PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Yarrowia lipolytica* UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO

LUANA VIEIRA DA SILVA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, D.Sc.

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
2010

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Yarrowia lipolytica* UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO

Luana Vieira da Silva

Dissertação submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em ciências.

Aprovada por:

Orientadores

_____

Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, D.Sc.

_____

Prof^{a}. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Banca Examinadora

_____

Prof^{o}. Tito Lívio Moitinho Alves, D. Sc.

_____

Prof^{a}. Selma Ferreira Leite, D.Sc.

_____

Prof^{a}. Marisa F. Mendes, D.Sc.

Rio de Janeiro, R.J. - Brasil

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, LUANA VIEIRA

Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono– [Rio de Janeiro] 2010.

xix, 94 p. 29,7 cm .

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2010.

1. Glicerol; 2. *Yarrowia lipolytica*; 3. Ácido Cítrico; 4.Otimização.

I. EQ/UFRJ.

II. Título (série)

DEDICATÓRIA

"Bem-aventurado o homem que encontra sabedoria, e o homem que adquire conhecimento, pois ela é mai proveitosa do que a prata, e dá mais lucro do que o ouro. Mais preciosa é do que os rubis; tudo o que podes desejar não se compara a ela".

Provérbios 3. 13-15

"A sabedoria é suprema; portanto, adquire a sabedoria. Sim, com tudo o que possuis adquire o entendimento. Estima-a e ela te exaltará; abraça-a, e ela te honrará".

Provérbios 4. 7-8

Agradeço a DEUS por sua presença constante e perceptível, sempre me dando força para seguir o meu caminho...

Dedico esta vitória às duas pessoas mais importantes e que sempre estiveram presente em minha vida: aos meus pais, Cida e Zeli. Esta conquista não é só minha...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cida e Zeli, pelo amor inabalável, pelos votos de confiança, pela compreensão, pelo orgulho e por todo apoio em todas as decisões em minha vida.

Ao meu esposo, Alexandro, por seu companheirismo e compreensão.

Aos meus irmãos, Rafael e Daise, por fazerem parte da minha vida, sem eles eu não teria alcançado metade desta estrada. Daise, sempre confiante na minha graduação, sem a sua ajuda não teria concluído.

Aos meus avós, Elias e Geralda (*in memória*), minha avó Adelaide e ao meu avô Zeca por seus ensinamentos e sabedorias.

Aos meus tios (todos) que sempre torceram por minha vida, em especial minha tia Rosa Helena pelo orgulho declarado e ao meu tio e padrinho Elias, que está presente em todos os momentos importantes da minha vida.

Aos meus cunhados, Marcos Alexandre e Jaqueline, pelo apoio e carinho.

Ao meu príncipe, Denis Felipe, e as minhas princesas Ana Beatriz e Maria Eduarda por transmitirem para esta tia a alegria de ser criança.

À minha amiga e irmã, Camila, que mesmo distante fisicamente está tão perto de mim em meu coração. Às minhas amigas Sara e Taís que sempre torceram por mim e por acreditarem na minha competência.

Aos meus sogros Valéria e Elielson que sempre se preocuparam comigo.

Agradeço a minha orientadora Priscilla, pela orientação, pela paciência, pelos ensinamentos e ajuda nos momentos críticos dos experimentos e por sempre estar disposta a me ajudar.

Agradeço ao meu orientador Fernando pela oportunidade de realizar este trabalho e pelos ensinamentos sempre essenciais

À professora Maria Alice por ter me convidado para trabalhar em seu laboratório. Pude conhecer pessoas maravilhosas.

À Roberta, em primeiro lugar por sua amizade, compreensão e por seu trabalho. Sua colaboração, conhecimento e ensinamento foram fundamentais para que eu alcançasse esta vitória. À turma do laboratório 103: Tatiana, Gizele, Kelly, Bernardo, Ana Iraidy, Diego, Conrado, Luiza... pela ajuda e amizade.

Ao Renan, Alex e Miranda por sua ajuda técnica e amizade.

Ao apoio financeiro da FAPERJ e da CAPES.

A todos que de alguma forma me ajudaram para concretizar mais esta etapa da minha vida.

Resumo da dissertação apresentada a EQ/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.).

Luana Vieira da Silva

Janeiro/2010

Orientadores: Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa.

Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral

Programa: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de ácido cítrico, que é um produto amplamente usado em produtos alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e em outros produtos industriais devido às suas propriedades como acidulantes, conservantes, ajustadores de pH e antioxidantes, via fermentação microbiológica por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 através da influência da relação molar carbono/nitrogênio. Foram realizados experimentos utilizando planejamento fatorial para otimização do meio de produção utilizando glicerol PA e o emprego de substrato renovável, glicerol proveniente da produção do biodiesel como fontes de carbono. Inicialmente, foi possível avaliar os efeitos das variáveis concentração de glicerol PA, concentração de extrato de lêvedo, concentração de sulfato de amônio e velocidade de agitação sobre a produção de ácido cítrico com o planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}. As concentrações sulfato de amônio e de extrato de lêvedo foram as variáveis estatisticamente significativas apresentando influência negativa sobre a concentração de ácido cítrico. A concentração de glicerol PA e a agitação não foram estatisticamente significativas, dentro das faixas de concentração e velocidade estudadas. Desta forma, a combinação de 200g/L de glicerol PA, 0,5 g/L de extrato de lêvedo, 0 g/L de sulfato de amônio e velocidade de agitação de 250 rpm, com razão molar entre carbono/nitrogênio igual a 1623 e em meio mineral não tamponado, propiciou a maior produtividade deste planejamento inicial (0,01242 g/L*h). Um segundo planejamento fatorial completo foi elaborado 2^2 com a faixa de 150 g/L a 250 g/L para a variável glicerol PA. Diminuiu-se a faixa de trabalho de extrato de lêvedo em relação aos valores usados no primeiro planejamento uma vez que esta variável foi significativa estatisticamente com efeito negativo sobre a resposta. A velocidade de agitação foi fixada em 250 rpm. Não houve adição de sulfato de amônio neste planejamento. O resultado deste planejamento foi a produção de 2,51 g/L de ácido cítrico pelo ensaio 1, que foi composto por 150 g/L de glicerol PA, 0,1 g/L

de extrato de lêvedo e a 250 rpm, em meio mineral não tamponado e a uma razão molar C/N de 6085. Testes foram realizados em meio mineral tamponado e usando tanto glicerol PA quanto glicerol do biodiesel a concentração de ácido cítrico foi maior. Para o ensaio utilizando glicerol PA em meio mineral tamponado, a concentração máxima de ácido cítrico foi de 10,65 g/L e para glicerol bruto em meio mineral tamponado houve a produção de 4,15 g/L de ácido cítrico. Por esta razão, todos os ensaios seguintes foram conduzidos em meio mineral tamponado. Para a faixa de 150 g/L a 250 g/L utilizada no segundo planejamento experimental, a variável concentração de glicerol não foi significativa estatisticamente e a concentração de extrato de lêvedo foi estatisticamente significativa, esta apresentando influência negativa. Portanto, com o objetivo de investigar o efeito da concentração de extrato de lêvedo na produção de ácido cítrico um terceiro planejamento experimental foi realizado. A faixa de análise para o glicerol PA reduziu para 30 a 50 g/L. Os níveis mínimo e máximo para as variáveis concentração de extrato de levedura e agitação foi 0,1 e 0,9 g/L e 160 e 250 rpm respectivamente. A partir deste 3º planejamento experimental foi possível produzir 14,04 g/L de ácido cítrico a uma razão molar de C/N de 1217. Analisando a curva de crescimento celular dos ensaios deste planejamento pode-se afirmar que meios de cultivo deficientes de fonte de nitrogênio proporcionam limitação do crescimento celular da cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 proporcionando maior produção de ácido cítrico. Já os ensaios, cuja composição era mais rica em fonte de nitrogênio propiciaram um crescimento celular mais elevado, logo a produção de ácido cítrico foi pequena. Um DCCR 2^2 completo foi realizado a partir dos resultados do 3º planejamento. A concentração de glicerol PA foi fixada em 30 g/L e a faixa de estudo da concentração de extrato de levedura foi diminuída já que para o 3º planejamento exerceu efeito negativo sobre a resposta e a faixa de estudo da agitação foi ampliada uma vez que apresentou influência positiva sobre a variável de resposta. A produção máxima de ácido cítrico foi 16,49 g/L, com $Y_{cit/glic}$ igual a 0,55, uma razão molar de C/N de 714 e $R_{AC/ISC}$ igual a 12:1. Foi produzido 6,75 g/L de ácido cítrico utilizando glicerol proveniente da produção do biodiesel nas condições otimizadas pelo 4º planejamento experimental, mostrando ser matéria-prima renovável apropriada para o crescimento de *Y.lipolytica* e a biossíntese do ácido cítrico. Quando foram realizados ensaios com glicerol PA suplementados com acetato de sódio não houve aumento da produção de ácido cítrico, porém para ensaios nas condições otimizadas do 4º planejamento utilizando o glicerol proveniente da produção do biodiesel foi ocasionado aumento na concentração deste ácido. Apesar deste pequeno aumento, a concentração de ácido isocítrico também foi favorecida com a adição de acetato de sódio, reduzindo a $R_{AC/ISC}$ em 13,58% e 33,72% utilizando 5,06 g/L e 10 g/L de acetato de sódio respectivamente.

Abstract of a Final Project presented to EQ/ UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

Luana Vieira da Silva

January/2010

Supervisors: Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa

Profª. Priscilla Filomena Fonseca Amaral

Programe: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

This work aims to study the production of citric acid, which is a product widely used in food, pharmaceutical, cosmetics and other industrial products because of their properties such as acidulants, preservatives, pH adjusters and antioxidants, route microbial fermentation by *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 through the influence of the molar carbon / nitrogen. Experiments were carried out using factorial design for optimization of the production using glycerol PA and use of renewable substrate, glycerol from the biodiesel production as carbon sources. Initially, it was possible to evaluate the effects of variables concentration of glycerol, concentration of yeast extract, concentration of ammonium sulfate and agitation speed on production of citric acid for the fractional factorial design 2^{4-1}. The concentrations of ammonium sulfate and yeast extract were the variables statistically significant showing negative influence on the concentration of citric acid. The concentration of glycerol and agitation were not statistically significant, within the ranges of concentration and velocity studied. Thus, the combination of 200g/L glycerol PA, 0.5 g/L yeast extract, 0 g/L of ammonium sulfate and stirring speed of 250 rpm, with molar carbon/nitrogen ratio equal to 1623 and non-buffered mineral medium, provided the higher productivity of this initial planning (0.01242 g/L*h). A second complete factorial design 2^2 was developed with 150 g/L to 250 g/L for variable concentration of glycerol. Decreased range of concentration of yeast extract from the

values used in planning a first time this variable was statistically significant with a negative effect on the response. The agitation speed was set at 250 rpm. There was no addition of ammonium sulfate in planning. The result of this planning was the production of 2.51 g/L of citric acid by assay 1, which was composed of 150 g/L glycerol, 0.1 g/L yeast extract and 250 rpm in mineral medium unbuffered and a molar C/N of 6085. Tests were performed in mineral medium buffered using both glycerol PA and raw glycerol and the concentration of citric acid was higher. For the test using glycerol PA in mineral medium buffered to maximum concentration of citric acid was 10.65 g/L and to raw glycerol in mineral medium buffered was produced 4.15 g/L of citric acid. For this, all the following tests were conducted in mineral medium buffered. For the group of 150 g/L to 250g /L used in the second experimental design, the variable concentration of glycerol was not statistically significant and the concentration of yeast extract was statistically significant, showing that negative influence. Therefore, in order to investigate the effect of concentration of yeast extract in the production of citric acid a third experimental design was conducted. A full analysis for glycerol decreased to 30 to 50 g/L. The minimum and maximum levels for the variable concentration of yeast extract and agitation was 0.1 and 0.9 g/L and 160 and 250 rpm respectively. From this third experimental design was possible to produce 14.04 g/L of citric acid at a molar C/N ratio of 1217. Analyzing the curve of cell growth of test of planning can be said that culture media deficient in nitrogen source provides limitations of cell growth of the strain *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 providing greater production of citric acid. Since the tests, whose composition was richer in nitrogen source provided a higher cell growth, so the production of citric acid was small. A complete DCCR 2^2 was carried from the results of the third planning. The concentration of glycerol was set at 30 g/L and the concentration of yeast extract was reduced because exerted negative effect on the response in third planning and the full study of agitation was increased as there was a positive influence on the response variable. The maximum production of citric acid was 16.49 g/L, with $Y_{cit/glyc}$ equal to 0.55, a molar C/N ratio of 714 and $R_{AC/ISC}$ equal to 12:1. It was produced 6.75 g/L of citric acid using glycerol from the biodiesel production under conditions optimized for the 4th experimental design, which is considered a renewable raw material suitable for the growth of *Y.lipolytica* and the biosynthesis of citric acid. When tests with glycerol PA were supplemented sodium acetate did not increase the production of citric acid, but for tests using the glycerol from the biodiesel in optimized conditions of the 4th caused an increase in the concentration of acid. Despite this small increase, the concentration of isocitric acid was also increased with the addition of sodium acetate, reducing the $R_{AC/ISC}$ at 13.58% and 33.72% using 5.06 g/L and 10 g/L sodium acetate respectively.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1. A levedura *Yarrowia lipolytica* 3
2.1.1. Substratos utilizados por *Yarrowia lipolytica* como fonte de carbono.....4
2.1.2. Consumo de Substratos Hidrofóbicos e a Superfície Celular.....5
2.1.3. Dimorfismo.....6
2.1.4. Produção de Ácidos Orgânicos por *Yarrowia lipolytica*.....7
2.2. Produção Microbiana de Ácidos Orgânicos.....11
2.2.1. Produção de Ácido Cítrico.....11
2.2.2. Produção de Ácido Pirúvico.....14
2.2.3. Produção de Ácido α-Cetoglutárico.....15
2.3. Utilização de Glicerol como Fonte de Carbono.....17
2.3.1. Generalidades sobre o Glicerol.....17
2.3.2. Glicerol surge como um Subproduto.....19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....22
3.1. Materiais.....22
3.2. Equipamentos.....22
3.3. Microrganismo.....22
3.4. Manutenção da cultura.....23
3.5. Obtenção do inóculo.....23
3.6. Esterilização de meios de cultura e instrumentos.....23
3.7. Otimização da produção de ácido cítrico.....24
3.7.1. Amostragem.....24
3.7.2. Experimentos Preliminares.....24
3.7.3. Análise Fatorial Fracionada.....25
3.7.4. Estudo da influência do meio tamponado na produção de ácido cítrico....26
3.8. Produção de ácido cítrico utilizando fonte de carbono de origem renovável....26
3.8.1. Subproduto da produção de biodiesel.....26
3.8.1.1. Pré-tratamento Glicerina Bruta.....26
3.9. Métodos Analíticos.....26
3.9.1. Quantificação do crescimento celular.....26
3.9.2. Determinação dos ácidos orgânicos.....27
3.9.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....27
3.9.2.2. Método Químico.....28
3.9.2.3. Método Enzimático.....28
3.9.2.3.1. Dosagem de Ácido Cítrico.....28
3.9.2.3.2. Dosagem de Ácido Isocítrico.....30
3.9.3. pH do meio de cultivo.....31
3.10. Determinação dos rendimentos, produtividade, razão Ácido Cítrico:Isocítrico e Razão Molar C/N 31
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....33
4.1. Influência da composição do meio de cultivo.....33
4.1.1. Experimentos Preliminares.....33
4.2. Primeiro Planejamento Fatorial.....48
4.3. Segundo Planejamento Experimental 2^k, sendo K = 2.....53
4.4. Terceiro Planejamento Experimental 2^k, sendo K = 3 60

4.5. Quarto Planejamento Experimental: Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2.....72
4.6. Experimento com glicerol da produção de biodiesel na condição ótima.....75
4.7. Influência da adição de acetato de sódio ao meio otimizado.....76
4.8. Análise comparativa dos resultados obtidos nas diferentes etapas do processo de otimização.....80
4.9. Análise comparativa entre o resultado obtido no presente estudo e resultados registrados na literatura.....82
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....84
6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Meios de cultivo utilizados no crescimento celular e produção de ácidos orgânicos por *Yarrowia lipolytica*..... 24
Tabela 3.2- Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental 2^{k-1}, com k=4.....25
Tabela 3.3 – Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0 Código das variáveis independentes do planejamento experimental 2^{k-1}, sendo k = 4.....25
Tabela 4.1. Tempo de retenção dos padrões injetados no HPLC.....41
Tabela 4.2. 1º Planejamento experimental, 2^{k-1}, k = 4, e respectivos resultados para a otimização.....50
Tabela 4.3 – Ensaios utilizando a composição dos ensaios 1 e 2 do 1º planejamento experimental com adição de acetato de sódio.....52
Tabela 4.4. Concentração máxima obtida pelos ensaios com adição de acetato de sódio.....52
Tabela 4.5. Fatores e níveis analisados no 2º planejamento experimental 2^k, com k=2.....54
Tabela 4.6. Matriz do 2º planejamento fatorial com os valores reais e os resultados experimentais.....54
Tabela 4.7 – Análise de variância para a concentração de ácido cítrico obtida no 2º planejamento experimental.....56
Tabela 4.8. Código e valores reais das variáveis do 3º planejamento experimental 2^k, sendo k = 3.....61
Tabela 4.9. ANOVA para concentração e produtividade de ácido cítrico para o 3º planejamento experimental.....67
Tabela 4.10 – Valores experimentais e previstos pelo modelo da concentração de ácido cítrico e desvios para o 3º planejamento experimental, 2^3.....71
Tabela 4.11. Faixa de valores estudados no 4º planejamento experimental, DCCR 2^2.....72
Tabela 4.12. Matriz do 4º planejamento experimental, DCCR 2^2, com os valores codificados e reais e os resultados experimentais.....73
Tabela 4.13. Razão Ácido Cítrico: Isocítrico para os ensaios 3 – 10 do 4º planejamento experimental.....74
Tabela 4.14 – Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* com adição de acetato de sódio em meios constituídos por glicerol P.A e glicerol da produção de biodiesel.....78
Tabela 4.15 – Comparação entres os ensaios realizados na condição otimizada sem e com adição de acetato de sódio ao meio de cultivo com glicerol PA e glicerol da produção de biodiesel.....78
Tabela 4.16. Evolução dos resultados da concentração de ácido cítrico produzido a partir de cultivo de *Y. lipolytica,* nas diferentes etapas do processo de otimização utilizando glicerol PA.....80
Tabela 4.17. Evolução dos resultados da concentração de ácido cítrico produzido a partir de cultivo de *Y. lipolytica,* nas diferentes etapas do processo de otimização utilizando glicerol proveniente da produção de biodiesel.....81
Tabela 4.18. Dados de estudos da produção de ácido cítrico produzidos por espécies de *Yarrowia lipolytica* registrados na literatura e no presente estudo.....83
Tabela 4.19. Custos das fontes de nitrogênio.....83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação da estrutura química do ácido cítrico.....11
Figura 2.2. Representação da estrutura química do ácido pirúvico.....15
Figura 2.3. Representação da estrutura química do ácido α-cetoglutárico.....15
Figura2.4. Mecanismo de superprodução de ácido α -cetoglutárico por *Yarrowia lipolytica* a partir de etanol (Modificado de CHERNYAVSKAYA *et al*., 2000).....17
Figura 2.5. Representação da estrutura química do glicerol.....18
Figura 2.6. Aplicações para uso de glicerol (ARRUDA *et al*., 2007).....19
Figura 3.1. Morfologia microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. (FONTES, 2008).....23
Figura 3.2. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000.....27
Figura 4.1. Perfil de crescimento celular e pH do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meios 1 e 2 em água destilada.....34
Figura 4.2. Perfil de crescimento celular e pH do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meios 3 e 4 em água destilada.....34
Figura 4.3. Cromatograma em HPLC do meio 1 em água destilada no inicio do cultivo.....35
Figura 4.4. Cromatograma em HPLC do meio 1 em água destilada no final do cultivo.....36
Figura 4.5. Cromatograma em HPLC do meio 2 em água destilada no inicio do cultivo.....36
Figura 4.6. Cromatograma em HPLC do meio 2 em água destilada no final do cultivo após 70 horas de processo.....37
Figura 4.7. Cromatograma em HPLC do meio 2 em água destilada no final do cultivo após 76 horas de processo.....37
Figura 4.8. Cromatograma em HPLC do meio 3 em água destilada no inicio do cultivo.....38
Figura 4.9. Cromatograma em HPLC do meio 3 em água destilada após 54 horas de processo.....38
Figura 4.10. Cromatograma em HPLC do meio 3 em água destilada após 70 horas de processo.....39
Figura 4.11. Cromatograma em HPLC do meio 4 em água destilada no inicio do cultivo.....39
Figura 4.12. Cromatograma em HPLC do meio 4 em água destilada após 46 horas de processo.....40
Figura 4.13. Cromatograma em HPLC do meio 4 em água destilada após 70 horas de processo.....40
Figura 4.14. Perfil de crescimento Celular e pH do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meios 1 e 2 em água Milliq.....42
Figura 4.15. Perfil de crescimento Celular e pH do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meios 3 e 4 em água Milliq.....42
Figura 4.16. Cromatograma em HPLC do meio 1 preparado com água Milliq no inicio do cultivo.....43
Figura 4.17. Cromatograma em HPLC do meio 1 preparado com água Milliq no final do cultivo.....43
Figura 4.18. Cromatograma em HPLC do meio 2 preparado com água Milliq no inicio do cultivo.....44
Figura 4.19. Cromatograma em HPLC do meio 2 preparado com água Milliq em 46 horas de fermentação.....44
Figura 4.20. Cromatograma em HPLC do meio 2 preparado com água Milliq no final do cultivo.....45
Figura 4.21. Cromatograma em HPLC do meio 3 preparado com água Milliq no inicio do cultivo.....45
Figura 4.22. Cromatograma em HPLC do meio 3 preparado com água Milliq em 77 horas de processo.....46
Figura 4.23. Cromatograma em HPLC do meio 3 preparado com água Milliq no final do cultivo.....46
Figura 4.24. Cromatograma em HPLC do meio 4 preparado com água Milliq no inicio do cultivo.....47
Figura 4.25. Cromatograma em HPLC do meio 4 preparado com água Milliq em 70 horas de fermentação.....47

