1905, 2007.

FARIA, R.C.; REZENDE, M.J.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**. Vol. 30, p. 1900-1905, 2007.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, Vol. 28, no. 1, p. 19-23, 2005

FERREIRA, J.R.; CRISTO, C.M. O Futuro da Indústria: biodiesel. **Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior – MDIC Instituto Euvaldo Lodi – IEL/Núcleo Central**. p. 145, 2006.

FINOGENOVA, T.V.; MORGUNOV, I.G.; KAMZOLOVA, S.V.; CHERNYAVSKAYA, O.G. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A review of prospects. *Applied Biochemistry and Microbiology*. Vol. 41, p. 418-425, 2005.

FISCHER, G.; SCHRATTENHOLZER, L. Global bioenergy potentials through 2050. **Biomass & Bioenergy, Pergamon**, Vol. 20, p. 151-159, mar., 2001.

FREDLUND, E.; BROBERG, A.; BOYSEN, M.E.; KENNE, L.; SCHNÜRER, J. Metabolite profiles of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121 grown under oxygen limitation. **Applied microbiology and biotechnology**. Vol. 64, p. 403-9, 2004.

GALDEANO-VILLEGAS, C.; SANTOS, V.; ZAZO, M.; GARCIA, J.; GARCIAOCHOA, F. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella oxytoca* NRTL B-199: Study of product inhibition. **Journal of Biotechnology**. Vol. 131, p. S102-S102, 2007.

GERIS, R.; SANTOS, N.A.; AMARAL, B.A.; MAIA, I.D.; CASTRO, V.D.; CARVALHO, J.R. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**. Vol. 30, p. 1369-1373, 2007.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; SOUCAILLE P.; VASCONCELOS, I. Microbial conversion of glycerol to 1,3-Propanediol: Physiological Comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an Engineered Strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5) **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 72, p. 96–101, 2006.

HÁJEK, M.; SKOPAL, F.; MACHEK, J. Determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Vol. 108, n.8, p. 666-669, 2006.

HAMISSA F.A.; ABOU-ZEID, A.Z; RADWAN, A.A. Influence of micronutrients on citric acid production by *Candida lipolytica* (Y 1095). **Zentralbl Bakteriell Naturwiss**, vol. 135, p. 332-338. 1980.

HERETSCH, P.; THOMAS, F.; AURICH, A.; KRAUTSCHEID, H.; SICKER, D.; GIANNIS, A. Syntheses with a chiral building block from the citric acid cycle: (2R,3S)-isocitric acid by fermentation of sunflower oil. **Angewandte Chemie (International edition in English)**. Vol. 47, p. 1958-60, 2008.

HOMANN, T.; TAG, C.; BIEBL, H.; DECKWER W.-D.; SCHINK, B. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Volume 33 Issue - 2, p. 121 – 126, 1990.

IL'CHENKO, A. P., O. G. CHERNYAVSKAYA, N. V. SHISHKANOVA, AND T. V. FINOGENOVA. Metabolism of *Yarrowia lipolytica* grown on ethanol under conditions promoting the production of α -ketoglutaric and citric acids: A comparative study of the central metabolism enzymes. **Microbiology**, Vol. 71, No. 3, p. 269–274, 2002.

IMANDI, S.B.; BANDARU, V.V.R.; SMALANKA, S.R.; GARAPATI, H.R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 40, p 1367-1372, 2007.

KAMZOLOVA, S.V.; SHISHKANOVA, N.V.; MORGUNOV, I.G.; FINOGENOVA, T.V. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*, **FEMS Yeast Research**, vol. 1528, p.1-6. 2003.

KUSDIYANTINI, E.; GAUDIN P.; GOMA, G.; BLANC, P., Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**. Vol. 20, No 10, p.929–934, 1998.

LEE, P.C.; LEE, W.G.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. **Biotechnology Bioengineering**. Vol. 72, p. 41-48, 2001.

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

LIMA, S.A. Desenvolvimento Rural Biodiesel: combustível sustentável? **Revista Brasileira de Agroecologia**. Vol. 2, p. 359-362, 2007.

MA, F; HANNA, M. A. Biodiesel production: A review. **Bioresource Technology**. Vol. 70, p. 1-15, 1999.

MCCOY, M. Glycerin surplus. **Chemical & Engineering News**. Vol.84, n.6 p.7, 2006.

MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D.-J.; WANG, W.; XIU, Z.-L. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnology Letters**. Vol. 28, p.1755–1759, 2006.

PACHAURI, N., HE, B. Value-added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production. **A Survey of Current Research Activities American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE)**, Paper No. 06622, 2006. Disponível em: <<http://www.webpages.uidaho.edu/~bhe/pdfs/asabe066223.pdf>> Acesso em 25 fev. 2008.