Figura 4.26. Cromatograma em HPLC do meio 4 preparado com água Milliq no final do cultivo.....48
Figura 4.27. Cinética de produção de ácido cítrico para os experimentos do 1º planejamento experimental no cultivo de *Yarrowia lipolytica*. Dosagem pelo método químico de MARIER & BOULET (1958).....49
Figura 4.28. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}. A variável dependente é a concentração de ácido cítrico.....50
Figura 4.29. Cinética de crescimento celular e pH no cultivo de *Yarrowia lipolytica* do ensaio 2 do 1º planejamento experimental.....52
Figura 4.30.Cinética de crescimento celular e pH no cultivo de *Yarrowia lipolytica* dos ensaios 1, 2 e 3 com adição de acetato e ensaio 4 substituindo a glicose do pré-inóculo por glicerol puro.....53
Figura 4.31. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial completo 2^2 Variável dependente: Concentração de ácido cítrico (g/L).....55
Figura 4.32 – Superfície de resposta da concentração de ácido cítrico em relação às concentrações de glicerol PA e de extrato de levedura do 2º Planejamento Experimental 2^k no cultivo de *Yarrowia lipolytica*.....57
Figura 4.33. Curva de contorno para a concentração de ácido cítrico em relação às concentrações de glicerol PA e de extrato de levedura do 2º Planejamento Experimental 2^k no cultivo de *Yarrowia lipolytica*.....*57*
Figura 4.34. Produção de Ácido Cítrico utilizando os mesmos valores dos fatores do ensaio 1 do 2º planejamento utilizando glicerol proveniente da produção do biodiesel em meio mineral não tamponado.....58
Figura 4.35. Produção de Ácido Cítrico utilizando os mesmos valores dos fatores do ensaio 1 do 2º planejamento experimental utilizando glicerol P.A em meio mineral tamponado.....59
Figura 4.36. Produção de Ácido Cítrico utilizando os mesmos valores dos fatores do ensaio 1 do 2º planejamento experimental utilizando glicerol do biodiesel em meio mineral tamponado.....59
Figura 4.37. Cinética de crescimento celular e pH no cultivo de *Yarrowia lipolytica* dos ensaios 1 do 2º planejamento experimental em meio mineral não tamponado (A) e em meio mineral tamponado (B).....60
Figura 4.38. Cinética de crescimento celular e pH no cultivo de *Yarrowia lipolytica* dos ensaio 1 – 4 do 3º planejamento.....62
Figura 4.39. Cinética de crescimento celular e pH no cultivo de *Yarrowia lipolytica* dos ensaio 5 – 8 do 3º planejamento.....63
Figura 4.40. Diagrama de Pareto para a concentração de ácido cítrico do 3º planejamento experimental.....64
Figura 4.41. Diagrama de Pareto para a produtividade de ácido cítrico do 3º planejamento experimental.....65
Figura 4.42. Cinética de crescimento celular, pH e concentração de ácido cítrico no cultivo de *Yarrowia lipolytica* do ensaio 5 do 3º planejamento.....66
Figura 4.43 - Cinética de crescimento celular, pH e concentração de ácido cítrico no cultivo de *Yarrowia lipolytica* do ensaio 6 do 3º planejamento.....67
Figura 4.44 - Superfície de resposta da concentração de ácido cítrico em relação às concentrações de extrato de levedura e de glicerol PA.....69
Figura 4.45 - Superfície de resposta da concentração de ácido cítrico em relação à agitação e a concentração de glicerol PA.....69
Figura 4.46 - Superfície de resposta da concentração de ácido cítrico em relação à agitação e a concentração de extrato de lêvedo.....70
Figura 4.47 – Valores Experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta concentração de ácido cítrico.....71
Figura 4.48 – Valores Experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta produtividade de ácido cítrico.....72
Figura 4.49 - Cinética de crescimento celular e pH do meio de cultivo de *Yarrowia lipolytica* dos ensaios 1 e 2 do 4º planejamento experimental.....74
Figura 4.50 – Diagrama de Pareto para a concentração de ácido cítrico do 4º planejamento.....75
Figura 4.51 - Perfis de crescimento e pH do meio de cultivo de *Y. lipolytica* nas condições ótimas obtidas pelo planejamento DCCR 2^2 utilizando glicerol PA (A) e glicerol da produção de biodiesel (B).....76

Figura 4.52 - Perfis de crescimento e pH do meio de cultivo de *Y .lipolytica* nas condições ótimas obtidas pelo planejamento DCCR 2^2 utilizando glicerol PA com adição de acetato de sódio: Ensaio (1) 1:3 C/C , ensaio (2) 1:3 M/M e utilizando glicerol proveniente do biodiesel com adição de acetato de sódio: Ensaio (3) 1:3 C/C e ensaio (4) 1:3 M/M. C/C: razão entre a massa de carbono do acetato de sódio e a massa de carbono do glicerol; M/M: razão entre a massa de acetato de sódio e a massa de glicerol.....79
Figura 4.53. Evolução dos resultados da concentração de ácido cítrico produzido a partir de cultivo de *Y. lipolytica* nas diferentes etapas do processo de otimização em glicerol PA 81
Figura 4.54. Evolução dos resultados da concentração de ácido cítrico produzido a partir de cultivo de *Y. lipolytica* nas diferentes etapas do processo de otimização em glicerol da produção de biodiesel.....82

1. INTRODUÇÃO

Devido à escassez de combustíveis fósseis no mundo existe um interesse crescente na produção comercial de biodiesel, que pode ser obtido por diferentes processos tais como o craqueamento, a esterificação ou pela transesterificação de óleos vegetais. Com um gerenciamento seguro da colheita dessa matéria-prima renovável é possível obter um suprimento contínuo de biodiesel. A produção industrial de biodiesel, contudo, leva a obtenção de grandes quantidades de glicerol como um subproduto (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; RYMOWICZ *et al.*, 2006; DA SILVA *et al.*, 2009). A glicerina constitui o principal subproduto do processo de produção de biodiesel por transesterificação. Ela é obtida sob a forma bruta, cujo valor é muito baixo devido à presença das diversas impurezas presentes (THOMPSON *et al*., 2005). Algumas companhias produtoras de biodiesel estão enfrentando sérios problemas por causa do impacto ambiental que o excesso de glicerol gerado pode causar. A substância 1,2,3-propanotriol, mais conhecida como glicerol ou glicerina, é um álcool e está presente em muitas aplicações industriais como na obtenção de produtos de alto valor agregado, como polímeros, através de conversão química ou bioquímica (rotas fermentativas) e aditivos para combustíveis, como ésteres e éteres de glicerina (KARINEN *et al*., 2006).

Uma das promessas de aplicação do glicerol proveniente da produção do biodiesel é na produção de compostos de alto valor através da fermentação microbiológica (DA SILVA *et al.*, 2009; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008). Vários metabólitos microbianos podem ser produzidos a partir de glicerol, entre eles o ácido cítrico (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; RYMOWICZ *et al*., 2006; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008; RYMOWICZ *et al.*, 2008).

O ácido cítrico, cujo nome oficial é ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, é um ácido orgânico fraco, que pode ser encontrado nos citrinos e é sintetizado em escala industrial pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* através do processo de fermentação submersa tendo a sacarose como fonte de carbono (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; RYMOWICZ *et al.*, 2006; LEVINSON *et al.*, 2007; RYMOWICZ *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2009). Sua produção alcançou 1,4 milhões de tonelada por ano e existe um crescimento anual de 3,5 – 4 % do consumo de ácido cítrico (RYMOWICZ *et al.*, 2008). Este ácido apresenta várias utilizações importantes na indústria de alimentos, farmacêutica, de cosméticos e bebidas como acidificante, antioxidante, aromatizante, preservante e plastificante. Como o ácido cítrico é uma comoditie é necessário utilizar matéria-prima barata e disponível na produção industrial, como o glicerol.

Devido ao aumento da demanda por ácido cítrico, processos alternativos de cultivo envolvendo cepas de levedura estão sendo usados para sua produção.

Especificamente *Yarrowia lipolytica, C. quillermondii* e *C.oleophila* têm sido usadas para a produção de ácido cítrico através de várias fontes renováveis ou materiais residuais como substratos. A levedura *Yarrowia lipolytica* é única em sua habilidade de produzir e excretar no meio de cultura uma grande variedade de ácidos orgânicos, incluindo os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, ácido cítrico, isocítrico, α-cetoglutárico, e pirúvico (BARTH E GAILLARDIN, 1997; FICKERS *et al.*, 2005) em condições limitantes de crescimento causadas por diferentes fatores de nutrição, tais como a fonte de nitrogênio, tiamina, fosfato ou sais de compostos minerais (fósforo, enxofre e magnésio) (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; FICKERS *et al.*, 2005; RYMOWICZ *et al.*, 2006).

Em resposta a esta condição, esta dissertação teve como objetivo geral estudar a produção do ácido cítrico por uma cepa de *Yarrowia lipolytica* isolada da Baia de Guanabara, no Rio de Janeiro, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, através da otimização do meio de cultivo utilizando glicerol PA como fonte de carbono e o glicerol proveniente da produção do biodiesel como matéria-prima de origem renovável, visando a diminuição dos custos de produção para o desenvolvimento de um processo biotecnológico com potencial de aplicação futura, para agregar valor a produção do biodiesel e diminuir a geração de poluentes e excedentes na produção de biodiesel.

Para alcançar este objetivo, estudos sobre condições de cultivo para aumentar a síntese do ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foram conduzidos através de:

- Estudo da influência da concentração de glicerol, concentração de extrato de lêvedo, concentração de sulfato de amônio e velocidade de agitação em frascos agitados;

-Estabelecer a razão molar Carbono/Nitrogênio ótima para proporcionar a máxima concentração de ácido cítrico, utilizando planejamento de experimentos para otimização do meio de produção;

- Avaliação do potencial de produção do ácido cítrico utilizando glicerina, subproduto da produção do biodiesel, como matéria-prima não convencional.

O trabalho está estruturado em quatro partes básicas:

A primeira parte apresenta a revisão bibliográfica, como forma de embasamento aos objetivos propostos neste capítulo, procurando fornecer base teórica bem como os resultados obtidos na literatura referentes ao tema deste trabalho. A segunda parte apresenta os materiais e métodos utilizados para alcançar os objetivos propostos. Na terceira parte são apresentados os resultados e as discussões. Para finalizar, conclusões e sugestões para trabalhos futuros, são apresentadas na quarta parte.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A levedura Yarrowia lipolytica

Yarrowia lipolytica é um microorganismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos, anteriormente conhecida como *Candida lipolytica*. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica.* Esta levedura pode ser isolada de substratos ricos em proteínas e lipídeos, como produtos das indústrias de laticínios, de shoyu, produtos de saladas que contêm carne ou camarão (BARTH E GAILLARDIN, 1997), queijos ou salsichas, lingüiças e chouriços (FICKERS *et al*., 2005) e também em produtos avícolas crus (ISMAIL *et al*., 2001). *Yarrowia lipolytica* é uma das espécies predominantes em queijos *Camembert* e *blue-veined*. Seu crescimento nestes substratos está relacionado com as suas atividades extracelulares proteolíticas e lipolíticas e com a sua capacidade de crescer nas temperaturas de 5-10ºC. Algumas cepas também têm sido isoladas de solos, água de esgoto e ambientes poluídos com petróleo (FICKERS *et al*., 2005; KIM *et al*., 2000).

Um grupo designado de leveduras "não-convencionais" foi adotado para diferenciar as leveduras pertencentes a este grupo das leveduras mais comumente utilizadas como, por exemplo, S*accharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, que são, portanto, consideradas leveduras "convencionais". Estes dois grupos se diferenciam em relação à fisiologia, genética, biologia molecular e aplicação biotecnológica. A levedura *Yarrowia lipolytica* é a espécie mais estudada do grupo das leveduras "não-convencionais" principalmente por não apresentar patogenicidade (BARTH E GAILLARDIN, 1997; FICKERS *et al*., 2005). Atualmente, tem sido utilizada como modelo para o estudo de excreção protéica, biogênese de peroxisoma, dimorfismo (KAWASSE *et al*., 2003), degradação de substratos hidrofóbicos e em muitos outros campos (FICKERS *et al*., 2005). Recentemente, a seqüência total dos seis cromossomos de *Y. lipolytica* foi determinada permitindo sua admissão nos estudos de genoma, transcriptoma e proteoma (FICKERS *et al*., 2005).

O interesse por *Yarrowia lipolytica*, em meados dos anos 1960, foi devido à sua capacidade de utilizar substratos hidrofóbicos, especialmente alcanos como fonte de carbono para a produção de proteína microbiana (SCP – *Single Cell Protein*) bem como os metabólitos do ciclo dos intermediários como os ácidos cítrico e α-cetoglutárico. Isto resultou em um amplo conhecimento de seu cultivo em fermentadores de larga escala. *Yarrowia lipolytica* foi classificada como Generally Regarded As Safe (GRAS) pela American Food and Drug Administration (FDA) na produção de ácido cítrico (FICKERS *et al*., 2005).

Yarrowia lipolytica secreta várias enzimas, como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (NICAUD *et al*., 2002). Existe ainda um campo que vem sendo explorado com as leveduras não convencionais para pesquisa básica e também para aplicações biomédicas, que é a produção de proteínas heterólogas neste organismo. Historicamente, *Saccharomyces cerevisiae* foi usada como hospedeiro para produção de proteínas heterólogas, uma levedura da qual a literatura já acumulou grande conhecimento, mas que apresenta, neste caso, baixa produtividade, pobre estabilidade plasmidial e baixa capacidade de excreção (MADZAK *et al*., 2004). MULLER *et al*. (1998) testaram quatro leveduras não convencionais e *S. cerevisiae* na produção de seis enzimas fúngicas e todas as não convencionais foram mais eficientes que a levedura convencional, sendo que *Y. lipolytica* foi o hospedeiro que apresentou melhor desempenho e reprodutibilidade.

Nos anos 1990, vários grupos iniciaram estudos sobre o processo de dimorfismo na levedura *Yarrowia lipolytica* uma vez que é capaz de crescer na forma de células ovóides e hifas bastante alongadas dependendo das condições de crescimento. O número de grupos de pesquisas que utilizam a cepa *Yarrowia lipolytica* como modelo de levedura está aumentando rapidamente devido o desenvolvimento de ferramentas genéticas e moleculares.

2.1.1. Substratos utilizados por <u>Yarrowia lipolytica</u> *como fonte de carbono*

As células de *Y. lipolytica* utilizam prontamente hexoses, principalmente glicose, ácidos orgânicos (succinato, acetato e citrato), etanol, glicerol e substratos hidrofóbicos (ácidos graxos e alcanos) como fontes únicas de carbono e energia, mas não utilizam sacarose, pois não apresentam atividade invertásica. Alcenos polimetilados ou clorados, e 1-alcenos também são assimilados por esse microorganismo (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

Yarrowia lipolytica não produz etanol, porém o utiliza como fonte de carbono em concentrações de até 3%; valores maiores são tóxicos (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

Muitas cepas de *Yarrowia lipolytica* crescem eficientemente em acetato como fonte de carbono. Concentrações inferiores a 0,4% são bem toleráveis, concentrações entre 0,4 e 1% reduzem a taxa de crescimento e valores superiores a 1% inibem o crescimento (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

2.1.2. Consumo de Substratos Hidrofóbicos e a Superfície Celular

A levedura *Y. lipolytica* é geralmente isolada de meios contaminados por compostos oleosos, como a Baía de Guanabara (HAGLER E MENDONÇA-HAGLER, 1981), de laticínios, participando da flora de queijos picantes (BARTH E GAILLARDIN, 1997), de produtos avícolas crus (ISMAIL *et al*., 2001), e é particularmente adaptada a substratos hidrofóbicos. Acredita-se que, evolutivamente, leveduras que vivem em meios aquosos onde a fonte de carbono é hidrofóbica e, portanto, se encontra dispersa no meio, sob a forma de gotas, tenham desenvolvido mecanismos para facilitar o acesso a este substrato devido à pequena probabilidade de contato das gotas de óleo, em constante movimento.

Em fermentações com hidrocarbonetos, a fase oleosa é dispersa em forma de gotas na fase aquosa e a tensão interfacial que atua na interface entre a fase oleosa e a fase aquosa tende a manter uma forma esférica contra os estresses de cisalhamento que tendem a deformá-la. Essas gotas coalescem entre elas continuamente e sua distribuição de tamanhos depende da tensão interfacial, da fração volumétrica de hidrocarboneto e da intensidade de agitação. A distribuição de tamanhos das gotas é responsável pela área interfacial entre os dois líquidos e controla a transferência de substrato para as células. GUTIERREZ E ERICKSON (1977) observaram uma redução no diâmetro médio das gotas da fase oleosa paralelamente à redução da tensão interfacial durante a fermentação de hexadecano por *Candida lipolytica* e atribuíram o fenômeno à produção de agentes tensoativos pela levedura. De fato, CIRIGLIANO E CARMAN (1984) foram capazes de detectar e isolar atividade emulsificante, capaz de estabilizar emulsões água-óleo, no meio de fermentação de *C. lipolytica*. Este bioemulsificante, que foi chamado de *liposan*, era composto de aproximadamente 83% de carboidrato e 17% de proteína, apresentando atividade emulsificante maior que alguns emulsificantes comerciais como: goma arábica, alginato e caseína (CIRIGLIANO E CARMAN, 1985).

Portanto, a assimilação de substratos hidrofóbicos pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada por um surfactante. No caso de adsorção direta, muitos mecanismos podem estar envolvidos, como interações hidrofóbicas, interações de Lewis (ácido ou base), interações eletrostáticas ou de van der Waals.

Certamente, as propriedades de superfície das leveduras dependem da espécie e cepa utilizada, do ambiente que a cerca e da fonte de carbono presente no meio. A cepa selvagem de levedura, *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, selecionada de um estuário da Baía de Guanabara (Rio de Janeiro, Brasil) apresenta um caráter singular, com alta afinidade a compostos hidrofóbicos (AMARAL *et al*., 2006).

2.1.3. Dimorfismo

Dimorfismo se refere à capacidade do fungo de crescer em duas distintas formas, usualmente como células ovóides ou hifas filamentosas, e de ser reversível entre essas duas formas. *Yarrowia lipolytica* é um fungo que apresenta dimorfismo naturalmente, formando células de leveduras, pseudo-hifas e hifas septadas (BARTH E GAILLARDIN, 1997; KAWASSE *et al*., 2003). O seu micélio verdadeiro consiste de hifas septadas de 3 a 5 mm de largura e até vários mm de comprimento. Células apicais freqüentemente excedem 100 mm, enquanto que os segmentos medem de 50 a 70 mm. Existe apenas um núcleo por segmento. Os septos se assemelham a poros centrais do tipo comum a ascomiceto e diferentes de outras leveduras filamentosas, tendo retículo endoplasmático se estendendo de um segmento ao outro (BARTH & GAILLARDIN, 1997). Acredita-se que o dimorfismo das leveduras é um mecanismo de defesa a condições adversas, como temperatura e mudanças nutricionais (KAWASSE *et al*., 2003). *Yarrowia lipolytica* tem sido considerada um modelo adequado para estudos de dimorfismo em leveduras, pois é uma espécie suscetível à manipulação genética e porque suas formas morfológicas são fáceis de serem distinguidas, em contraste a *S. cerevisiae*, que não possui verdadeiros filamentos e exibe pseudo-hifas quando cresce em condições limitantes de nitrogênio (KAWASSE *et al*., 2003). A habilidade de formar hifas em cepas selvagens pode proporcionar uma vantagem seletiva quando submetidas a condições de estresse, facilitando uma saída para escassez de nutrientes (KAWASSE *et al*., 2003; GANCEDO, 2001). A capacidade de formação de pseudo-hifas em resposta a condições de estresse permite também a fuga de um ambiente prejudicial (GANCEDO, 2001).

Vários fatores ambientais podem afetar a morfologia de fungos dimórficos. A morfologia das células é determinada pelas condições de crescimento (aeração, fontes de carbono e nitrogênio, pH, etc) e pela formação genética da cepa (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

Em *Y. lipolytica* especificamente, a fonte de carbono não influencia na morfologia da célula em meios líquidos; assim como o pH em meio mínimo. Em compensação, a morfologia das células é bastante dependente da fonte de nitrogênio; a limitação em nitrogênio inibe a formação de hifas, ao contrário do que ocorre com *S. cerevisiae* (KAWASSE *et al*., 2003; BARTH & GAILLARDIN, 1997). PAPANIKOLAOU *et al*. (2002) observaram que a cepa *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 se desenvolveu na forma de leveduras e que a presença de micélios verdadeiros foi negligenciável em condições limitantes de nitrogênio e em alta razão molar carbono/nitrogênio utilizando como fonte de carbono glicerol bruto. SZABO (1999) mostrou que o pH do meio afeta fortemente a morfologia de células de *Yarrowia*

lipolytica, mas apenas na presença de uma fonte de nitrogênio complexa, sugerindo que as células respondem mais a alterações nutritivas do meio com diferentes valores de pH do que ao próprio valor de pH. Num estudo posterior, SZABO E ŠTOFANIKOVA (2002) comprovaram a importância da presença de fontes de nitrogênio orgânico no efeito do pH e na morfologia celular de *Y. lipolytica*. Além disso, a adição de sulfato de amônio a um meio sem aminoácidos aumenta a proporção de filamentos de um modo dose-dependente. A inibição da respiração mitocondrial bloqueia a formação de filamentos. O desenvolvimento micelial é inibido também pela deficiência de sulfato de magnésio ou cloreto férrico ou pela adição de cisteína ou glutationa reduzida (SZABO, 1999; BARTH & GAILLARDIN, 1997).

2.1.4. Produção de Ácidos Orgânicos por Yarrowia lipolytica

A levedura *Yarrowia lipolytica* é a única que tem a capacidade de produzir e excretar no meio uma ampla variedade de ácidos orgânicos, incluindo os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, tais como o ácido cítrico, o ácido isocítrico, o ácido α-cetoglutárico e ácido pirúvico (FICKERS *et al*., 2005; BARTH E GAILLARDIN, 1997; RYMOWICZ *et al*., 2008; KAMZOLOVA *et al*., 2003). Sendo esses ácidos de grande interesse comercial, os estudos para aumento de produção por via microbiológica utilizando tais leveduras, continuam até hoje.

As fontes de carbono utilizadas neste processo são alcanos, óleos vegetais, gorduras, etanol, melaços, amidos hidrolisados, que são fontes de baixo custo (PAPANIKOLAOU *et al*., 2002; RYMOWICZ *et al*., 2006; FICKERS *et al*., 2005) em condições limitantes de crescimento causadas por diferentes fatores de nutrição, tais como a fonte de nitrogênio, tiamina, fosfato ou sais de compostos minerais (fósforo, enxofre e magnésio). Em condições de esgotamento de nitrogênio, há secreção de ácido cítrico e isocítrico, enquanto que limitação de tiamina (uma vitamina que não é sintetizada por essa levedura, mas é necessária para a atividade da α-cetoglutarato desidrogenase) em baixo pH causa secreção principalmente de ácido α-cetoglutárico e ácido pirúvico (FICKERS *et al.*, 2005). Sob condições de deficiência em tiamina no meio de cultura, a levedura *Y. lipolytica* oxida glicose com a formação de ácido pirúvico (75-80%) e ácido α -cetoglutárico (20-25%). O início da síntese dos ácidos foi provocado pela redução da concentração intracelular de tiamina (MUNTYAN, 1976; FINOGENOVA *et al*., 2005). Leveduras que não são capazes de produzir tiamina, como *Y. lipolytica*, produzem ácido pirúvico na presença de glicerol e glicose como fontes de carbono (ERMAKOVA *et al*., 1986). Sob limitação de tiamina, o requerimento da célula em tiamina para produção de ácido pirúvico depende da fonte de carbono

utilizada. A utilização de glicerol levou a produção de 61,3 g/L de ácido e um rendimento de 0,71 g/g (MORGUNOV *et al*., 2004; FINOGENOVA *et al*., 2005).

Y. lipolytica apresenta uma alternativa a tradicional produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* a partir de melaço que acumula grandes quantidades de rejeitos sólidos e líquidos. *Y. lipolytica* pode utilizar diferentes substratos com maior taxa de produção (até 3 g de ácido cítrico/(L.h)) e maior rendimento em relação ao substrato (até 1,5 g/g, especialmente em substratos hidrofóbicos). Células de *Yarrowia lipolytica* são capazes de sintetizar ácido cítrico a partir de várias fontes de carbono como alcanos, glucose, etanol e óleos de plantas (CROLLA E KENNEDY, 2004; VENTER *et al*., 2004; FINOGENOVA *et al*., 2005; RYMOWICZ, *et al*., 2008).

STOTTMEISTER *et al*. (1982) e KRUSE *et al*. (2004), em seus estudos, obtiveram uma produção de até 250 g/L de ácido cítrico pelo processo de fermentação em batelada alimentada utilizando 20% de alcanos ou óleo de girassol como fonte de carbono e utilizando *Y. lipolytica*. Portanto, processos envolvendo essa espécie e substratos renováveis de baixo custo como óleos de plantas, gordura e glicerol estão sendo desenvolvidos. Um processo de produção de ácido cítrico a partir de óleo de colza foi introduzido recentemente pela companhia Archer Daniels Midland (Decatur, III., USA) (BARTH *et al*., 2003; FICKERS *et al*., 2005).

AKIYAMA *et al*. (1973) obtiveram um rendimento de 130% em relação ao substrato (p/p) e uma razão de 60:40 (cítrico e isocítrico) com *Y. lipolytica* ATCC 20114 em n-alcanos como fonte de carbono. Quando foi adicionado monofluoroacetato ao meio de cultivo, esse composto foi transformado em monofluorocitrato, que inibiu completamente a aconitase, aumentando a razão de citrato:isocitrato para 85:15. O rendimento da produção de ácido cítrico de *Y. lipolytica* (NRRL Y-1095) em glicose variou de 0,38-0,77 g/g, dependendo da concentração de biomassa e nitrogênio (NH_4Cl e extrato de lêvedo) (RANE E SIMS, 1996). FÖRSTER *et al*. (2007) utilizaram uma cepa de *Y. lipolytica* recombinante para produzir ácido cítrico em sacarose, inserindo o gene ScSUC2 de *S. cerevisiae* que expressa invertase. A expressão de invertase foi aumentada em pH 6,0 e resultou na produção de 127-140 g/L de ácido cítrico e rendimento de 0,75-0,82 g/g.

MORGUNOV *et al*. (2004) investigaram o mecanismo de acúmulo de ácido cítrico pela levedura *Y. lipolytica* crescendo na presença de glicose e deficiência de nitrogênio. A limitação do crescimento da levedura pela fonte de nitrogênio diminui o conteúdo total de nucleotídeos e aumentou as razões de ATP/AMP e $NADH/NAD^+$. A isocitrato desidrogenase, NAD^+-dependente, uma enzima que tem um papel importante no ciclo do ácido tricarboxílico, foi isolada de *Y. lipolytica* e o efeito de alguns intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico na atividade dessa enzima sugere que o

aumento da excreção de ácido cítrico pode ser causado pela inibição da isocitrato desidrogenase devido à redução do conteúdo de AMP e aumento da razão $NADH/NAD^+$ nas células em limitação de nitrogênio.

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa tentaram alterar o meio de crescimento da cepa *Yarrowia lipolytica* a fim de aumentar a produção de ácido cítrico (VENTER *et al*., 2004). Através da adição de acetato de sódio na proporção de 1:3 em relação à massa de óleo de girassol, que foi a fonte de carbono utilizada, foi possível aumentar a proporção de ácido cítrico:ácido isocítrico significativamente de 1,7:1 na ausência de acetato para 3,7:1 na presença de acetato após 240 h de crescimento de *Yarrowia lipolytica* UOFS Y-1701 (VENTER *et al*., 2004).

Com o objetivo de descrever uma alternativa para valorizar o glicerol produzido como o principal subproduto da produção do biodiesel, PAPANIKOLAOU *et al*. (2002) investigaram a resposta bioquímica de *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 crescida neste substrato em alta razão carbono-nitrogênio para produzir produtos metabólitos de grande valor industrial. O principal ácido orgânico produzido foi ácido cítrico, que aumentou quando o meio de crescimento utilizado foi tamponado. Outros ácido orgânicos produzidos em baixas quantidades foram isocítrico, acético e α-cetoglutárico. Para aumentar a produção de ácido cítrico, o crescimento de *Yarrowia lipolytica* foi conduzido em meio com alta concentração de glicerol proveniente do biodiesel (80 e 120 g/L) e com alta altas razões molares de C/N. O resultado foi satisfatório uma vez que a concentração de ácido cítrico aumentou para 33 e 35 g/L com rendimento de 0,44 e 0,42 g/g de glicerol consumido. PAPANIKOLAOU *et al*. (2002) também investigaram a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 em meio contendo glicose que pode ser considerada como o substrato de referência e é amplamente empregada na literatura. A produção de ácido cítrico foi similar em ambos os substratos utilizados.

Yarrowia lipolytica, quando cresce sob condições limitantes de nutrientes, é capaz de produzir ácido cítrico (KAMZOLOVA *et al*., 2003; LEVINSON *et al*., 2007). O grande desafio neste processo, portanto, é minimizar a produção simultânea de ácido isocítrico através da otimização das condições de meio de cultivo e operacionais, otimizar a tecnologia de fermentação e estudar a cinética de crescimento e produção de ácido cítrico. As vias bioquímicas envolvidas na regulação da produção de ácidos cítrico e isocítrico por leveduras têm sido estudadas. Uma excessiva produção de ácido cítrico e isocítrico foi observada sob limitação de crescimento por nitrogênio ou outros componentes minerais como enxofre, fósforo e magnésio (RYMOWICZ *et al*., 2008)

LEVINSON *et al.* (2007) examinaram 27 cepas de *Yarrowia lipolítica* bem como 5 cepas de três outras espécies de *Yarrowia* (*Aciculoconidium aculeatum*,

Candida hispaniensis e *Candida bentonensis*) na produção de ácido cítrico utilizando glicerol puro como fonte de carbono. As culturas foram crescidas em condições limitantes de nitrogênio. Nenhuma das 5 cepas de outras espécies produziram ácido cítrico, porém todas as cepas de *Yarrowia lipolítica* foram capazes de produzir ácido cítrico em concentrações diferentes. A produção maior foi obtida por *Y. lipolytica* NRRL YB-423, que alcançou 21,6 g/L de ácido cítrico a partir de 40 g/L de glicerol (54% de rendimento). A proporção de ácido cítrico e ácido isocítrico produzida por esta cepa foi 11,3:1 enquanto que as outras cepas de *Y. lipolytica* produziram uma proporção entre 2:1 e 6:1 nas mesmas condições de trabalho. O meio de crescimento para a cepa *Y. lipolytica* NRRL YB-423 foi otimizado variando a razão carbono e nitrogênio com o objetivo de aumentar a proporção de ácido cítrico e ácido isocítrico e foi concluído que o melhor resultado foi obtido na razão C/N de 343-686.

RYMOWICZ *et al*. (2006) examinaram a capacidade de biosíntese de ácido cítrico por 3 cepas mutantes de *Yarrowia lipolytica*: AWG-7, 1.31 e K-1 utilizando glicerol proveniente do biodiesel com o objetivo de selecionar a melhor produtora e comparar os parâmetros cinéticos da biosíntese de ácido cítrico. Os resultados mostraram que a produção de ácido cítrico por estas leveduras está relacionada com as condições limitantes de nitrogênio com excesso de fonte de carbono (200 g/L). A viabilidade celular destas leveduras não foi inibida pelo excesso de substrato, comportamento similar observado usando *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 (PAPANIKOLAOU *et al*., 2003). Este comportamento não foi observado em *Candida curvata* D, cujo meio de crescimento com alto valor de glicerol (120 g/L) inibiu seu crescimento quase completamente (MEESTERS *et al*., 1996). Foi observado que a produção dos ácidos cítrico e isocítrico iniciou após o crescimento exponencial cessar (após 17 – 20 h de cultivo) para as 3 cepas mutantes. A mais alta taxa específica de produção de ácido cítrico (0,05 g/g.h) e o maior rendimento de ácido cítrico em termos de consumo de glicerol (0,62 g/g) foram alcançados usando a cepa 1.31, que obteve uma concentração de 124,5 g/L de ácido cítrico. A quantidade de ácido isocítrico produzida por esta cepa foi menor em relação às outras duas cepas, que foi apenas de 3,9 g/L. Portanto, esta cepa mutante de Y*arrowia lipolytica* pode ser de interesse industrial.

Altas concentrações finais de ácido cítrico variando de 105,4 g/L para 116,8 g/L foram obtidas por ARZUMANOV *et al*.(2000) em batelada e em repetições de batelada utilizando *Yarrowia lipolytica* e etanol como substrato e 120 g/L de ácido cítrico foram produzidas usando etanol por KAMZOLOVA *et al*. (2003). KAMZOLOVA *et al.* (2005) produziram cerca de 135 g/L de ácido cítrico com a cepa *Y. lipolytica* 187/1 que utilizou gordura de vegetais como substrato. Neste caso, quantidades significativas de lipase extracelular foram produzidas simultaneamente.

2.2. Produção Microbiana de Ácidos Orgânicos

2.2.1. Produção de Ácido Cítrico

O ácido cítrico ou citrato de hidrogênio, de nome oficial ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, é um ácido orgânico tricarboxílico fraco, que se pode encontrar na maioria das frutas, sobretudo em cítricos como o limão e a laranja (GREWAL E KALRA, 1995). É usado como conservante natural (antioxidante), sendo conhecido também como acidulante INS 330, dando um sabor ácido e refrescante na preparação de alimentos e de bebidas. Além disso, o ácido cítrico é usado como produto de limpeza ecológico. É um intermediário do ciclo de Krebs e mantém uma posição chave no metabolismo de cada célula microbiana (RYMOWICZ *et al*., 2008). Sua formula química é $C_6H_8O_7$ conforme ilustrado na Figura 2.1.

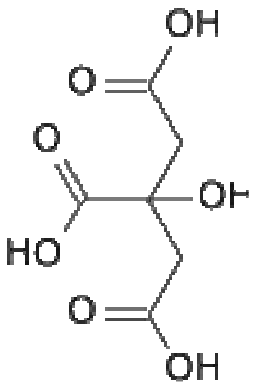

Figura 2.1. Representação da estrutura química do ácido cítrico

A acidez do ácido cítrico se dá pelos três grupos carboxilas (-COOH) que podem perder um próton em soluções. Como consequência forma-se um íon citrato. Os citratos são bons controladores de pH de soluções ácidas. Os íons citratos formam sais denominados citratos com íons metálicos. O citrato de cálcio é um importante citrato, que se utiliza geralmente na preservação e condimentação dos alimentos. Além disso, os citratos podem quelar íons metálicos e utilizá-los como conservantes e suavizadores de água.

Na temperatura ambiente, o ácido cítrico é um pó cristalino branco. Pode existir na forma anidra (sem água) e como monohidrato que contém uma molécula de água para cada molécula de ácido cítrico. A forma anidra se cristaliza em água quente, enquanto a forma monohidratada do ácido cítrico se cristaliza em água fria. O monohidrato pode ser convertido na forma anidra aquecendo-se acima de 74°C. Quimicamente, o ácido cítrico compartilha as características de outros ácidos carboxílicos. Quando aquecido acima de 175°C, se decompõem produzindo dióxido de carbono e água.

A descoberta do ácido cítrico é atribuída ao alquimista islâmico Jabir Ibn Hayyan no oitavo século depois de Cristo. Os eruditos medievais na Europa conheciam a natureza ácida dos sumos de limão e da lima; tal conhecimento está registrado na décima terceira enciclopédia Speculum Majus, recompilada por Vincent de Beauvais. O ácido cítrico foi o primeiro ácido isolado em 1784 pelo químico sueco Karl Wilhelm Scheele, que o cristalizou a partir do suco do limão. A produção comercial de ácido cítrico começou em 1860, baseado na indústria italiana dos cítricos (GREWAL E KALRA, 1995).

Em 1893, C. Wehmer descobriu que cultivos de *Penicillium* podiam produzir ácido cítrico a partir do açúcar. Entretanto, a produção microbiana do ácido cítrico não chegou a ser industrialmente importante até a Primeira Guerra Mundial, que interrompeu as exportações italianas de limões. Em 1917, o químico americano James Currie descobriu que certos cultivos de *Aspergillus niger* podiam ser produtores eficientes de ácido cítrico através de processo de fermentação em superfície. Anos mais tarde, a indústria Pfizer começa a produção em escala industrial usando esta técnica. Nos anos de 1950, foi desenvolvido nos Estados Unidos da América uma técnica mais eficiente que o processo anterior, a fermentação submersa (GREWAL E KALRA, 1995).

Um dos motivos mais importantes para o sucesso comercial do ácido cítrico é o tamanho do seu mercado. A produção mundial de ácido cítrico ultrapassa 1,4 milhão de tonelada por ano, um número que excede a produção de qualquer outro ácido orgânico obtido por fermentação, sendo os maiores produtores a Europa e os Estados Unidos. O consumo deste ácido cresce ao redor de 4% ao ano, principalmente devido ao seu emprego em alimentos e bebidas. O ácido cítrico é um produto amplamente usado em produtos alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e em outros produtos industriais devido às suas propriedades como acidulantes, conservantes, ajustadores de pH e antioxidantes. É utilizado também como aditivo funcional em detergentes e cosméticos (RYMOWICZ *et al*., 2008) Durante as últimas duas décadas, um significante aumento no uso de citrato de sódio tem sido observada para substituição dos polifosfatos que são nocivos ao meio ambiente (ARZUMANOV *et al*., 2000).

Emprego do citrato:

- cerca de 70% da produção é utilizado pela indústria de alimentos e bebidas; 12% pela indústria farmacêutica e 18% por outras indústrias (RYMOWICZ *et al*., 2008; ARZUMANOV *et al*., 2000; YIGITOGLU, 1992);
- na indústria de alimentos usa-se em larga escala como acidulante por apresentar sabor agradável, baixíssima toxicidade e alta solubilidade. Além disso, esse ácido tem capacidade de complexação com metais pesados como o ferro e o cobre. Essa

propriedade tem conduzido a crescente utilização como estabilizante de óleos e gorduras para reduzir a sua oxidação catalisada por esses metais. Também, essa propriedade aliada ao baixo grau de corrosividade a certos metais, tem permitido seu uso na limpeza de caldeiras e instalações especiais (GREWAL E KALRA, 1995);

- seu emprego em alimentos representa 55-65% do mercado total de acidulantes, contra 20-25% pelo ácido fosfórico e 5% correspondendo ao ácido málico (MAGNUSON E LASURE, 2004);

- na indústria farmacêutica, o ácido cítrico é usado como estabilizante de ácido ascórbico por causa de sua ação quelante. Nos antiácidos e analgésicos efervescentes, o ácido cítrico é usado juntamente com carbonatos e bicarbonatos para gerar CO_2 (GREWAL E KALRA, 1995);

- ésteres de ácido cítrico, como trietil, tributil e acetildibutil, são usados como plastificantes não tóxicos nas películas plásticas de embalagens de alimentos.

Industrialmente, a produção do ácido cítrico se dá através do processo de fermentação submersa e com o uso de espécies de *Aspergillus niger*, tendo sacarose como fonte de carbono (VENTER *et al*., 2004; RYMOWICZ *et al*., 2006). Após separação do micélio por filtração, a recuperação do ácido cítrico é realizada por precipitação ao adicionar hidróxido de cálcio para formar citrato de cálcio e, depois, é adicionado ácido sulfúrico para regenerar o ácido cítrico. A eliminação das impurezas é realizada com carvão ativado ou resinas de troca iônica, continuando com a cristalização do ácido cítrico, secagem ou desidratação, e o empacotamento do produto. Embora leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, espécies de *Rhodotorula*, *Pichia*, e *Hansenula* sejam organismos importantes biotecnologicamente, estas não têm sido consideradas para a produção comercial de ácidos orgânicos. VENTER *et al*. (2004) cita que, segundo GOOD *et al*. (1985) e RANE E SIMS (1993), leveduras como *Yarrowia lipolytica*, *Candida tropicalis* e algumas *Rhodotorula spp*. têm a habilidade para produzir ácido cítrico de várias fontes de carbono, que incluem óleos comestíveis.

Devido ao aumento da demanda por ácido cítrico, processos alternativos de cultivo envolvendo cepas de levedura estão sendo usados para sua produção. Especificamente *Yarrowia lipolytica*, *C. guillermondii* e *C. oleophila* têm sido aplicadas para a produção de ácido cítrico usando várias fontes renováveis ou residuos como substratos. Típicas fontes de carbono são glicose (pura ou industrial), melaço, etanol industrial, metanol, η-hidrocarbonetos, óleo de canola ou mistura de ácidos graxos saturados de origem animal e glicerol do biodiesel (RYMOWICZ *et al*., 2006; FINOGENOVA *et al*., 2005). A produção de ácido cítrico utilizando estes substratos é normalmente conduzida em reatores em batelada, batelada alimentada ou em sistema contínuo (RYMOWICZ *et al*., 2006; ANASTASSIADIS & REHM, 2006). Contudo, as

únicas espécies conhecidas que são capazes de maximizar a produção de ácido cítrico destes substratos são as cepas selvagens e mutantes de *Y. lipolytica*. Essa levedura bem como o fungo *A. niger* são considerados como produtores potenciais de ácido cítrico. Sob certas condições de fermentação, leveduras como *Yarrowia lipolytica* produzem ácido cítrico em grandes quantidades (RYMOWICZ *et al*., 2008). O uso de leveduras do gênero *Candida* ou *Yarrowia* apresenta algumas vantagens em relação ao fungo filamentoso: maior tolerância a altas concentrações de substratos, maior taxa de conversão, maior produtividade, melhor controle do processo devido à natureza unicelular da levedura, e ainda se apresenta como uma alternativa para as indústrias sucro-alcooleiras (FICKERS *et al*., 2005). Uma desvantagem deste processo é a quantidade significativa de ácido isocítrico produzida durante a fermentação, que pode atingir níveis acima de 50% do total de ácido produzido (RYMOWICZ *et al*., 2006; ANASTASSIADIS *et al*., 2002; VENTER *et al*., 2004). De acordo com VENTER *et al*. (2004), foi constatado por ROEHR *et al*. (1996) que a produção de ácido isocítrico é influenciada pelo tipo de microrganismo, fonte de carbono e concentração dos micronutrientes acessíveis à levedura.

Segundo RYMOWICZ *et al*. (2006), ANASTASSIADIS E RHEM (2006) produziram de 30 a 90 g/L de ácido cítrico durante o cultivo de *C. oleophila* ATCC 20177 em sistema contínuo em glicose, enquanto em sistema em batelada e em batelada alimentada produziram entre 140 e 160 g/L de ácido cítrico.

2.2.2. Produção de Ácido Pirúvico

Ácido pirúvico, também conhecido como ácido 2-oxopropanóico, ácido α-cetopropiônico ou ácido acetilfórmico, é um dos α-oxocarboxílicos mais importantes. Este ácido tem um papel central no metabolismo energético de organismos vivos e industrialmente é usado como matéria-prima na biossíntese de fármacos como L-triptofano, L-tirosina e alanina, assim como L-DOPA (LI *et al*., 2001). Também é utilizado na produção de polímeros, cosméticos e aditivos alimentícios. Piruvato de cálcio tem forte efeito na redução de gordura, pois pode acelerar o metabolismo de ácidos graxos no corpo humano (ROUFS, 1996). Como é usado nas indústrias de fármacos, agro-química, química e de alimentos, a demanda comercial de ácido pirúvico tem se expandido (LI *et al*., 2001). A Figura 2.2 apresenta a representação de sua estrutura química.

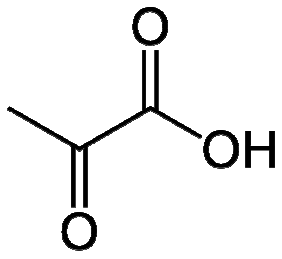

Figura 2.2. Representação da estrutura química do ácido pirúvico

Em escala industrial o ácido pirúvico é produzido pela desidratação e descarboxilação do ácido tartárico. Esse é um processo simples, mas não efetivo em termos de custo, pois o custo total é estimado em US$ 8000-9000 por tonelada (LI *et al*., 2001). O ácido pirúvico é, portanto, muito caro para ser usado largamente. Comparando com o método químico, a produção de ácido pirúvico através de métodos biotecnológicos pode ser vista como uma alternativa de reduzir o custo de produção. Existem 3 métodos biotecnológicos para produção de piruvato: a fermentação, o método de "resting cells" e o método enzimático. Como o piruvato é um intermediário vital do metabolismo celular, geralmente é difícil obter cepas selvagens que acumulem grandes quantidades de piruvato extracelular.

Algumas cepas de levedura, pertencentes ao gênero *Torulopsis*, que produzem mais de 50 g/L de piruvato foram identificadas por alguns pesquisadores das Indústrias *Toray*. A produção de piruvato utilizando processos fermentativos, com escala de 400 toneladas por ano, foi industrializada pelas Indústrias *Toray* em 1992 e a fermentação sofreu aumento de escala para fermentadores de 50 m^3 (LI *et al*., 2001).

2.2.3. Produção de Ácido α-Cetoglutárico

O ácido α-cetoglutárico tem uma posição chave no metabolismo de células microbianas. É um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico e é o composto principal do metabolismo de proteínas e aminoácidos. A Figura 2.3 apresenta a representação de sua estrutura química.

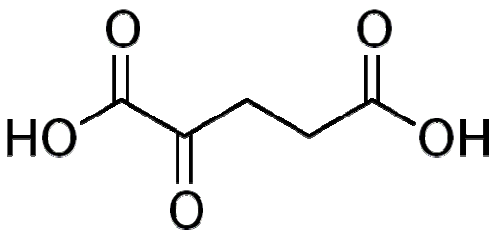

Figura 2.3. Representação da estrutura química do ácido α-cetoglutárico.

Descobriu-se que um grande grupo de bactérias e leveduras tem habilidade de sintetizar o ácido α-cetoglutárico. Foram realizados diversos estudos cinéticos da biossíntese de ácido α-cetoglutárico por bactérias. Os melhores microrganismos produtores desse ácido até os anos 60 eram as espécies de *Pseudomonas*, além de *Bacterium ketoglutaricum, Aerobacter aerogenes* e *Serratia marcescens.* As condições necessárias para a superprodução de ácido α-cetoglutárico eram alta concentração da fonte de carbono no meio de cultivo e limitação da concentração de nitrogênio (C:N de 40:1 para 400:1) (KOSHELEVA *et al*., 1967).

Com os estudos de produção de proteínas de organismos unicelulares (*Single cell protein*) a partir de *n*-alcanos, descobriu-se a habilidade da levedura *Yarrowia lipolytica* em produzir o ácido α-cetoglutárico e então se iniciaram os estudos de produção desse intermediário metabólico por leveduras. A levedura *Yarrowia lipolytica* não é capaz de sintetizar a estrutura pirimidínica da molécula de tiamina, necessitando que essa vitamina seja adicionada ao meio de cultivo. Na presença de fontes de carbono diferentes e em quantidade suficiente de tiamina, ou seja, quando a tiamina não é o fator limitante, as leveduras não conseguem produzir o ácido α-cetoglutárico. No entanto, quando a fonte de carbono é abundante no meio de cultivo e em concentrações limitantes em tiamina, o substrato é oxidado e o ácido α-cetoglutárico é produzido (FINOGENOVA *et al*., 2005).