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

PAPANIKOLAOU, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M. A.; FAKAS S. A.; KOMAITIS, M. A.; AGGELIS, G. B. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. **Bioresource Technology**. Vol. 99, p. 2419–2428, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous. **Bioresource technology**. Vol. 82, p. 43-49, 2002.

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

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

PARENTE, E.J. Uma aventura tecnológica num país engraçado. **TECBio**. Fortaleza, CE. 2003. 68p. Disponível em: <www.iadb.org/intal/intalcdi/PE/2008/01430.pdf>. Acesso em 29 jan. 2010.

PASTERIS, S.E.; STRASSER DE SAAD, A.M. Transport of glycerol by *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine. **Food microbiology**. Vol. 25, p. 545-549, 2008.

RANE, K. D.; SIMS, K. A. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: Effect of nitrogen and biomass concentration on yield and productivity. **Biotechnology Letters**. Vol. 18, n.10, p.1139-1144, 1996.

RATHMANN, R.; BENEDETTI, O.; PLÁ, J.; PADULA, A. Biodiesel: uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira? **Seminário de Gestão de Negócios, II**. Curitiba – PR. Vol. 1, 2005.

RIBEIRO, R.R.; SILVA, L.V.; AMARAL, P.F.; COELHO, M.A. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO UTILIZANDO COMO SUBSTRATO GLICEROL POR *Yarrowia lipolytica*. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. 2009. Disponível em: <<http://www.ocs.ufu.br/index.php/cobeqic2009/cobeqic2009/paper/view/536>> Acesso em 04 out. 2009.

RYMOWICZ, W.; CIBIS, E. Optimization of citric acid production from glucose syrup by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**. Vol. 9, p. 1-12, 2006.

RYMOWICZ, W.; RYWIŃSKA, A.; GŁADKOWSKI, W. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratlavia K1. **Chemical Papers**. Vol. 62, p. 239-246, 2008.

RYWIŃSKA A.; WOJTATOWICZ M.; RYMOWICZ W. Citric acid biosynthesis by *Yarrowia lipolytica* a-101-1.31 under deficiency of various medium macrocomponents **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Biotechnology**, Vol. 9, 2006.

SAUER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in biotechnology**. Vol. 26, p. 100-8, 2008.

SCIOLI, C.; VOLLARO, L. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. **Water Research**. Vol31, p. 2520-2524. 1997.

SEGALL, S.; MALTA, G.; FERRAZ, V.; ARTZ, W.; PARREIRA, F. The biodiesel production using inexpensive tropical oils. In: **AOCS Annual Meeting & Expo, 97**. USA, 2006.

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

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A.A New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology and Biotechnology**. Vol. 44, p. 141-149, 2006.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 71, p.783–789, 2006.

STATSOFT, INC. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com. 2005.

SUH S.-O.; BLACKWELL, M. Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. **FEMS Yeast Research**. Vol. 5 p. 87–95, 2004

TANAKA, K.; KIMURA, K. YAMAGUCHI, K. Patente Japonesa nº 13677, 1968.

VOLLENWEIDER, S.; LACROIX, C. 3-Hydroxypropionaldehyde: Applications and Perspectives of Biotechnological Production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 64, p. 16-27, 2004.

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

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 18, p. 213–219, 2007.

ANEXO 1

Valores codificados e médias das respostas experimentais do planejamento experimental variando glicerol (X1), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X2) e extrato de levedura (X3) para o crescimento celular.

Exp.	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X1	X2X2	X3X3	Massa Seca g.L ⁻¹
1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	0,01
2	-1	-1	0	1	-0	-0	1	1	0	0,03
3	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	0,10
4	-1	0	-1	-0	1	-0	1	0	1	0,09
5	-1	0	0	-0	-0	0	1	0	0	0,09
6	-1	0	1	-0	-1	0	1	0	1	0,16
7	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	0,06
8	-1	1	0	-1	-0	0	1	1	0	0,07
9	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	0,24
10	0	-1	-1	-0	-0	1	0	1	1	0,02
11	0	-1	0	-0	0	-0	0	1	0	0,09
12	0	-1	1	-0	0	-1	0	1	1	0,18
13	0	0	-1	0	-0	-0	0	0	1	0,05
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,17
15	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0,17
16	0	1	-1	0	-0	-1	0	1	1	0,09
17	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0,22
18	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0,19
19	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	0,11
20	1	-1	0	-1	0	-0	1	1	0	0,24
21	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	0,43
22	1	0	-1	0	-1	-0	1	0	1	0,11
23	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0,39
24	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0,40
25	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	0,16
26	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0,36
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,37
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,17
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,16
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,17

Análises estatísticas dos fatores significantes do primeiro planejamento.