CHERNYAVSKAYA *et al*. (2000) estudaram a produção do ácido α-cetoglutárico a partir de etanol por *Y. lipolytica*. As principais condições que afetaram a superprodução do ácido foram: a concentração de tiamina no meio de cultivo e nas células, a concentração de nitrogênio e oxigênio no meio e o valor de pH. Foi obtida uma concentração de 49 g/L de ácido α -cetoglutárico e um rendimento em etanol consumido de 42%. Baseado nas análises das atividades das enzimas-chave do metabolismo de etanol e síntese de ácido α -cetoglutárico, os autores sugeriram um mecanismo para a biossíntese do ácido pela levedura *Y. lipolytica* (Figura 2.4). Quando as células crescem com deficiência em tiamina no meio de cultivo, com alta concentração de NH_4^+, o metabolismo da fonte de carbono ainda ocorre, mas o processo reprodutivo é reprimido. Isso faz com que as células tentem desfazer (neutralizar) o excesso de nitrogênio (que pode ser tóxico para as células), através da síntese de aminoácidos ou suas aminas. A enzima-chave do metabolismo de nitrogênio é a glutamato-desidrogenase e seus substratos são o ácido α-cetoglutárico, NAD(P)H e NH_4^+. Portanto, sob condições de limitação em tiamina, a produção de ácido α-cetoglutárico reflete o fluxo ilimitado de substrato por glutamato-desidrogenase.

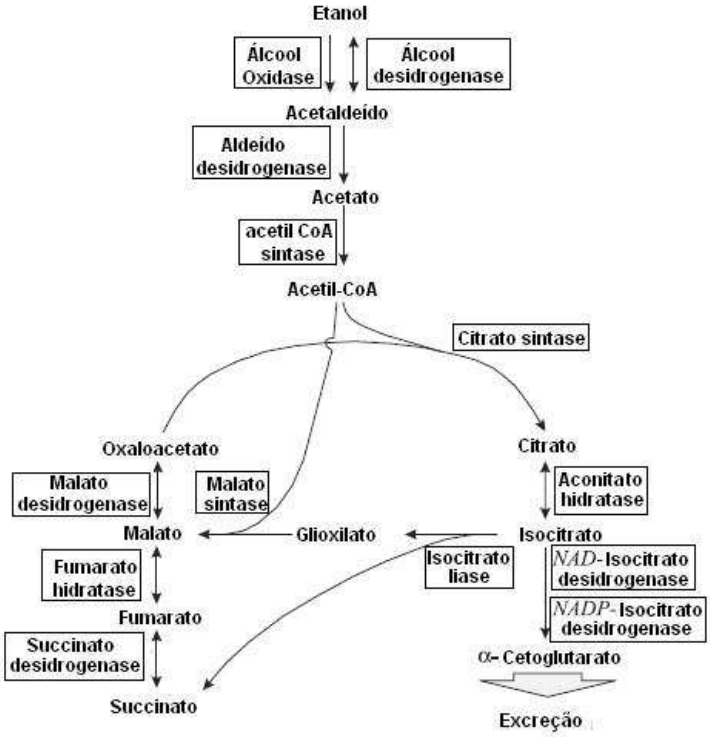

Figura 2.4. Mecanismo de superprodução de ácido α -cetoglutárico por *Yarrowia lipolytica* a partir de etanol (Modificado de CHERNYAVSKAYA *et al.*, 2000).

2.3. Utilização de Glicerol como Fonte de Carbono

2.3.1. Generalidades sobre o Glicerol

Glicerol é um produto químico bem conhecido há mais de dois séculos. Foi descoberto em 1783 pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele quando tratou óleos naturais com materiais alcalinos. Ele observou a formação de um líquido que tinha um sabor muito doce. Contudo, a descoberta desta substância não gerou grande impacto na área científica ou industrial. Somente em 1811, o químico Michel Eugene Chevrel nomeou esta substância por glicerol, cuja origem é da palavra grega "glykos" que significa doce (BEHR *et al*., 2007). Em 1866, a primeira utilização industrial do glicerol foi na produção de trinitrato de glicerol, que é utilizado na fabricação de dinamite. No final do século XIX, a produção de glicerol aumentou continuamente (BEHR *et al*., 2007).

O glicerol é um poliálcool de fórmula estrutural apresentada na Figura 2.5. Geralmente se encontra como um triglicerídeo combinado como, por exemplo, a ácidos graxos como os ácidos: oléico, palmítico e esteárico. O termo glicerol aplica-se somente ao composto puro, 1,2,3 propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se à misturas que contém normalmente quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol (ARRUDA *et al*., 2007).

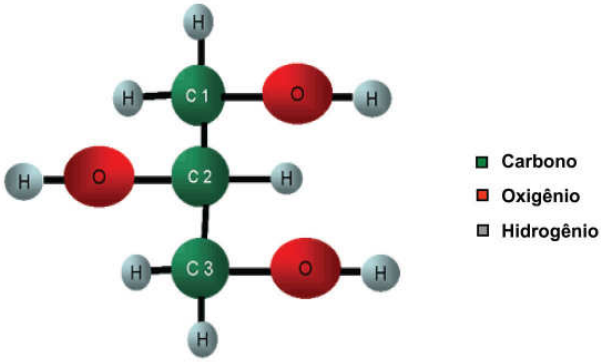

Figura 2.5. Representação da estrutura química do glicerol

Tradicionalmente, o glicerol é produzido por saponificação de óleos, gorduras ou sebos utilizando lixívias alcalinas, sendo obtido como subproduto na fabricação de sabão. No entanto, esse processo não tem sido mais utilizado industrialmente devido à substituição do sabão por detergentes (ARRUDA *et al*., 2007; DA SILVA *et al*., 2009). A sua obtenção pode ser também a partir de derivados do petróleo por cloração a altas temperaturas, mas devido à formação de subprodutos prejudiciais ao meio ambiente essa rota entrou em declínio. Uma outra via de sua obtenção é a hidrogenação da sacarose na presença de um catalisador a alta pressão e temperatura (ARRUDA *et al*., 2007). Glicerol também pode ser produzido por fermentação microbiana (DA SILVA *et al*., 2009) e pode se tornar uma matéria-prima importante quando o biodiesel começar a ser produzido em larga escala.

Glicerol é um produto químico usado em cosméticos, sabonetes líquidos, alimentos, produtos farmacêuticos, lubrificantes, soluções anticongelantes, tabaco e em muitas outras aplicações (CHOTANI *et al*., 2000; DA SILVA *et al*., 2009). Novas aplicações estão sendo avaliadas na indústria de alimentos, na indústria de poliglicerol e poliuretano e na produção de pequenas moléculas como dihidroxiacetona, ácidos glicérico, hidroxipirúvico e carbonato de glicerol (DA SILVA *et al.*, 2009). No futuro, glicerol poderá ser considerado como fonte para novas fermentações industriais (DA SILVA *et al*., 2009). Uma das principais promessas de aplicação do glicerol é na bioconversão para compostos de alto valor através de fermentação microbiológica. Glicerol é barato, abundante e possui grau de redução mais elevado que açúcares oferecendo a oportunidade de obter compostos reduzidos como succinato, etanol, xilitol, propionato, hidrogênio, etc, em rendimentos mais altos do que aqueles obtidos utilizando como fonte de carbono açúcares (DA SILVA *et al*., 2009). Glicerol é um atrativo substrato como fonte de carbono para conversão biológica porque ele está disponível a partir de recursos renováveis em grandes quantidades e podem ser utilizados por um número grande de microrganismos (LEE *et al*., 2001). A Figura 2.6 mostra algumas aplicações para o glicerol.

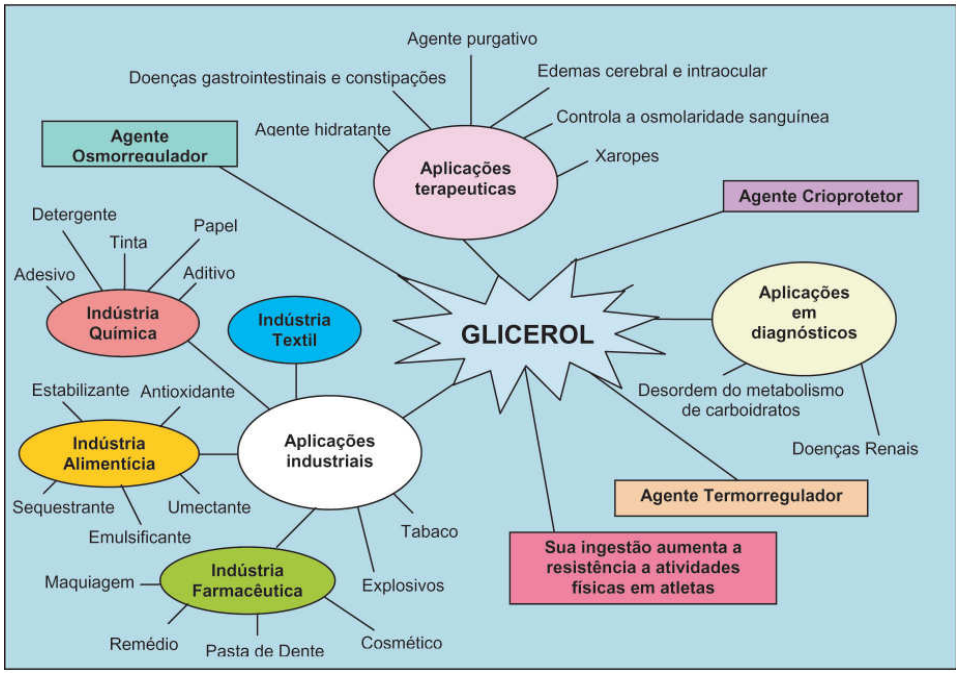

Figura 2.6. Aplicações para uso de glicerol (ARRUDA *et al*., 2007)

2.3.2. Glicerol surge como um Subproduto

A alta demanda de energia no mundo industrializado e no setor doméstico, bem como os problemas de poluição causados devido ao vasto uso de combustíveis, têm resultado em uma crescente necessidade de desenvolver fontes de energias renováveis sem limites de duração e de menor impacto ambiental que os meios tradicionais existentes, estimulando, assim, a busca de fontes alternativas para produção de combustíveis (GERIS *et al*., 2007). Como exemplo, tem-se o biodiesel, cuja utilização permite reduzir as emissões de monóxido de carbono, comparados a combustíveis derivados do petróleo. É produzido a partir de óleos vegetais e gorduras animais, através da reação de transesterificação com o etanol ou metanol catalisada por NaOH ou KOH e durante esta reação a cada 10 Kg de biodiesel produzido 1Kg de glicerol se torna disponível (MEESTERS *et al*., 1996; PAPANIKOLAOU *et al*., 2002; THOMPSON *et al*., 2005; MU *et al*., 2006), constituindo o principal subproduto do processo de produção de biodiesel por transesterificação. Ele é obtido sob a forma bruta, cujo valor é muito baixo devido à presença de diversas impurezas (THOMPSON *et al*., 2005). Entretanto, este subproduto constitui uma fonte de matéria-prima para produtos de alto valor agregado, como polímeros, através de conversão química ou bioquímica (rotas fermentativas), e aditivos para combustíveis, como ésteres e éteres de glicerina, que também se apresentam como alternativa rentável para este co-produto (KARINEN *et al*., 2006).

Considerando a necessidade por combustíveis renováveis e o aumento da demanda e produção de biodiesel, um excesso de glicerol será disponibilizado no

mundo e a biocoversão de glicerol adiciona significativo valor à produtividade do biodiesel pelas indústrias (DA SILVA *et al*., 2009).

Como glicerol está sendo continuamente gerado, pesquisadores estão estudando caminhos para sua utilização, reduzindo o custo da produção do biodiesel (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; RYMOWICZ *et al.*, 2006). Glicerol cru produzido em quantidades significativas em vários processos industriais poderiam ser também considerados como substratos potenciais para conversão através de microrganismos. Muitos projetos de pesquisa e estudos estão buscando novas aplicações para o glicerol e suas novas biotransformações para produtos de interesse. A literatura reporta vários trabalhos que estudaram a aplicação de glicerol puro como fonte de carbono para a produção de diversos produtos por diferentes microorganismos.

O mais importante alvo de pesquisa que adiciona valor ao glicerol por meio biotecnológico é na sua biotransformação em 1,3 – propanodiol por várias cepas de bactéria. A produção através de microrganismos de 1,3 – propanodiol por *Citrobacter* e *Clostridium* tem atraído recentemente muita atenção uma vez que apresenta alto potencial em aplicações comerciais, especialmente como monômero de poliesteres, polieter ou poliuretanos (RYMOWICZ *et al*., 2008). MU *et al*. (2006) usaram *Klebisiella pneumoniae* para fermentar glicerol da produção do biodiesel, obtendo uma concentração de 51,3 g/L de 1,3 – propanodiol durante o processo de transesterificação de óleo de soja com metanol na presença de uma base forte (KOH) e 53 g/L de 1,3 – propanodiol utilizando lípase como catalisador da reação. A produtividade de 1,7g/L.h em glicerol proveniente da produção do biodiesel foi comparável a 2 g/L.h produzido por glicerol puro. O subproduto da produção do biodiesel pode ser diretamente convertido a 1,3 propanodiol sem prévia purificação, simplificando o processo e reduzindo o custo operacional.

Uma alternativa para adicionar valor se refere a sua biotransformação em produtos como α-amilase por *Yarrowia lipolytica* recombinante (KIM *et al*., 2000; RYMOWICZ *et al*., 2008), ácido succínico por *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (LEE *et al*., 2001), single-cell-oil por *Cryptococcus curvatus* (MEESTERS *et al*., 1996), hidrogênio e etanol por *Enterobacter aerogenes* em um meio contendo biodiesel com glicerol a 80 mM, (ITO *et al*., 2005), e ácido propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* (BARBIRATO *et al*., 1997). PAPANIKOLAOU *et al*. (2008) investigaram a produção de *single cell oil* por *Mortierella isabellina* ATHUM 2935 em glicerol gerado na produção do biodiesel. Quando alta concentração de glicerol foi empregado (100 g/L), 4,4 g/L de lipídeos foram acumulados correspondendo a 51% (m/m) de lipídeo em peso seco. ASHBY *et al*. (2005) avaliaram a aplicação do subproduto da produção do biodiesel na produção de soforolipídeos a partir de *Candida*

bombicola. Um rendimento de 60 g/L de biossurfactante foi obtido. SOUSA *et al*. (2007) estudaram a conversão da fase glicerinosa em biossurfactantes por *P. aeruginosa*. O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial da água em até 54,70%.

RYMOWICZ *et al*. (2008) mostraram que a cepa mutante *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K 1 produziu largas quantidades de ácido cítrico e eritritol baseado no glicerol da produção do biodiesel como substrato. Eritritol e ácido cítrico são amplamente utilizados pela indústria de alimentos, por isso a sua produção em larga escala a partir de uma fonte de carbono barata através de fermentação é de grande interesse. Eritritol é um açúcar poliol, não cariogênico, não calórico (1,254 KJ g^{-1}), adoçante e é seguro para o consumo por diabéticos (IMANDI *et al*., 2007). É de conhecimento que o catabolismo de glicerol por leveduras estritamente aeróbia ocorre somente via glicólise Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). A via glicerol kinase é responsável pela degradação do glicerol. A via catabólica de glicerol inclui fosforilação por glicerol kinase e uma subseqüente oxidação por um flavin adenina dinucleotídeo (FAD)-dependente glicerol 3-fosfato dehidrogenase, localizada na superfície externa da membrana mitocondrial. A dihidroxiacetona fosfato formada inicia a via glicolítica. A simultânea produção de ácido cítrico e eritritol por *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 em glicerol cru deve ser considerada como uma abordagem interessante para a utilização deste material para fins biotecnológicos. O efeito da concentração inicial de glicerol no crescimento e metabolismo desta cepa mutante permanece desconhecido (RYMOWICZ *et al*., 2008).

Alguns estudos apontam a utilização de glicerol como fonte de carbono para a produção de pigmentos, como prodigiosina e astaxantina. TAO *et al*. (2005) demonstraram que glicerol permite a alta produção de prodigiosina quando usado como fonte de carbono, produzindo 583 mg prodigiosina/L em 30 h. KUSDIYANTINI *et al*. (1998) demonstraram que glicerol é um substrato de grande potencial para a produção de astaxantina em *Phaffia rhodozyma*, obtendo uma concentração volumétrica máxima de 33,7 mg/L.

Uma vez que foi constado pelos autores citados no texto que cepas de *Yarrowia lipolytica* têm capacidade de sintetisar e excretar no meio de cultivo ácido cítrico a partir de glicerol como fonte de carbono, foi proposto a tentativa de produzir ácido cítrico por *Yarrowia lipoytica* IMUFRJ 50682 utilizando glicerol PA e glicerol gerado na produção de biodiesel.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram: peptona e extrato de lêvedo (*Oxoid* - Hampshire, UK), glicose (*Reagen* – R.J., Brasil), agar-agar, sulfato de amônio e glicerol (Vetec – R.J., Brasil). Os *kits* enzimáticos para dosagem dos ácidos cítrico e isocítrico foram fornecidos pela R-BIOPHARM. A glicerina bruta foi gentilmente cedida pelo Sr. Carlos Khalil (M.Sc.), consultor Sênior do CENPES Petrobras.

3.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises foram:

1) Centrífuga *Fanem* modelo *204-NR*;

2) Centrífuga *Sigma 2K 15*;

3) Espectrofotômetro *Hach DR/4000 UV*;

4) Capela de fluxo laminar equipada com luz UV – *Labconco*;

5) Incubador com agitação (*shaker*) *Certomat BS-1*;

6) Incubador com agitação (*shaker*) (Tecnal Digimec BTC9090)

7) HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*), *Waters 1525;*

8) Microscópio ótico *Olympus*, modelo BX51;

9) pHmetro DM-22 Digimed.

10) Sonicador Ultrasonic Cleaner Odontobrás

3.3. Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente trabalho é uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (Figura 3.1) selecionada de um estuário no Rio de Janeiro, Brasil (HAEGLER & MENDONÇA-HAEGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

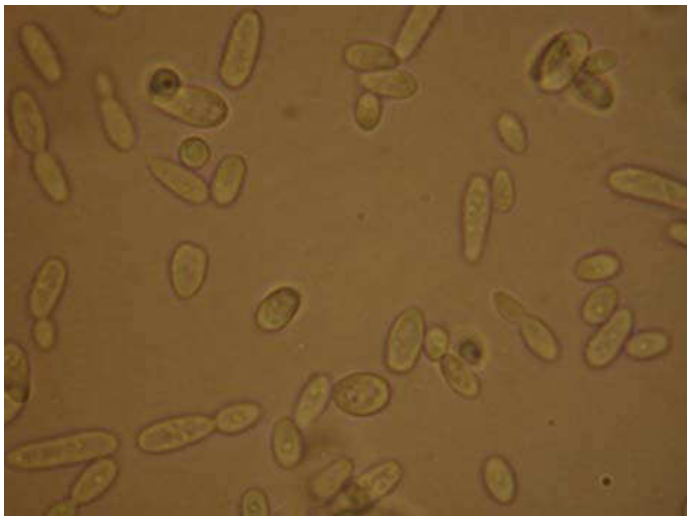

Figura 3.1. Morfologia microscópica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. (FONTES, 2008)

3.4. Manutenção da cultura

As células foram conservadas a 4ºC após 24 horas de crescimento na temperatura de 28ºC em tubos de ensaio com meio YPD ("***Y****east Extract*, ***P****eptone*, ***D****extrose*") contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2%, solidificado com agar 2%.

3.5. Obtenção do inóculo

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item 3.4) inoculava-se, de forma estéril com uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL que era incubado em um agitador rotatório a 28ºC, 160 rpm de agitação por 72 h. Após este período, a absorvância (570 nm) de uma amostra deste cultivo era determinada e, em seguida, as células eram centrifugadas de forma estéril a 3.000 *g* por 5 minutos e resuspensas, servindo de inóculo dos experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, 1,0 ± 0,1 mg p.s.cel/mL nos meios de cultivo.

3.6. Esterilização de meios de cultura e instrumentos

Todos os meios sintéticos, assim como os instrumentos utilizados no manuseio do meio de cultivo, foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 15 minutos.

3.7. Otimização da produção de ácido cítrico

3.7.1 Amostragem

Em todos os experimentos realizados para produção de ácido cítrico foram realizadas duas amostragens por dia durante 5 dias de cultivo. O procedimento consistia em retirar duas amostras do meio de produção: uma era diluída para leitura da absorvância em espectrofotômetro e obtenção da concentração celular, e a outra alíquota (5 mL) era centrifugada, sendo ambas retiradas com o auxílio de pipetas estéreis e de forma asséptica em câmara de fluxo laminar. A amostra era centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos, sendo o sobrenadante congelado (-4ºC) para posterior análise da produção de ácido cítrico, produção de ácido isocítrico e determinação do pH.

3.7.2. Experimentos Preliminares

Experimentos preliminares foram realizados com meios de cultivo com composição descrita na Tabela 3.1, utilizando água destilada, água Milliq ou meio mineral não tamponado. O meio mineral era composto de (em g/L): KH_2PO_4, 12; $Na_2HPO_4.7H_2O$, 12; $MgSO_4.7H_2O$, 1,5; $CaCl_2.2H_2O$, 0,15; $FeCl_3.6H_2O$, 0,15; $ZnSO_4.7H_2O$, 0,02; $MnSO_4.H_2O$, 0,06.

Esses experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1 litro contendo 400 mL de meio de cultivo e inoculados, com células cultivadas em meio YPD como descrito no item 3.5, em uma concentração de 1mg (peso seco de células)/mL e incubados a 28ºC (BARTH & GAILLARDIN, 1997) em um incubador rotatório (*shaker*) (Tecnal Digimec BTC9090) a 250 rpm por 5 dias.

Tabela 3.1 – Meios de cultivo utilizados no crescimento celular e produção de ácidos orgânicos por *Yarrowia lipolytica*.

Meios	Glicerol PA (g/L)	Extrato de lêvedo (g/L)	Sulfato de amônio (g/L)	Peptona (g/L)	Água*	Meio Mineral
Meio 1	20	10	0	6,4	qsp	
Meio 2	20	4	0	2,6	qsp	
Meio 3	20	0	10	0		qsp
Meio 4	20	0	4	0		qsp

*** Utilizou-se água destilada na primeira batelada de experimentos e, de forma a obter uma água com menos impurezas, uma segunda batelada de experimentos foi realizada com água Milliq**

3.7.3. Análise Fatorial Fracionada

Para selecionar a melhor composição do meio de cultivo e agitação para a produção de ácido cítrico foi aplicado o método do planejamento fatorial fracionado 2^{k-1}, com k = 4, com o uso do programa de computação de estatística, *Statística* versão 7.0. Os fatores fixados e adotados como variáveis independentes foram concentração de glicerol PA, concentração de extrato de lêvedo, concentração de sulfato de amônio e agitação (Tabela 3.2).

Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL de meio de cultivo, a 28 ºC (BARTH & GAILLARDIN, 1997) em incubador rotatório (*shaker*) por 5 dias com amostragem diária de crescimento celular, pH e dosagem de ácido cítrico.

A variável de resposta utilizada para a seleção das melhores condições foi a máxima concentração de ácido cítrico e a produtividade.