	Beta	Std.Err. of Beta	B	Std.Err. of B	t(21)	p-level
Intercept			0,129910	0,016200	8,019362	0,000000
X1	0,636115	0,076343	0,095446	0,011455	8,332382	0,000000
X2	0,196950	0,076343	0,029551	0,011455	2,579824	0,017470
X3	0,575857	0,076343	0,086404	0,011455	7,543060	0,000000
X1X3	0,220580	0,076343	0,040535	0,014029	2,889341	0,008774
X1^2	0,232185	0,076343	0,060341	0,019840	3,041356	0,006206

ANEXO 2

Valores codificados e médias das respostas experimentais (g.L^{-1}) do segundo planejamento experimental variando glicerol (X1) e extrato de levedura (X2) para o crescimento celular.

Exp.	X1	X2	X1X2	X1X1	X2X2	Massa Seca	Ext. Lev. Residual	Glicerol Residual
1	-1	-1	1	1	1	4,37	1,09	9,92
2	-1	0	-0	1	0	5,63	1,58	3,11
3	-1	1	-1	1	1	5,87	2,50	4,51
4	0	-1	-0	0	1	4,96	0,88	34,77
5	0	0	0	0	0	6,19	1,45	30,87
6	0	1	0	0	1	6,32	2,26	40,32
7	1	-1	-1	1	1	4,07	0,91	52,88
8	1	0	0	1	0	5,39	1,25	53,62
9	1	1	1	1	1	4,66	2,26	51,84
10	0	0	0	0	0	6,19	1,45	30,87
11	0	0	0	0	0	6,20	1,46	30,84

Análises estatísticas dos fatores significantes do segundo planejamento.

	Beta	Std.Err. of Beta	B	Std.Err. of B	t(3)	p-level
Intercept			6,286894	0,162364	38,72104	0,000038
X	-0,315318	0,095626	-0,293238	0,088930	-3,29739	0,045823
Y	0,619762	0,095626	0,576365	0,088930	6,48109	0,007456
X2	-0,513503	0,095626	-0,827134	0,154032	-5,36989	0,012643
Y2	-0,430640	0,095626	-0,693660	0,154032	-4,50336	0,020449

ANEXO 3

Valores codificados e médias das respostas experimentais (g.L^{-1}) do terceiro planejamento experimental variando glicerol (X1) e extrato de levedura (X2) e sulfato de amônio (X3) para o crescimento celular.

Exp.	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X1	X2X2	X3X3	Massa Seca g.L^{-1}
1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	2,95
2	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	3,82
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	4,25
4	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1	6,90
5	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	3,12
6	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	3,97
7	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	7,68
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7,97
9	-1,68	0	0	-0	-0	0	2,83	0	0	4,33
10	1,68	0	0	0	0	0	2,83	0	0	6,16
11	0	-1,68	0	-0	0	-0	0	2,83	0	2,82
12	0	1,68	0	0	0	0	0	2,83	0	8,11
13	0	0	-1,68	0	-0	-0	0	0	2,83	5,21
14	0	0	1,68	0	0	0	0	0	2,83	4,65
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,74
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,72
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,72
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,73

Análises estatísticas dos fatores significantes do terceiro planejamento.

	Beta	Std.Err. of Beta	B	Std.Err. of B	t(12)	p-level
Intercept			5,214910	0,168774	30,89886	0,000000
X1	0,310823	0,098340	0,577395	0,182679	3,16071	0,008210
X2	0,860770	0,098340	1,598992	0,182679	8,75301	0,000001
X1X2	0,215441	0,098340	0,522900	0,238682	2,19078	0,048939

ANEXO 4

Valores codificados e médias das respostas experimentais (g.L^{-1}) do quarto planejamento experimental variando glicerol (X1) e sulfato de magnésio (X2) para produção de citrato.

Exp.	X1	X2	X1X2	X1X1	X2X2	Citrato			Isocitrato		
						48 h	96 h	144 h	48 h	96 h	144 h
1	-1	-1	1	1	1	0,39	1,18	0,52	8,26	28,42	9,39
2	-1	0	-0	1	0	0,19	1,07	0,51	6,02	17,28	8,99
3	-1	1	-1	1	1	0,75	0,68	0,47	11,64	19,02	11,25
4	0	-1	-0	0	1	0,62	0,47	0,34	14,81	18,32	25,10
5	0	0	0	0	0	0,81	0,30	0,55	16,27	27,73	35,58
6	0	1	0	0	1	0,77	0,56	0,31	8,11	16,70	25,07
7	1	-1	-1	1	1	0,90	0,40	0,65	16,70	32,17	40,89
8	1	0	0	1	0	0,86	0,67	0,38	11,09	17,08	24,63
9	1	1	1	1	1	0,81	0,43	0,52	10,56	17,79	29,95
10	0	0	0	0	0	0,58	0,28	0,10	7,64	16,87	24,37

Análises estatísticas para produção de citrato no tempo 48 h.