Tabela 3.2- Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental 2^{k-1}, com k=4

	Nível		
Variáveis Independentes	**-1**	**0**	**1**
Concentração de Glicerol PA (g/L)	40	120	200
Concentração de Extrato de lêvedo (g/L)	0,5	5,25	10
Concentração de Sulfato de amônio (g/L)	0	5	10
Agitação (rpm)	160	205	250

A Tabela 3.3 apresenta os experimentos realizados no planejamento experimental. Três pontos centrais foram realizados. Os meios de cultivo foram preparados com os componentes do meio mineral (não tamponado) descrito no item 3.7.2.

Tabela 3.3 – Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0 Código das variáveis independentes do planejamento experimental 2^{k-1}, sendo k = 4.

Ensaio	Glicerol PA	Lêvedo	$(NH_4)_2SO_4$	Agitação
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

3.7.4. Estudo da influência do meio tamponado na produção de ácido cítrico

Foram realizados ensaios em meio mineral tamponado para avaliar a influência deste na produção de ácido cítrico. A composição do novo meio mineral tamponado consiste de KH_2PO_4: 12 g/L; $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$: 22,66 g/L; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$: 1,5 g/L; $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$: 0,2 g/L; $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$: 0,15 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$: 0,02 g/L; $MnSO_4 \cdot H_2O$: 0,06 g/L. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL de meio de cultivo, a 28ºC (BARTH & GAILLARDIN, 1997) em incubador rotatório (*shaker*) por 5 dias.

3.8. Produção de ácido cítrico utilizando fonte de carbono de origem renovável

3.8.1. Subproduto da produção de biodiesel

A fase glicerinosa resultante da transesterificação do óleo de soja e etanol por via catalítica alcalina, cedida gentilmente pelo Sr. Carlos Khalil (M.Sc.), consultor Sênior do CENPES Petrobras, foi utilizada para produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*. Foi utilizada para os experimentos a glicerina bruta (pré-tratada).

Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 1000 mL com 400 mL de meio líquido, a 28ºC (BARTH & GAILLARDIN, 1997) em incubador rotatório (*shaker*), por 5 dias, e a cada 24 horas duas alíquotas eram retiradas.

3.8.1.1. Pré-tratamento Glicerina Bruta

O pH da fase glicerinosa, que inicialmente era 9,41 foi corrigido com H_2SO_4 (N) para 6,23 a fim de eliminar a alcalinidade livre. Em seguida, foi submetida a aquecimento sob agitação, para eliminação do etanol, até 120ºC durante ±1 hora, ou até cessar a formação de espuma. O sulfato resultante da neutralização foi separado por decantação em funil de separação durante um tempo de espera de 24 horas.

3.9. Métodos Analíticos

3.9.1. Quantificação do crescimento celular

O crescimento celular foi determinado em espectrofotômetro Hach DR/4000 UV por medidas de densidade óptica a 570nm e esses valores foram convertidos para mg p.s./mL usando-se um fator de conversão previamente determinado pela curva de peso seco, que é apresentada na Figura 3.2. A curva de peso seco *versus* absorvância é obtida

usando-se uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) NaCl). Desta suspensão, retira-se uma amostra (10 mL), que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 μm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas e então o valor de absorbância para cada concentração é obtido em espectrofotômetro a 570 nm.

O crescimento celular dos experimentos realizados com meio constituído com glicerol proveniente do processo de produção de biodiesel foi determinado por peso seco. Uma amostra de 5 mL é retirada, filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 μm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. O peso foi obtido por diferença entre o peso final e o peso inicial do papel de filtro.

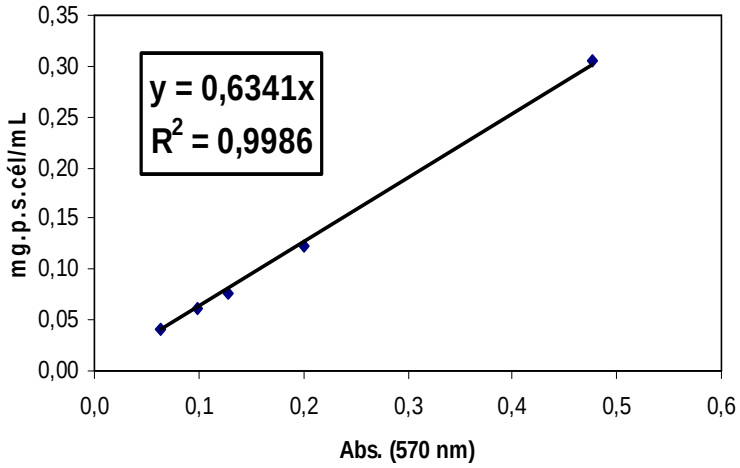

Figura 3.2. Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000.

3.9.2. Determinação dos ácidos orgânicos

3.9.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação de ácidos orgânicos foi realizada em cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (*High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC, Waters 1525), com sistema de dupla bomba, e um detector ultra violeta com lâmpada de zinco a 212 nm. A coluna analítica utilizada foi a de polímero de octadecilsilano (YMC-Pack ODS-AQ, S-5 μm, 12nm). O eluente consiste numa solução de etanol (70%), que é previamente desgaseificado em banho de ultrasons (Sonicador Ultrasonic Cleaner).

O procedimento consiste em injetar a amostra, previamente filtrada por membrana de 0,45 μm de porosidade, na coluna. A amostra é arrastada pela coluna a

uma vazão de 0,5 $mL.min^{-1}$, à temperatura ambiente, 18 atm de pressão e velocidade 3 $mm.min^{-1}$. A concentração do ácido cítrico é obtida através da equação 3.1:

$$C = \frac{A_a}{A_p} * C_p * f_d \qquad (3.1)$$

sendo: C - Concentração de ácido cítrico na amostra (g/L)

A_a - Área do pico representante do ácido cítrico na amostra

A_p - Área do pico do ácido cítrico padrão

C_p - Concentração de ácido cítrico padrão na solução (g/L)

f_d - fator de diluição da amostra

3.9.2.2. Método Químico

Para os ensaios do primeiro planejamento a dosagem de ácido cítrico foi realizada utilizando o método de MARIER & BOULET (1958). Para tanto, utilizou-se 1 mL da amostra, 1,3 mL de piridina e 5,7 mL de anidrido acético, sendo manipulados na capela e posteriormente colocados em banho maria em frasco fechado por 30 minutos a 32ºC e leitura no espectrofotômetro a 420 nm. Os melhores resultados em termos de produção de ácido cítrico obtidos por este método foram selecionados e analisados pelo método enzimático (*Biopharm*). Para os ensaios dos planejamentos seguintes a dosagem de ácido cítrico foi feita pelo método enzimático.

3.9.2.3. Método Enzimático

3.9.2.3.1 Dosagem de Ácido Cítrico

A quantificação de ácido cítrico também foi realizada por kit enzimático (*Biopharm*) que contém 1,4 g do reagente enzimático liofilizado (reagente 1) constituido de tampão glicilglicina com pH de 7,8 aproximadamente, L-malato desidrogenase, aproximadamente 136 U, L-lactato desidrogenase, aproximadamente 280 U e NADH com aproximadamente 5 mg e o reagente enzimático 2 constituído por 50 mg de citrato liase liofilizada com aproximadamente 12 U.

As soluções para as análises eram preparadas dissolvendo o conteúdo do frasco contendo o reagente 1 em 12 mL de água destilada (Solução 1) e contéudo do frasco contendo o reagente 2 em 0,3 mL em água destilada (Solução 2).

A concentração de ácido cítrico foi determinada por medidas de densidade óptica a 340 nm no espectrofotômetro em cubeta de vidro a temperatura ambiente e o

volume final utilizado foi de 3,020 mL. A leitura foi realizada contra água destilada. Primeiramente, um branco foi preparado adicionando 1 mL da Solução 1 e 2 mL de água destilada. Na parte superior da cubeta é colocado um pedaço de parafilme para que a mistura seja homogeneizada. Após 5 minutos de reação, a absorbância (A_1) do branco é lida e 0,020 mL da Solução 2 é adicionada e a mistura homogeneizada. Após 5 minutos a absorbância (A_2) é lida. O mesmo procedimento foi adotado para a amostra, porém o volume adicionado de água destilada é reduzido para 1,8 mL e é adicionado 0,2 mL da solução de amostra na primeira etapa. Para o cálculo da concentração de ácido cítrico em g/L de solução é necessário determinar as diferenças entre as absorbâncias A_1 e A_2 do branco e da amostra e posteriormente subtrair a diferença de absorbância do branco da diferença de absorbância da amostra, como mostra a Equação (3.2):

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{amostra} - (A_1 - A_2)_{branco} \quad (3.2)$$

Para validar o método, ΔA precisa ser no mínimo 0,100 e se a diferença de absorbância da amostra $\Delta A_{amostra}$ for mais alto que 1, a amostra precisa ser diluida.

Para o cálculo da concentração de ácido cítrico utiliza-se a Equação (3.3):

$$C = \frac{V * PM}{\varepsilon * d * v * 1000} * \Delta A * f_d \quad (3.3)$$

sendo,

V = volume final (3,020 mL)

v = volume da amostra (mL)

PM = peso molecular do ácido cítrico (g/ mol)

d = caminho ótico (1 cm)

ε = coeficiente de extinção de NADH em 340 nm (6,3 L x mmol $^{-1}$ x cm -^{1})

f_d = fator de diluição da amostra

O princípio do método consiste na conversão de ácido cítrico (citrato) a oxaloacetato e acetato na reação catalizada pela enzima citrato liase (CL) (reação 3.1). Na presença das enzimas L-malato desidrogenase (L-MDH) e L-lactato desidrogenase (L-LDH), oxaloacetato e seu produto de descarboxilação, piruvato, são reduzidos a L-malato e L-lactato, respectivamente, por NADH (reações 3.2 e 3.3 respectivamente). A quantidade de NADH oxidado nas reações 3.2 e 3.3 é estequiométrica para a quantidade de citrato. NADH é determinado por meio de sua absorbância a 340 nm.

Citrato → Oxaloacetato + Acetato (3.1)

Oxaloacetato + NADH + H^+ → L-malato + NAD^+ (3.2)

Piruvato + NADH + H^+ → L-lactato + NAD^+ (3.3)

3.9.2.3.2 Dosagem de Ácido Isocítrico

A quantificação de ácido isocítrico também foi realizada por kit enzimático (*Biopharm*). O primeiro reagente contém o tampão imidazole com pH de 7,1 aproximadamente. O segundo contém 60 mg de NADP (nicotinanida-adenina dinucleotídeo fosfato) e sulfato manganês liofilizados e o terceiro com a enzima ICDH (isocitrato desidrogenase) com aproximadamente 5 U.

As soluções para as análises eram preparadas dissolvendo o conteúdo do frasco contendo o reagente 2 com o reagente 1 (Solução 2) e o contéudo do frasco contendo o reagente 3 em 1,8 mL de água destilada (Solução 3).

A concentração de ácido isocítrico foi determinada por medidas de densidade óptica a 340 nm no espectrofotômetro em cubeta de vidro à temperatura ambiente e o volume final utilizado foi de 3,050 mL. A leitura foi realizada contra água destilada. Primeiramente, um branco foi preparado adicionando 1 mL da Solução 2 à 2 mL de água destilada. Na parte superior da cubeta é colocado um pedaço de parafilme para que a mistura seja homogeneizada. Após 3 minutos de reação, a absorbância (A_1) do branco é lida e 0,050 mL da Solução 3 é adicionada e a mistura homogeneizada. Após 10 minutos, a absorbância (A_2) é lida. O mesmo procedimento foi adotado para a a amostra, porém o volume adicionado de água destilada é reduzido para 1,9 mL e é adicionado 0,1 mL da solução de amostra na primeira etapa. Para o cálculo da concentração de ácido isocítrico em g/L de solução é necessário determinar as diferenças entre as absorbâncias A_2 e A_1 do branco e da amostra e posteriormente subtrair a diferença de absorbância do branco da diferença de absorbância da amostra, como mostra a Equação (3.4):

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{amostra} - (A_2 - A_1)_{branco} \qquad (3.4)$$

Para validar o método, ΔA precisa ser no mínimo 0,100 e se a diferença de absorbância da amostra $\Delta A_{amostra}$ for mais alto que 1, a amostra precisa ser diluida.

Para o cálculo da concentração de ácido isocítrico utiliza-se a Equação (3.5):

$$C = \frac{V * PM}{\varepsilon * d * v * 1000} * \Delta A * f_d \qquad (3.5)$$

sendo: V = volume final (3,050 mL)

v = volume da amostra (mL)

PM = peso molecular do ácido isocítrico (g/ mol)

d = caminho ótico (1 cm)

ε = coeficiente de extinção de NADH em 340 nm (6,3 L x mmol $^{-1}$ x cm -^{1})

f_d = fator de diluição da amostra

O princípio do método consiste na descarboxilação oxidativa do ácido D-isocítrico (D-isocitrato) por nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) na presença da enzima isocitrato desidrogenase (ICDH) como mostra a reação 3.4. A quantidade de NADPH formado pela reação 3.4 é estequiométrica a quantidade de D-isocitrato. NADPH é determinado por meio da sua absorbância a 340 nm.

$$\text{D-isocitrato} + NADP^+ \rightarrow \text{2-oxoglutarato} + CO_2 + NADPH + H^+ \qquad (3.4)$$

3.9.3. pH do meio de cultivo

O pH do meio de cultivo livre de células foi determinado utilizando-se um pHmetro da marca Digimed, modelo DM-22, previamente calibrado com tampões-padrão 7,0 e 4,0 na temperatura ambiente (25°C).

3.10. Determinação dos rendimentos, produtividade, razão Ácido Cítrico:Isocítrico e Razão Molar C/N

Para comparação entre todos os ensaios, parâmetros da produção, como o rendimento em ácido cítrico a partir da concentração inicial do substrato ($Y_{cit/glic}$), a produtividade (Pr) ao fim do tempo de operação, a razão entre a produção de ácido cítrico (P_{AC}) e de isocítrico (P_{AIC}) e a razão molar carbono/nitrogênio (C/N) foram determinados. Seguem as equações utilizadas no cálculo destes parâmetros.

$$Y_{cit/glic} = \frac{Pf - Pi}{Si} \qquad (3.6)$$

$$Pr = \frac{Pf - P_i}{t_f} \qquad (3.7)$$

$$* \; R_{AC/AIC} = \frac{P_{AC}}{P_{AIC}} \qquad (3.8)$$

$$** \; RM = \frac{[C]}{[N]} \qquad (3.9)$$

Sendo:

P_f : concentração final de ácido cítrico em um determinado tempo (t_f);

P_i: concentração inicial de ácido cítrico no tempo t igual a zero;

S_i: concentração inicial do substrato glicerol;

t_f: tempo

*$R_{AC/AIC}$: razão entre as concentrações de ácido cítrico e isocítrico;

**RM: razão molar; [C] concentração molar de carbono calculada a partir da fonte de carbono; [N]: concentração molar de nitrogênio calculada a partir da fonte de nitrogênio.

4. Resultados e Discussões

4.1. Influência da composição do meio de cultivo

Dados na literatura apontam que a composição do meio de cultivo e a relação carbono/nitrogênio são parâmetros importantes na produção dos ácidos cítrico e isocítrico, sendo necessário estabelecer valores ótimos para esses parâmetros de forma a melhorar a produção de ácido cítrico (LEVINSON *et al.*, 2007). Portanto, estudou-se o efeito da composição do meio de cultivo no crescimento celular e na produção de ácido cítrico pela levedura *Y. lipolytica*. Primeiramente foram testados diferentes meios de cultivo, em comparação com o tradicional meio YPD, para obter ácido cítrico, alfa-cetoglutárico ou pirúvico no meio de cultivo. Variou-se a fonte de nitrogênio (extrato de lêvedo, peptona e sulfato de amônio) e estudou-se ainda a influência de minerais no meio de cultivo.

4.1.1. Experimentos Preliminares

Primeiramente podem-se observar nas Figuras 4.1 e 4.2 os perfis de crescimento celular e pH para os experimentos realizados com água destilada e composição descrita na Tabela 3.1. Comparando os ensaios 1 e 2, que utilizaram as mesmas fontes de nitrogênio, é possível observar que o experimento realizado com uma menor razão molar C/N (Meio 1) apresentou uma variação de biomassa (ΔX) maior. A máxima concentração celular em meio 1 e em meio 2 foi de 13,94 mg p.s./mL em 75,67 h e 9,75 mg p.s./mL em 45,83 h de experimento, respectivamente. Já os experimentos 3 e 4, com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, apresentaram um perfil de crescimento celular maior que os experimentos mencionados anteriormente com produção de biomassa de 16,28 mg p.s./mL em 53,67 h e 16,36 mg p.s./mL em 69,75 h de experimento, respectivamente, conforme a Figura 4.2. Neste caso, o tipo da fonte de nitrogênio escolhida é um parâmetro importante para o crescimento celular da levedura *Yarrowia lipolytica*. Percebe-se que o crescimento celular nos experimentos 3 e 4 está limitado pela concentração de nitrogênio, dado que uma maior concentração de sulfato de amônio não gera mais biomassa.

Os resultados obtidos neste trabalho, onde a produção de biomassa foi maior nos meios que continham sulfato de amônio, contrastam com o reportado por PEREIRA-MEIRELLES (1997) que observou melhor crescimento de *Y. lipolytica* em peptona do que em sulfato de amônio. Muitos trabalhos reportam o efeito repressor do sulfato de amônio sobre o crescimento de algumas cepas de *Y. lipolytica* quando este composto é utilizado como fonte de nitrogênio (NOVOTNY *et al.*, 1988; PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997; CORZO E REVAH, 1999) e que o extrato de lêvedo apresenta resultados

muito bons para o crescimento de biomassa, já que não é apenas uma fonte de nitrogênio, mas também de vitaminas.

Nos 4 casos presentes, houve queda de pH seguida de um aumento no final do experimento, indicando que houve produção de algum ácido ao longo do processo que foi posteriormente consumido.

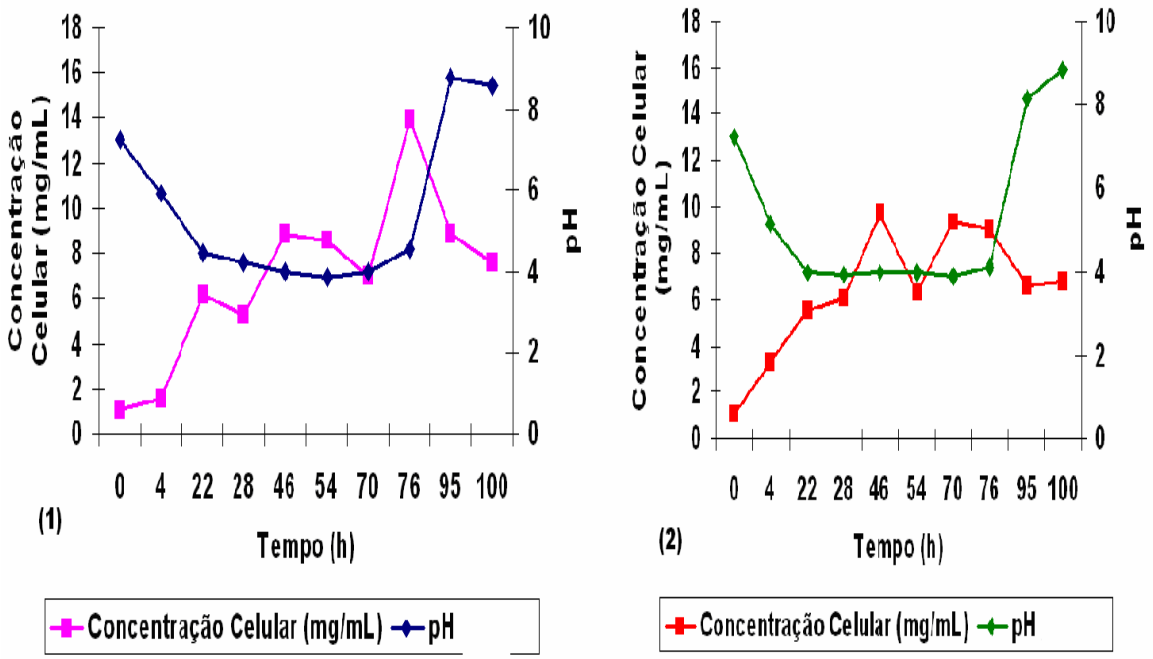

Figura 4.1. Perfil de crescimento celular e pH do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meios 1 e 2 em água destilada.

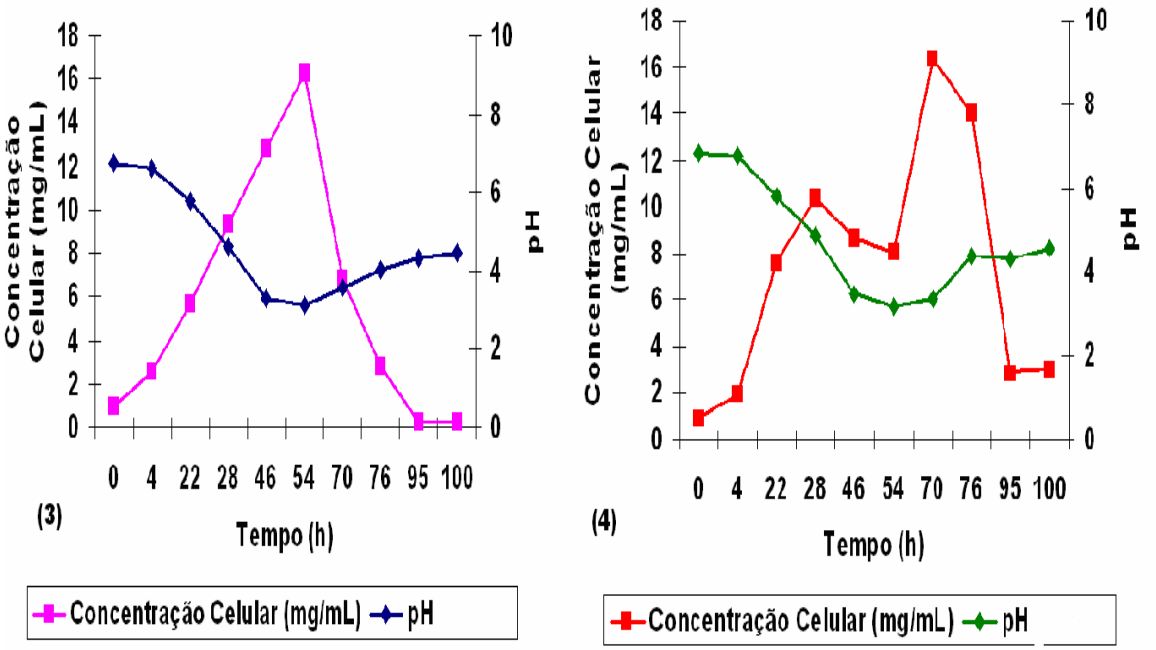

Figura 4.2. Perfil de crescimento celular e pH do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meios 3 e 4 em água destilada

Para esta etapa dos experimentos, as análises para detecção de ácido cítrico foram realizadas por cromatografia líquida. Injetando somente a amostra não foi possível detectar pico com área significativa no tempo de retenção do padrão do ácido cítrico. Quando foi injetada a amostra junto com o padrão interno do ácido cítrico no cromatógrafo, observou-se que não houve aumento de área no tempo de retenção deste padrão. Portanto, não houve produção de ácido cítrico nos meios 1, 2, 3 e 4 elaborados com água destilada. No entanto, pelos cromatogramas apresentados nas Figuras 4.3 a 4.13, é possível notar a produção de algum composto com tempo de retenção de 15 minutos no meio 1. Para o meio 2, nota-se um pico sendo formado em 14 minutos após 70 horas de processo e outro em, aproximadamente, 20 minutos após 76 horas de fermentação. Para os meios 3 e 4 há formação de um pico em 15 minutos após 54 e 46 horas de processo respectivamente. Certamente, há formação de ácidos orgânicos, mas sem identificação exata de quais seriam. Analisando os cromatogramas relacionados ao meio 3, observa-se que o pico que aparece na figura 4.9 cujo tempo de retenção é 15 minutos desaparece na Figura 4.10 onde o tempo de processo é de 70 horas.