	Beta	Std.Err. of Beta	B	Std.Err. of B	t(4)	p-level
Intercept			0,642308	0,092470	6,94612	0,002257
X1	0,742617	0,228985	0,204863	0,063169	3,24309	0,031582
X2	0,247602	0,228985	0,068305	0,063169	1,08130	0,340397
X1X2	-0,32808	0,228985	-0,11084	0,077366	-1,4327	0,225201
X1X1	-0,14919	0,232233	-0,06507	0,101296	-0,6424	0,555568
X2X2	0,244403	0,232233	0,106604	0,101296	1,05241	0,351987

Análises estatísticas para produção de isocitrato no tempo 96 h.

	Beta	Std.Err. of Beta	B	Std.Err. of B	t(4)	p-level
Intercept			0,412436	0,112704	3,65945	0,021591
X1	-0,633080	0,205112	-0,237635	0,076992	-3,08650	0,036699
X2	-0,170869	0,205112	-0,064138	0,076992	-0,83305	0,451668
X1X2	0,289923	0,205112	0,133285	0,094295	1,41348	0,230398
X1X1	0,567526	0,208022	0,336828	0,123462	2,72821	0,052540
X2X2	-0,027246	0,208022	-0,016170	0,123462	-0,13097	0,902119

Análises estatísticas para produção de isocitrato no tempo 144 h.

	Beta	Std.Err. of Beta	B	Std.Err. of B	t(4)	p-level
Intercept			35,33331	3,269459	10,80708	0,000416
X1	0,868538	0,174396	11,12322	2,233465	4,98025	0,007596
X2	-0,092892	0,174396	-1,18965	2,233465	-0,53265	0,622492
X1X2	-0,171992	0,174396	-2,69772	2,735425	-0,98621	0,379860
X1X1	-0,289235	0,176870	-5,85684	3,581512	-1,63530	0,177327
X2X2	0,114849	0,176870	2,32561	3,581512	0,64934	0,551521

ANEXO 5

Valores codificados e médias das respostas experimentais (g.L^{-1}) do quarto planejamento experimental variando glicerol (X1), MgSO_4 (X2), KH_2PO_4 (X3) e tiamina (X4) para produção de citrato.

Exp.	X1	X2	X3	X4	Citrato 48 h	Citrato 144 h	Isocitrato 48 h	Isocitrato 144 h
1	-1	-1	-1	-1	1,52	2,03	25,06	61,04
2	-1	-1	-1	1	1,55	2,17	25,60	71,43
3	-1	-1	1	-1	1,63	1,45	24,66	61,92
4	-1	-1	1	1	1,60	1,37	26,53	71,40
5	-1	1	-1	-1	1,46	1,16	24,74	60,98
6	-1	1	-1	1	1,65	1,39	26,56	62,46
7	-1	1	1	-1	1,61	1,42	25,52	56,68
8	-1	1	1	1	1,53	1,38	21,35	57,95
9	1	-1	-1	-1	1,62	2,08	24,13	58,64
10	1	-1	-1	1	1,47	1,27	23,89	71,54
11	1	-1	1	-1	1,65	2,19	27,16	78,00
12	1	-1	1	1	1,38	2,01	20,49	68,15
13	1	1	-1	-1	1,91	2,13	32,13	69,63
14	1	1	-1	1	2,13	2,06	36,45	81,74
15	1	1	1	-1	1,74	2,11	26,23	76,43
16	1	1	1	1	1,83	2,42	26,00	71,41
17	-2	0	0	0	1,64	2,29	22,26	57,88
18	2	0	0	0	1,65	2,18	25,53	92,11
19	0	-2	0	0	1,89	1,51	28,16	70,28
20	0	2	0	0	2,03	1,38	31,88	67,57
21	0	0	-2	0	0,12	0,00	16,86	58,24
22	0	0	2	0	0,24	0,00	21,87	70,46
23	0	0	0	-2	0,14	0,00	18,96	60,42
24	0	0	0	2	0,39	0,00	16,02	68,63
25	0	0	0	0	0,15	0,00	16,51	58,28
26	0	0	0	0	0,17	0,00	22,00	58,72