Relacionando este resultado com a cinética de crescimento celular e pH, é possível observar que é no tempo de 54 horas que o crescimento celular atinge o seu valor máximo e é a partir deste ponto que o pH começa a aumentar. Portanto, pode-se afirmar que houve consumo do ácido orgânico produzido pela própria levedura. Um comportamento similar foi observado para o meio 4 (Figuras 4.12 e 4.13). Em 46 horas de processo foi produzida a maior quantidade de um determinado composto e a partir deste tempo o pH começou aumentar e o composto em questão desaparece.

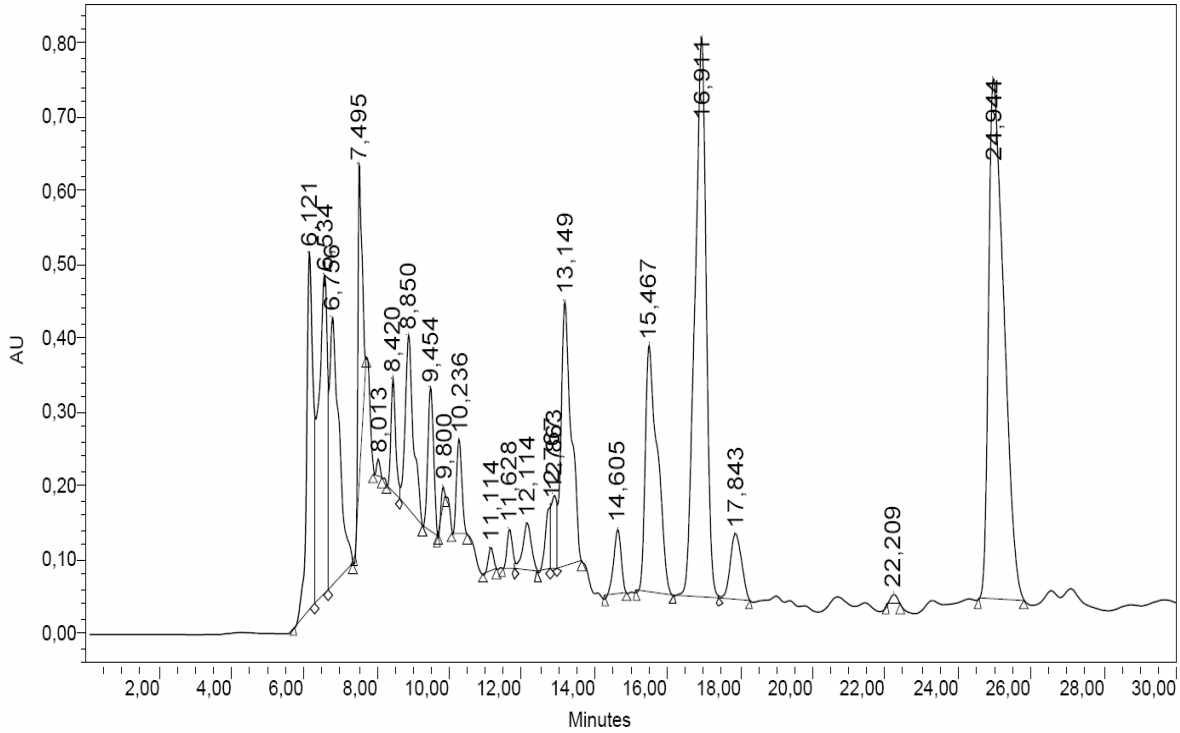

Figura 4.3. Cromatograma em HPLC do meio 1 em água destilada no início do cultivo.

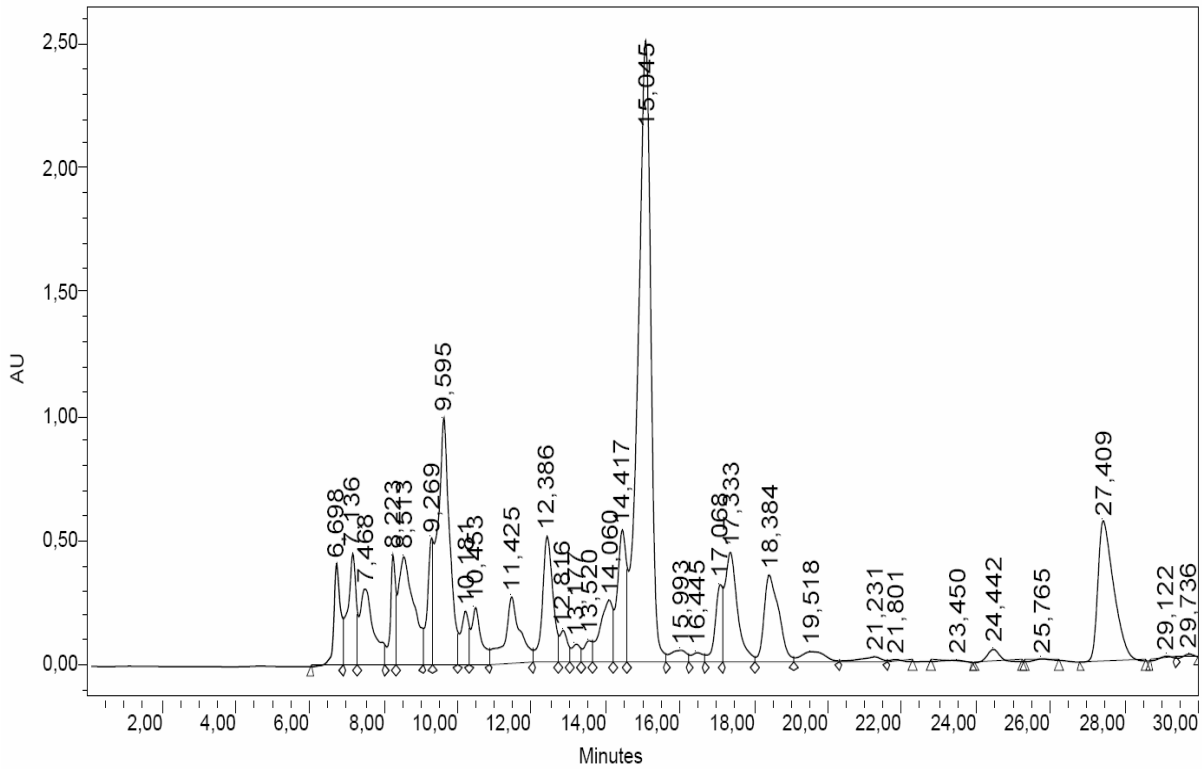

Figura 4.4. Cromatograma em HPLC do meio 1 em água destilada no final do cultivo.

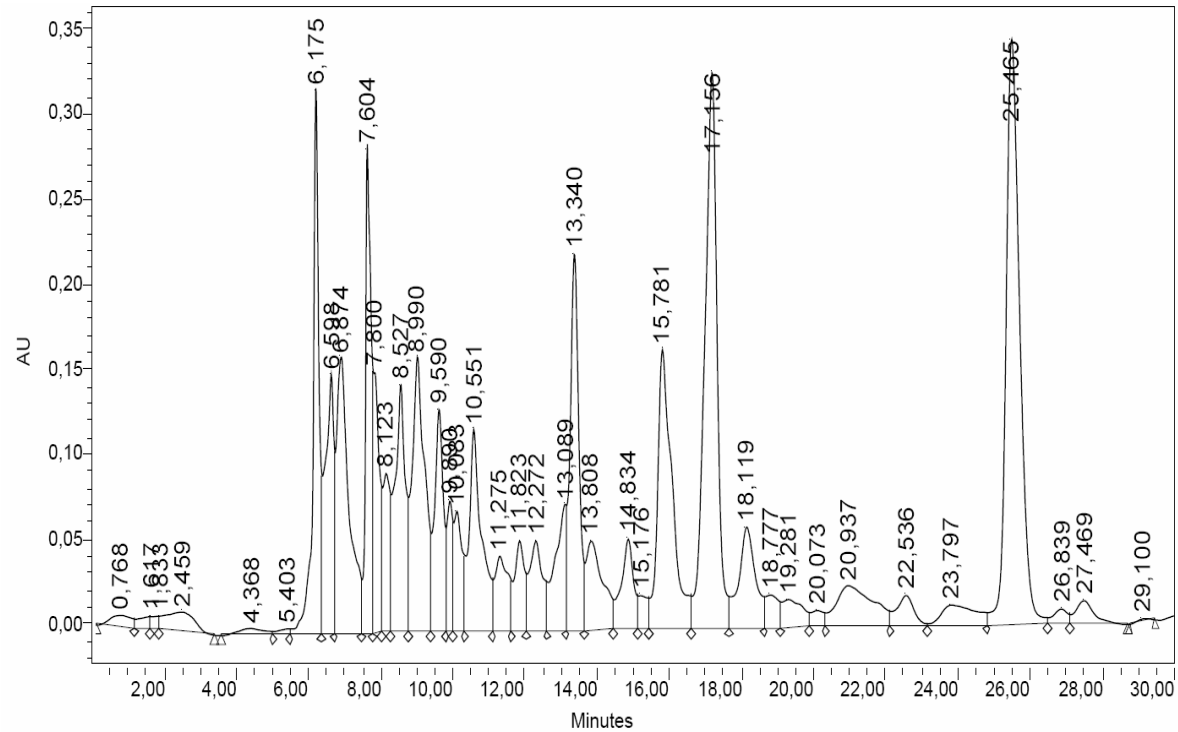

Figura 4.5. Cromatograma em HPLC do meio 2 em água destilada no início do cultivo.

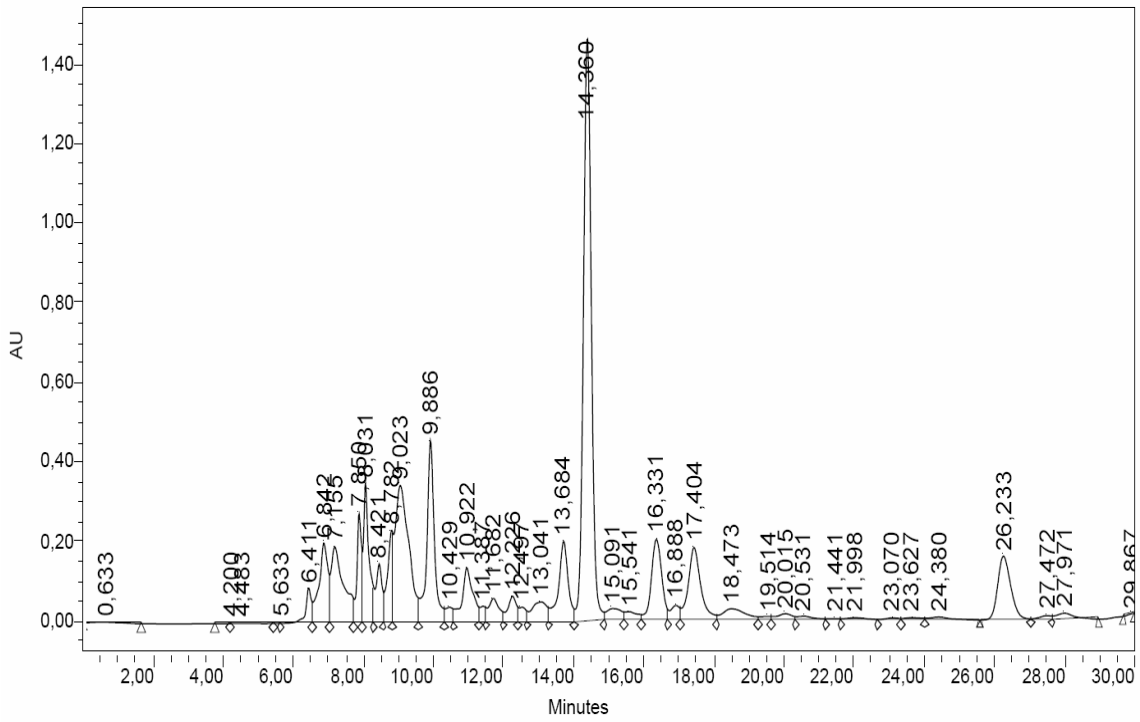

Figura 4.6. Cromatograma em HPLC do meio 2 em água destilada no final do cultivo após 70 horas de processo.

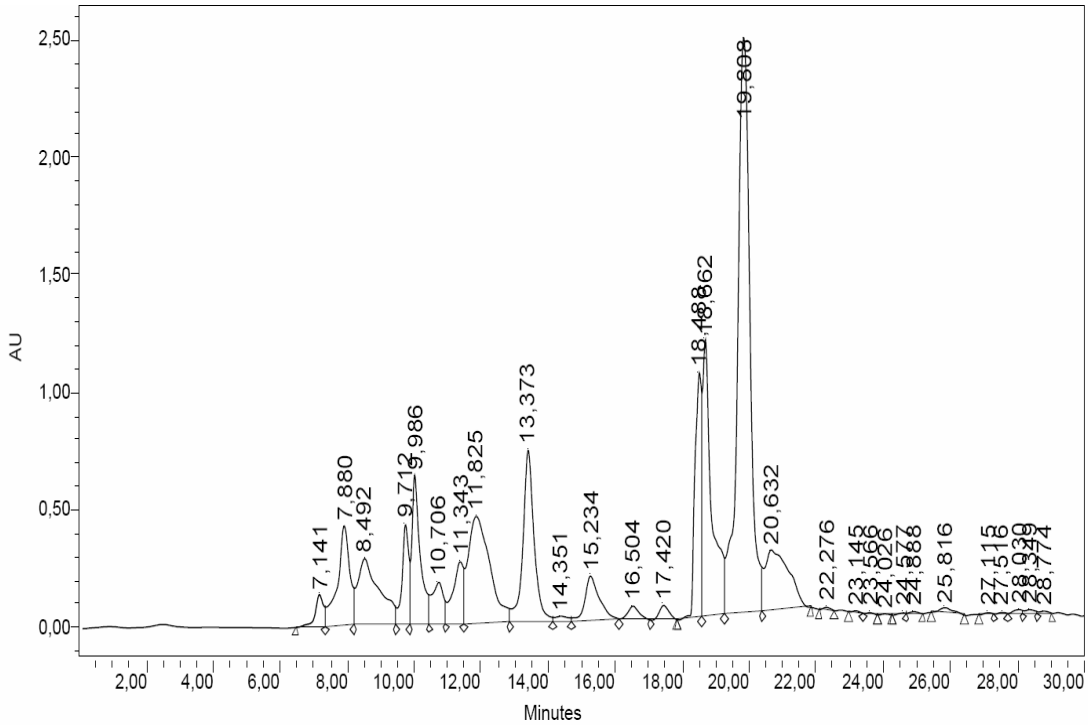

Figura 4.7. Cromatograma em HPLC do meio 2 em água destilada no final do cultivo após 76 horas de processo.

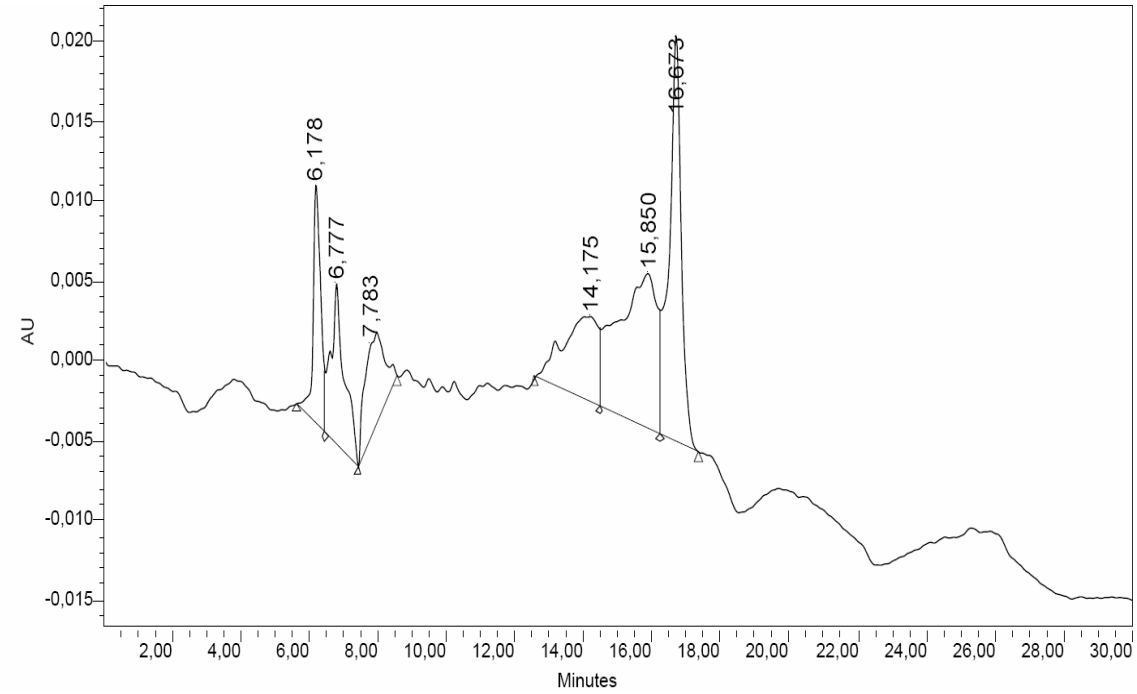

Figura 4.8. Cromatograma em HPLC do meio 3 em água destilada no início do cultivo.

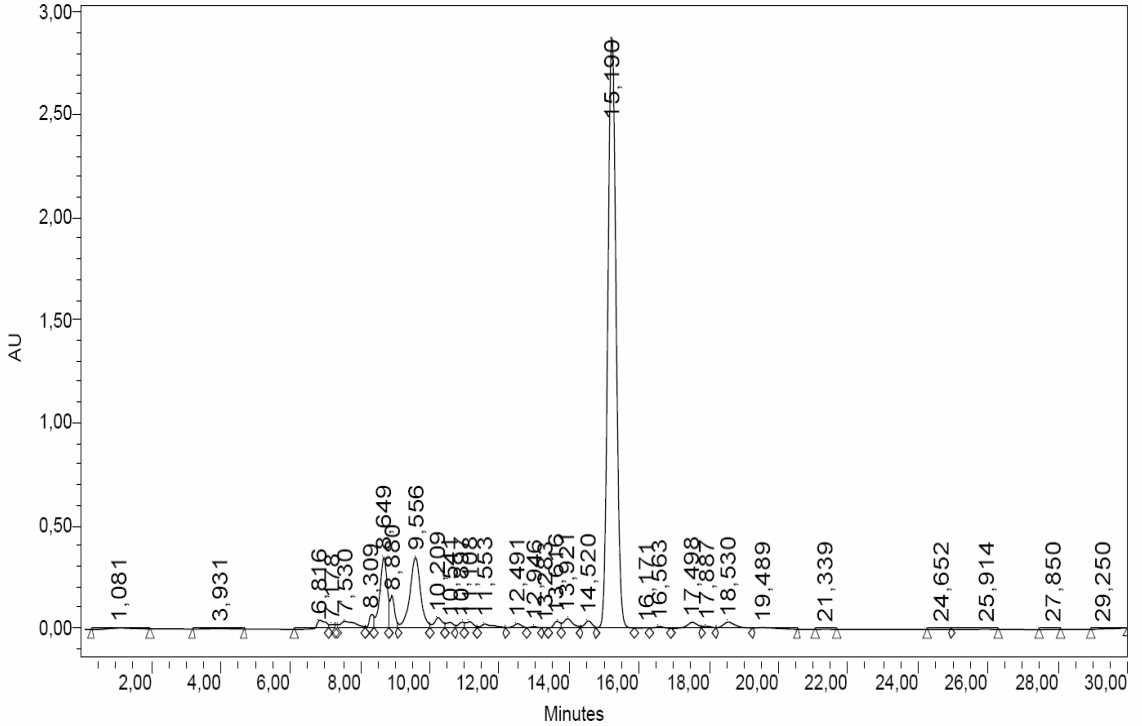

Figura 4.9. Cromatograma em HPLC do meio 3 em água destilada após 54 horas de processo.

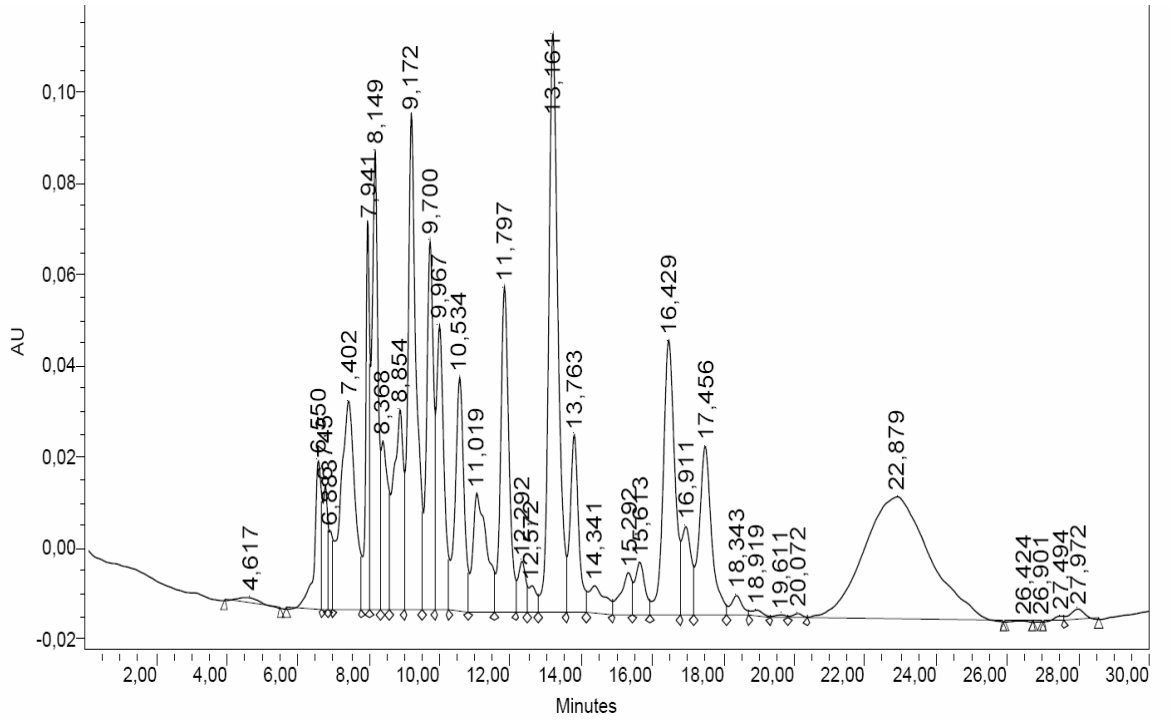

Figura 4.10. Cromatograma em HPLC do meio 3 em água destilada após 70 horas de processo.

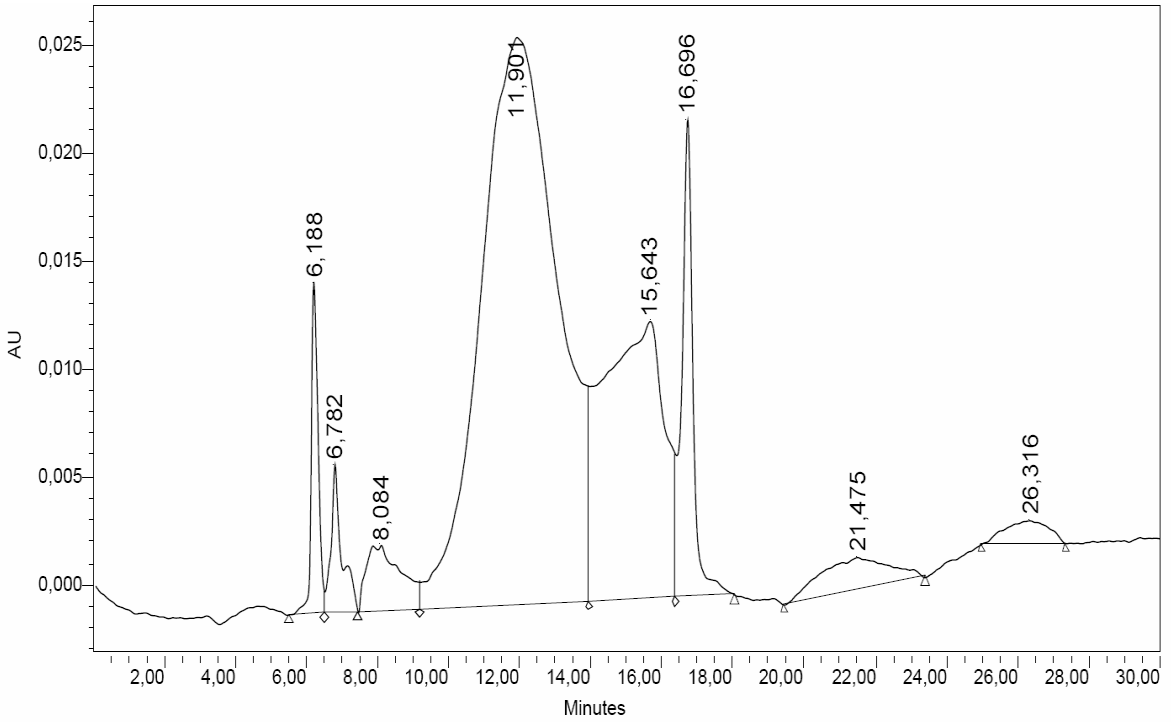

Figura 4.11. Cromatograma em HPLC do meio 4 em água destilada no início do cultivo.

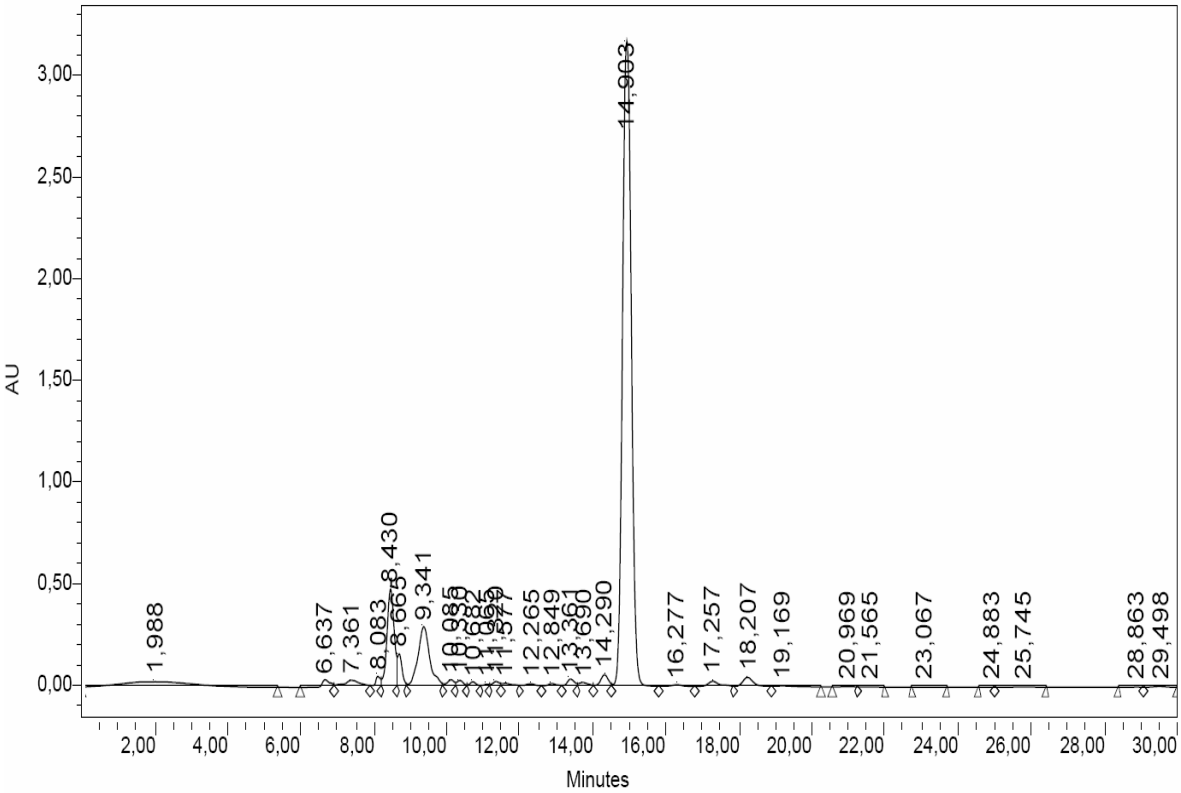

Figura 4.12. Cromatograma em HPLC do meio 4 em água destilada após 46 horas de processo.

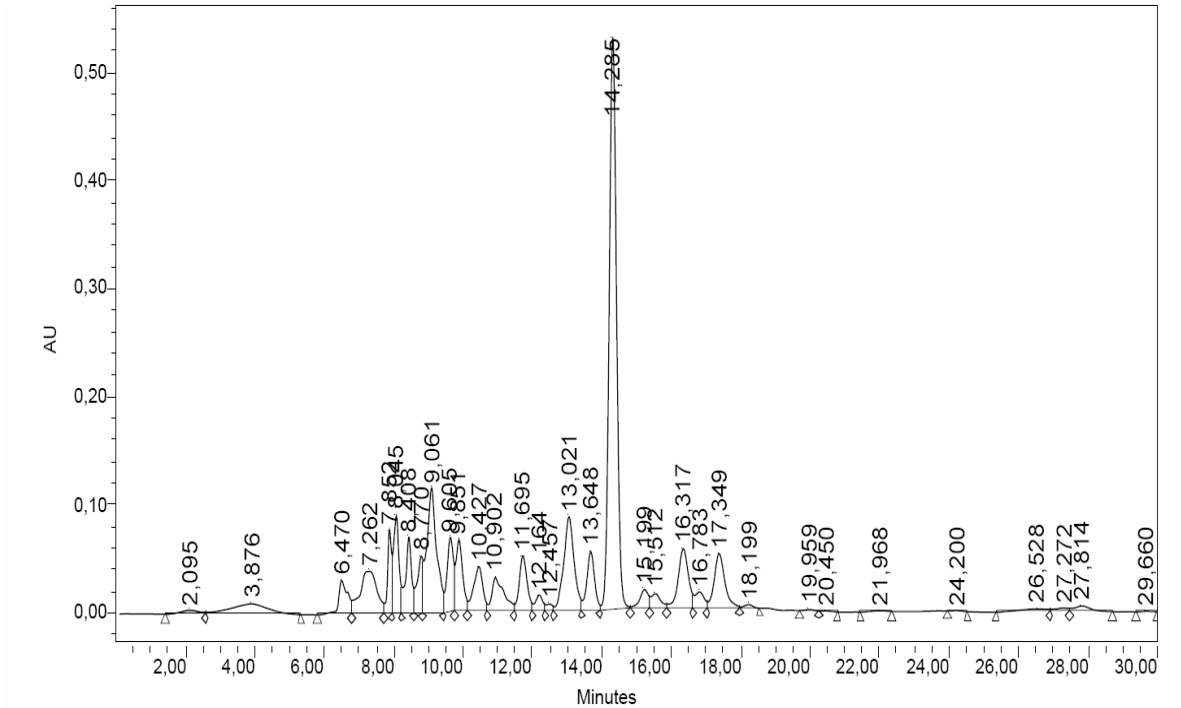

Figura 4.13. Cromatograma em HPLC do meio 4 em água destilada após 70 horas de processo.

Como mencionado na revisão bibliográfica, a levedura *Y. lipolytica* é única em sua habilidade de produzir e excretar no meio de cultura uma grande variedade de ácidos orgânicos, incluindo os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, como o ácido cítrico, o isocítrico, o α-cetoglutárico, e o pirúvico (BARTH E GAILLARDIN, 1997; FICKERS *et al.*, 2005). De forma a tentar identificar os compostos com tempo de retenção de 14,15 e 20 minutos, alguns ácidos orgânicos padrões foram testados na mesma coluna de HPLC. A Tabela 4.1 apresenta os resultados.

Tabela 4.1. Tempo de retenção dos padrões injetados no HPLC.

Padrão (Ácido)	Cítrico	α-cetoglutárico	Pirúvico	Succínico	Oxálico
Tempo de Retenção (minutos)	11,22	10,96	8,83	14,50	6,98

Os experimentos 1, 2, 3 e 4 apresentaram pico próximo ao tempo de retenção do ácido succínico. Certamente há formação de ácido orgânico, mas seria necessária uma técnica mais precisa, para identificá-los.

Para os experimentos utilizando água Milliq no preparo desses meios, ou seja, retirando todos os íons presentes na água, foi possível observar que os perfis de crescimento são mais instáveis, mostrando que a ausência de certos íons prejudica o crescimento celular. Observando as Figuras 4.14 e 4.15, a máxima concentração celular nos meios 1, 2, 3 e 4 foi de 7,07 mg p.s./mL em 53,47 h, 8,26 mg p.s./mL em 100,63 h, 6,92 mg p.s./mL em 94,13 h e 7,33 mg p.s./mL em 68,82 h, respectivamente.

Nos experimentos conduzidos com água Milliq, a concentração celular máxima foi similar para os quatro casos, diferentemente do que aconteceu com os experimentos com água destilada cuja concentração celular máxima foi para os experimentos com sulfato de amônio. Assim como nos experimentos com água destilada, o pH do meio de cultivo preparado com água Milliq diminuiu inicialmente e depois aumentou.

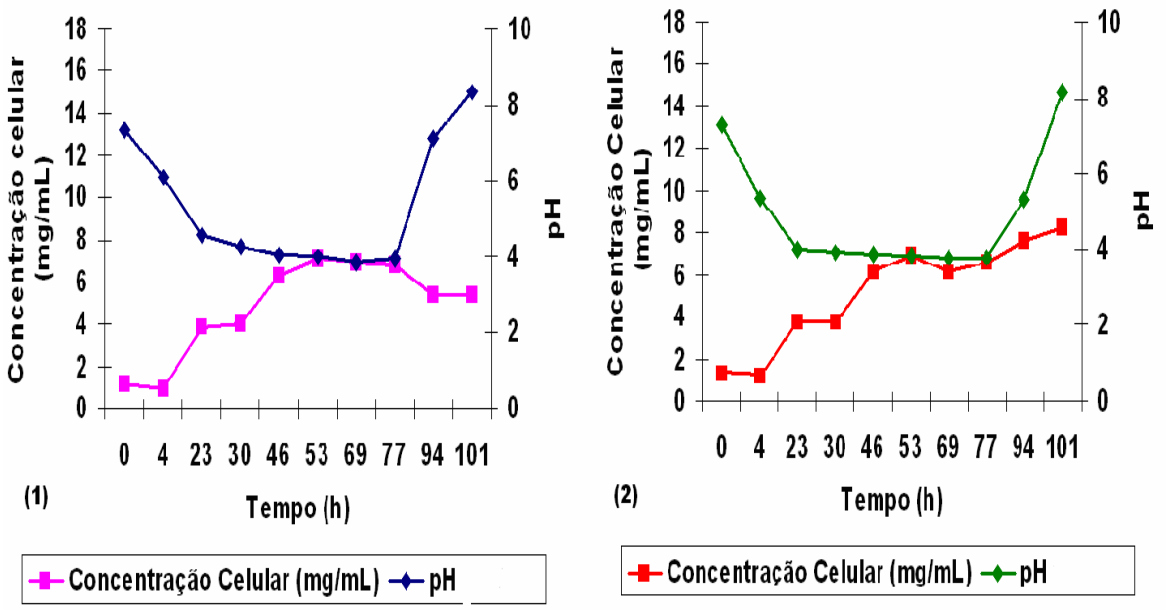

Figura 4.14. Perfil de crescimento Celular e pH do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meios 1 e 2 em água Milliq.

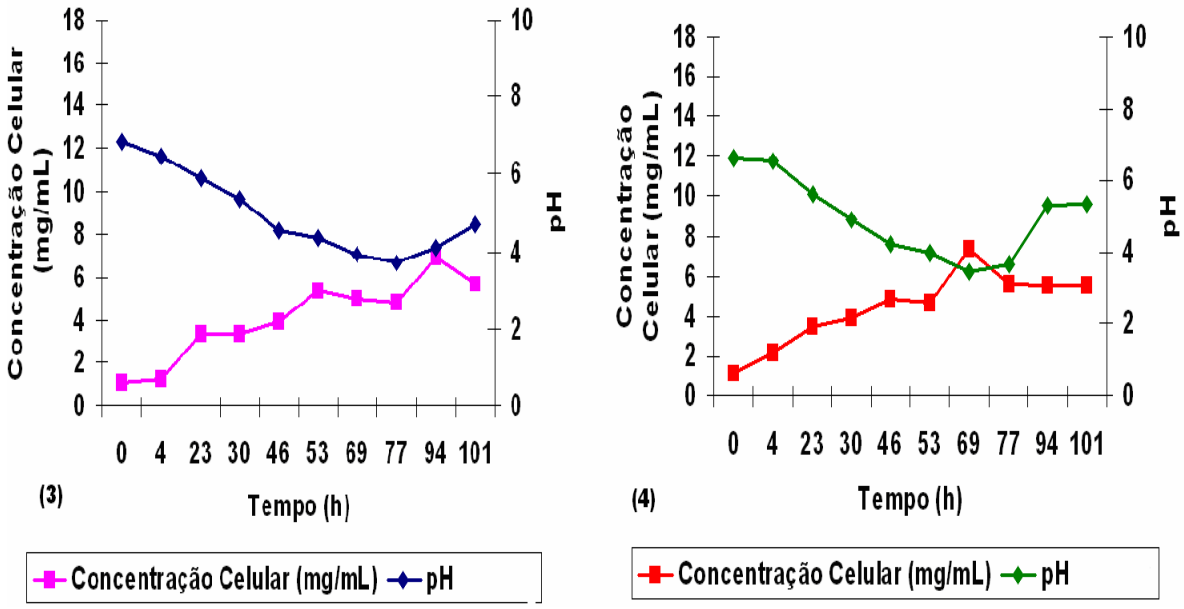

Figura 4.15. Perfil de crescimento Celular e pH do cultivo de *Yarrowia lipolytica* em meios 3 e 4 em água Milliq.

Pelos cromatogramas das Figuras 4.16 a 4.26 é possível notar a produção de alguns compostos com tempo de retenção de 13 minutos para todos os meios. Certamente há formação de algum ácido orgânico, mas também sem identificação exata de qual seria, uma vez que não houve identificação de pico próximo ao tempo de retenção aos padrões utilizados e não houve aumento de área quando foi utilizado o ácido cítrico como padrão interno. Conforme ilustrado nas Figuras 4.19 e 4.20, o ácido orgânico produzido para o meio 2 é posteriormente consumido no final do processo de fermentação, explicando a diminuição e o aumento seqüencial do pH. Os meios 3 e 4 também seguiram o mesmo comportamento.

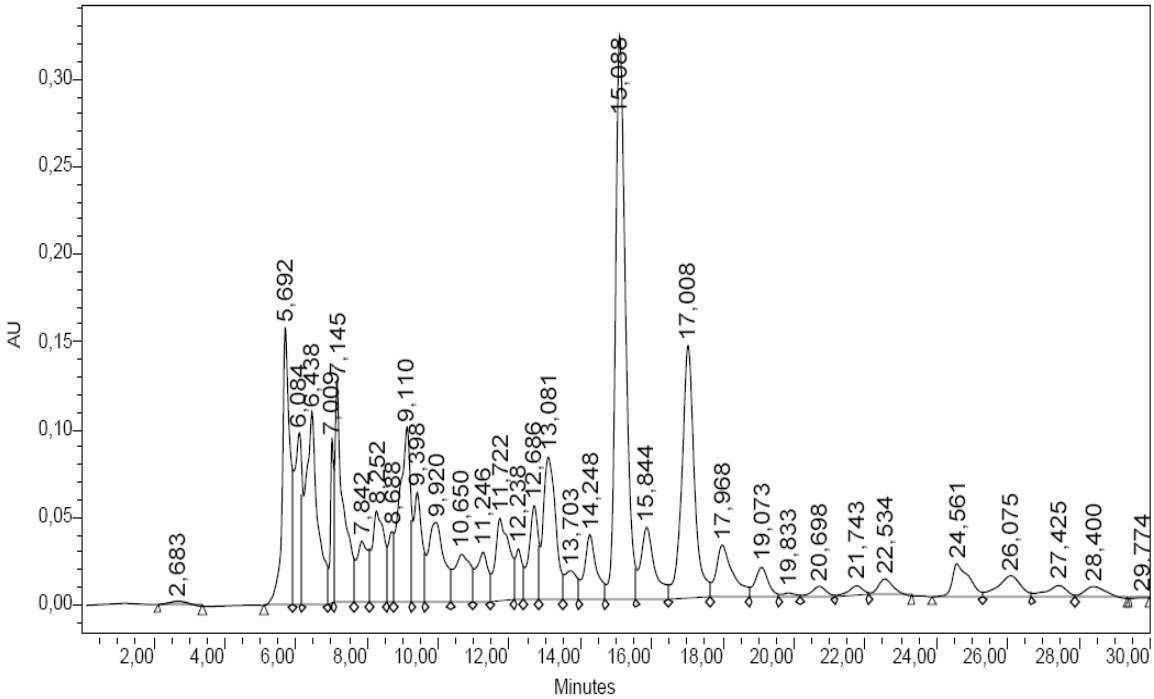

Figura 4.16. Cromatograma em HPLC do meio 1 preparado com água Milliq no início do cultivo.

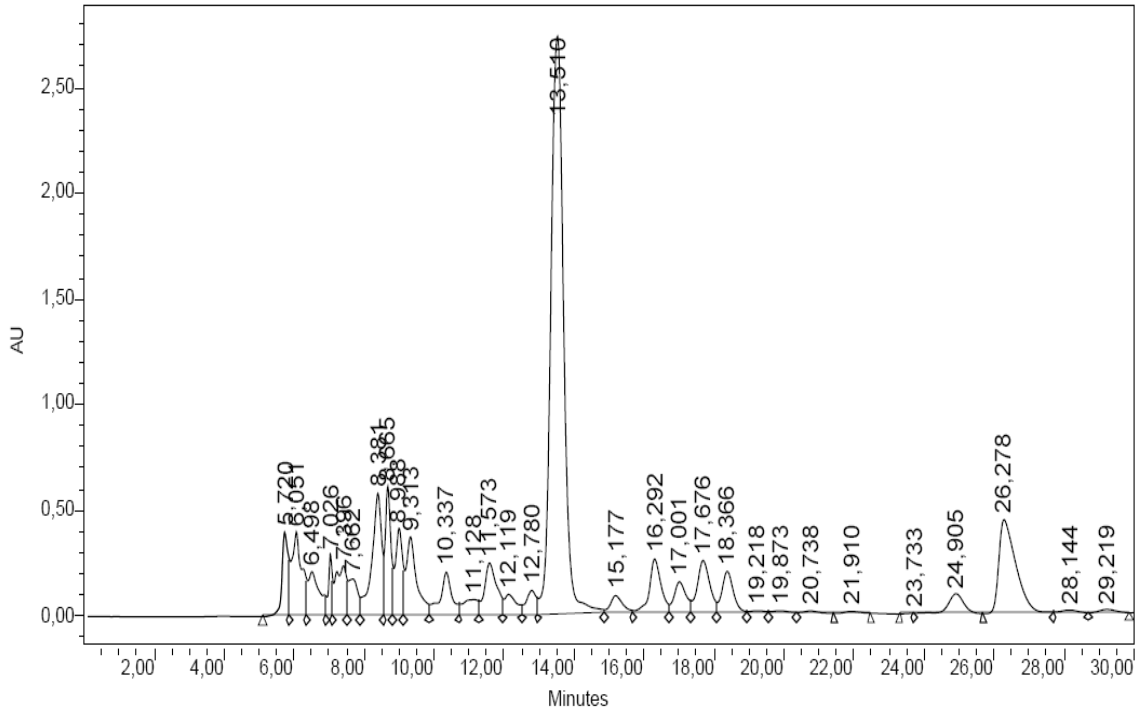

Figura 4.17. Cromatograma em HPLC do meio 1 preparado com água Milliq no final do cultivo.

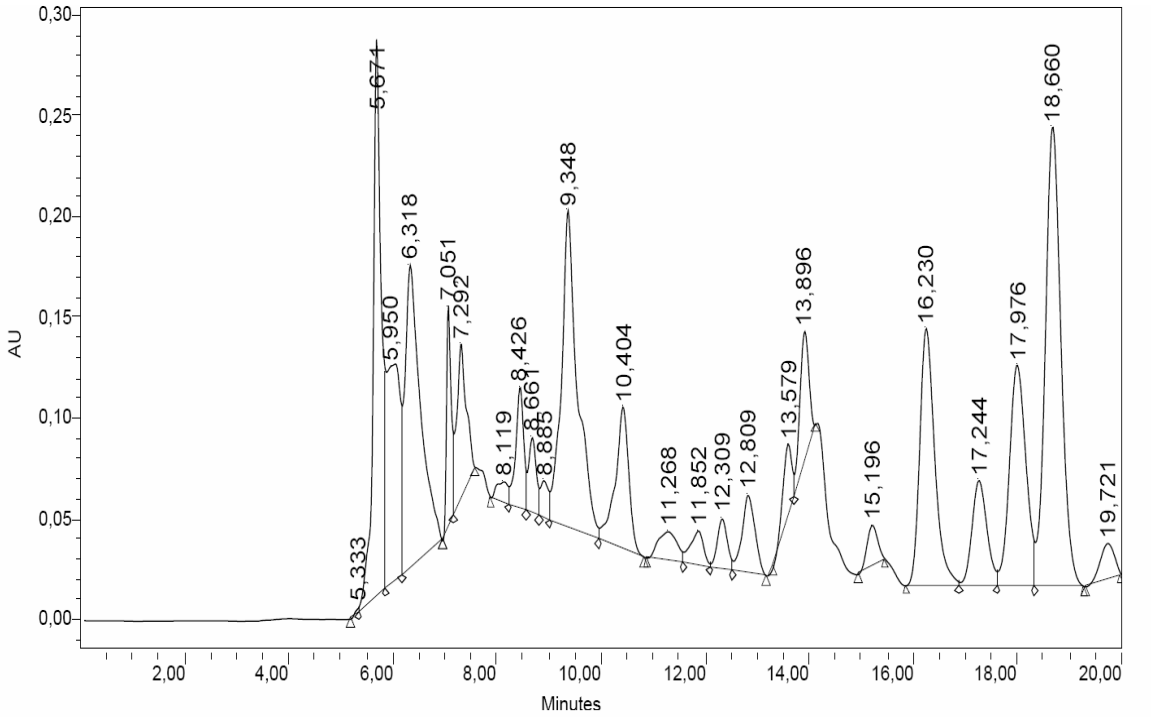

Figura 4.18. Cromatograma em HPLC do meio 2 preparado com água Milliq no início do cultivo.

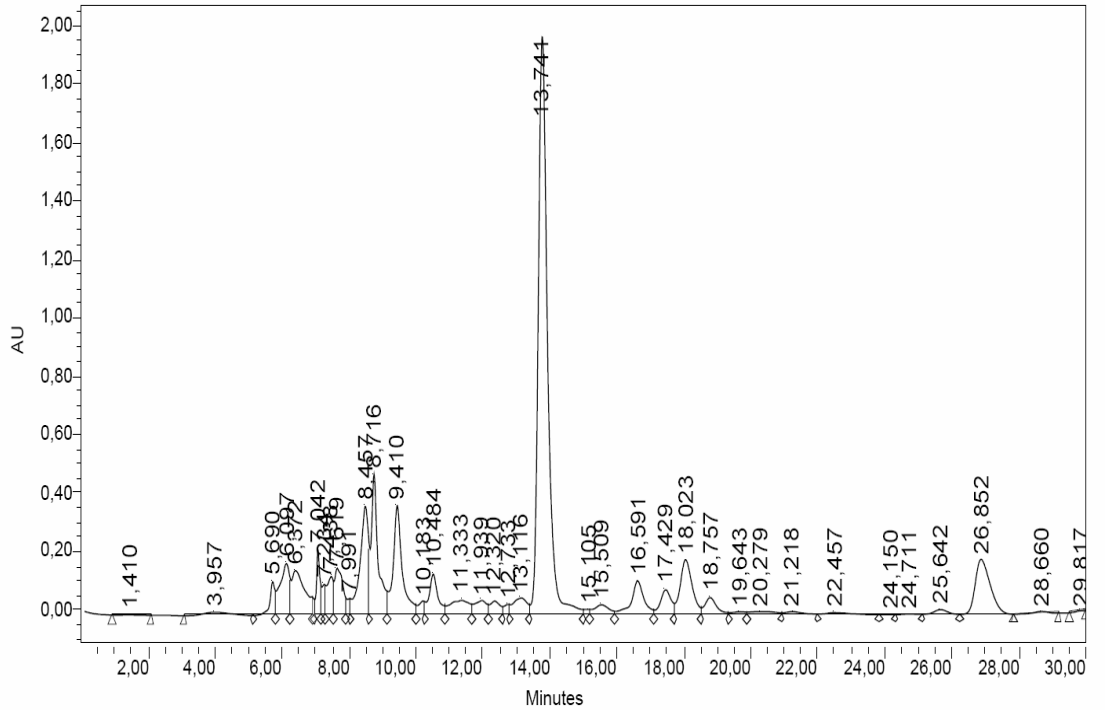

Figura 4.19. Cromatograma em HPLC do meio 2 preparado com água Milliq em 46 horas de fermentação.

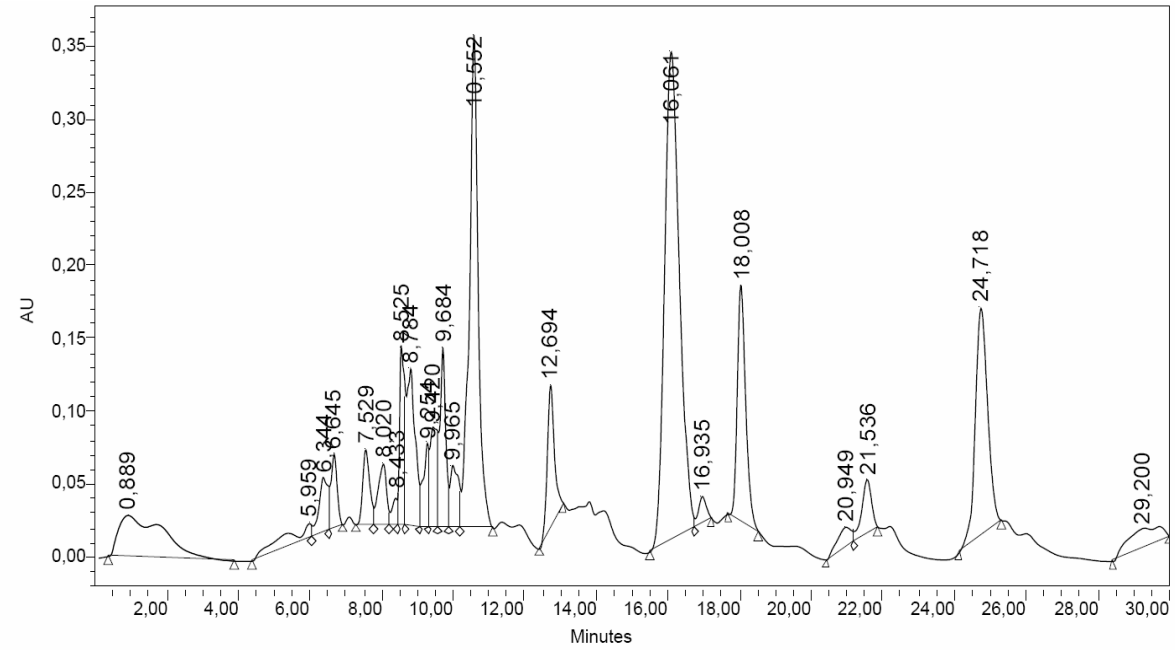

Figura 4.20. Cromatograma em HPLC do meio 2 preparado com água Milliq no final do cultivo.

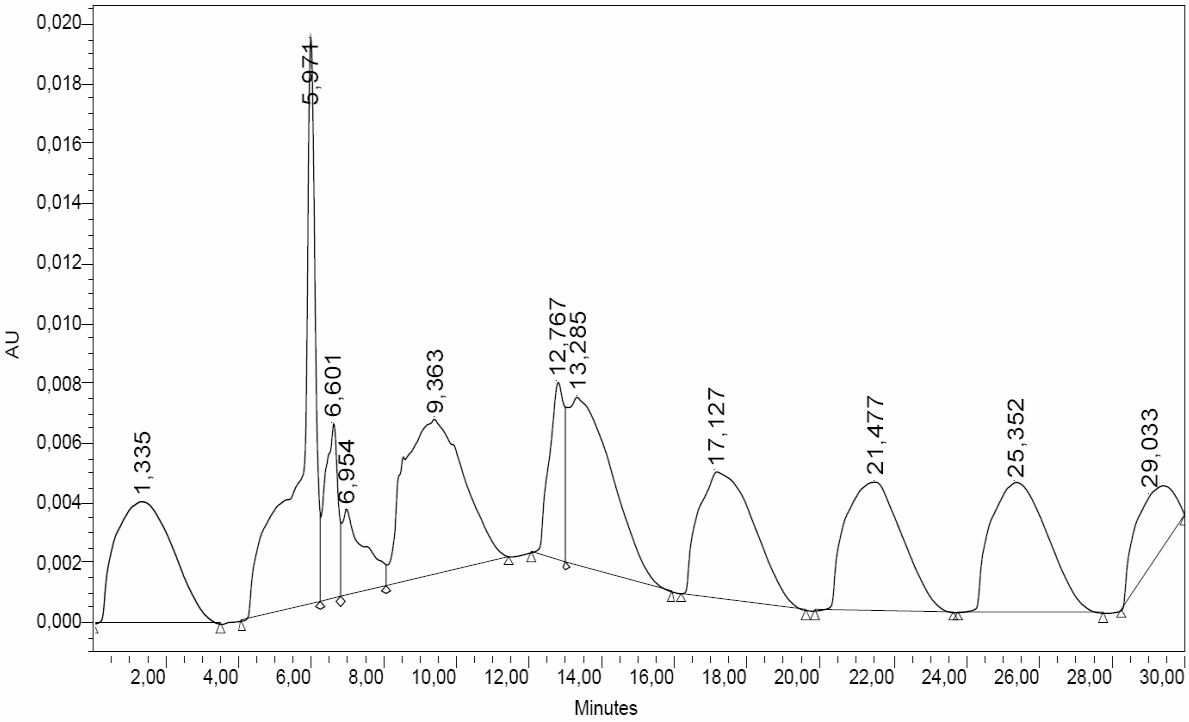

Figura 4.21. Cromatograma em HPLC do meio 3 preparado com água Milliq no início do cultivo.

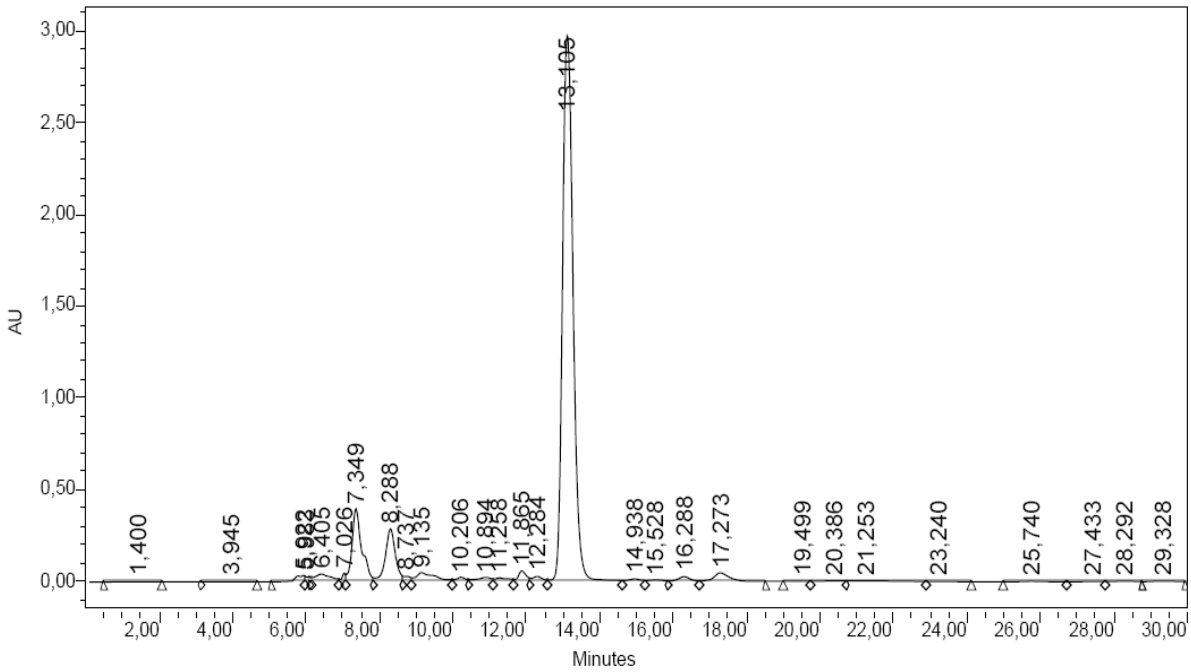

Figura 4.22. Cromatograma em HPLC do meio 3 preparado com água Milliq em 77 horas de processo.

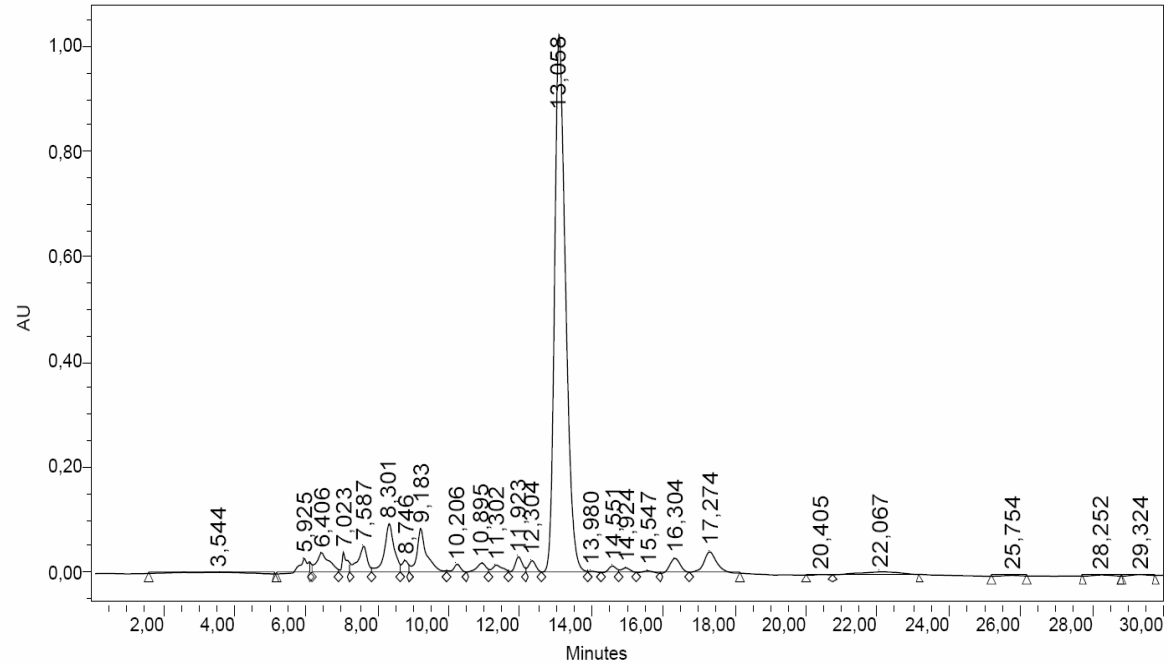

Figura 4.23. Cromatograma em HPLC do meio 3 preparado com água Milliq no final do cultivo.

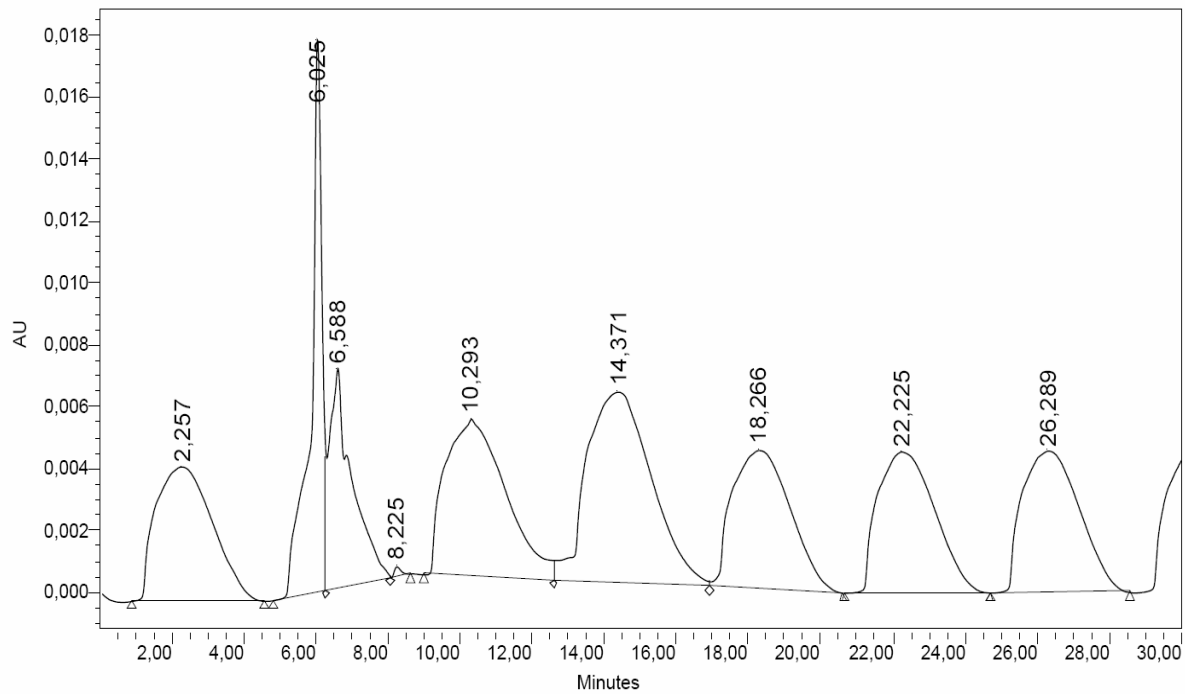

Figura 4.24. Cromatograma em HPLC do meio 4 preparado com água Milliq no início do cultivo.

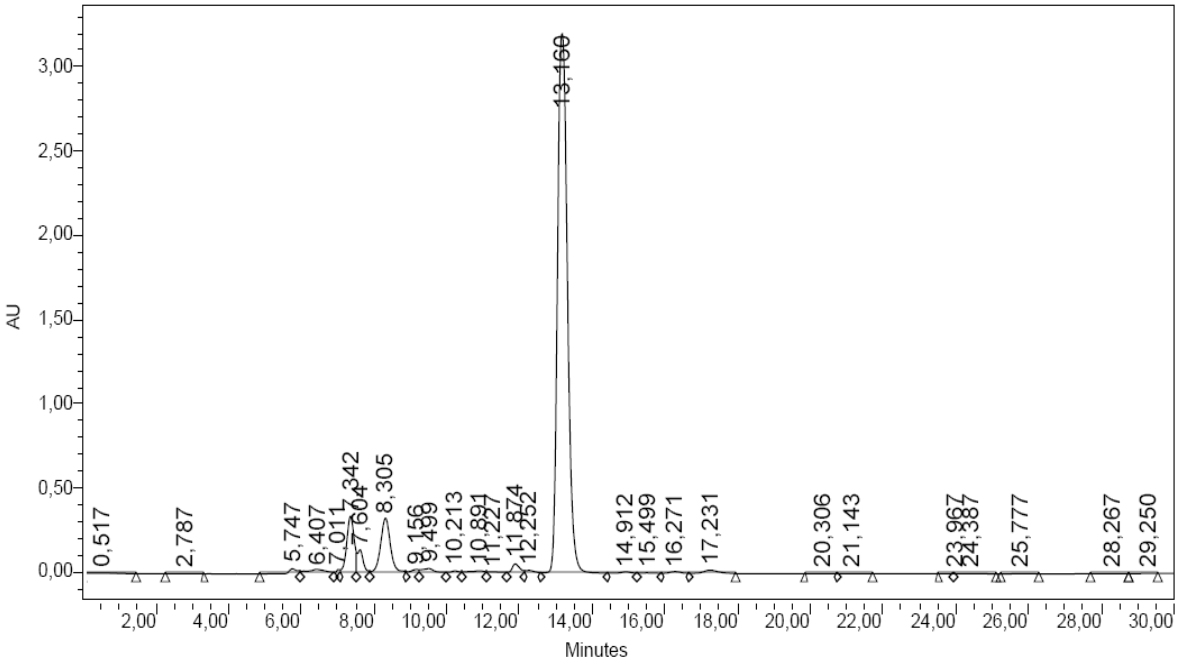

Figura 4.25. Cromatograma em HPLC do meio 4 preparado com água Milliq em 70 horas de fermentação.

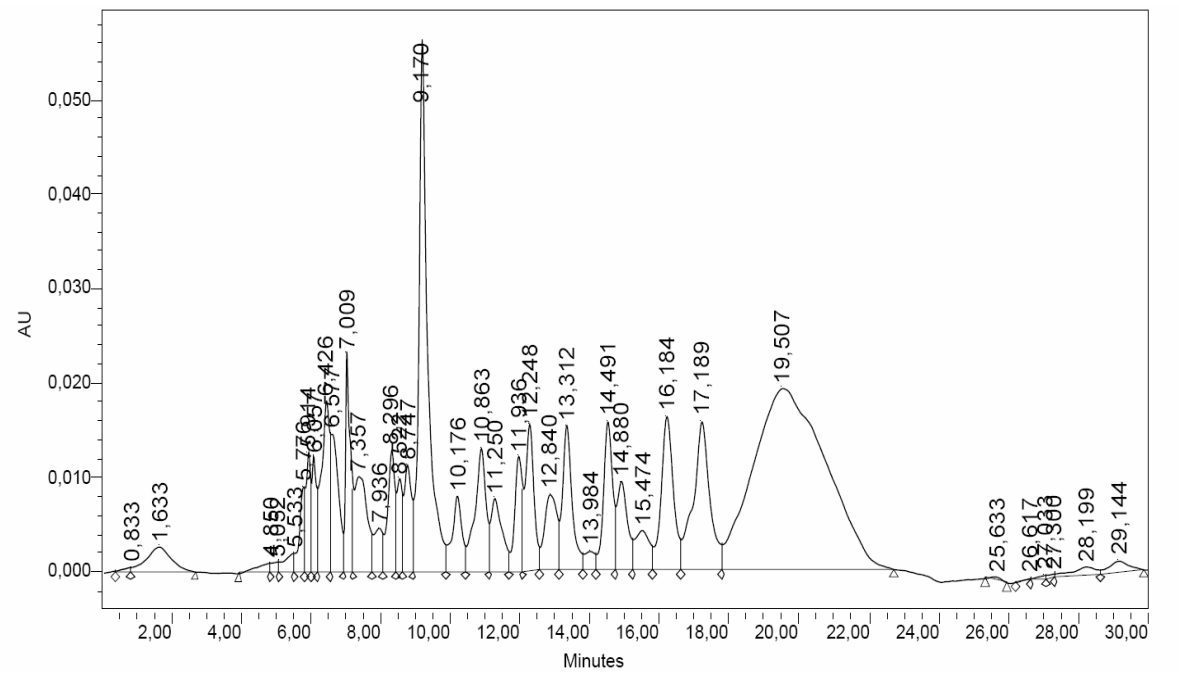

Figura 4.26. Cromatograma em HPLC do meio 4 preparado com água Milliq no final do cultivo.

4.2. Primeiro Planejamento Fatorial

Observando-se que não houve produção do ácido cítrico, apesar da formação de algum ácido orgânico sem identificação exata, nos meios elaborados tanto com água destilada quanto com água Milliq partiu-se para novos experimentos utilizando água deionizada e aumentando-se a relação carbono/nitrogênio. Desta forma, quando a fonte de nitrogênio é limitante, o crescimento celular fica limitado e a fonte de carbono é desviada para a produção de metabólitos que não precisam da presença de nitrogênio (MORGUNOV *et al.*, 2004; LEVINSON *et al.*, 2007). Foi estudada também a influência da agitação. PAPANIKOLAOU *et al.* (2002) cita que a biosíntese de ácido cítrico é favorecida em condições eficientes de aeração e agitação. A influência da relação C/N e agitação foi investigada por meio de planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} descrito no item 3.7.3 na seção materiais e métodos.

A Figura 4.27 apresenta o perfil da produção de ácido cítrico nos experimentos deste planejamento experimental, cuja dosagem foi realizada utilizando o método químico de MARIER & BOULET (1958). É possível perceber que houve produção significativa apenas no Ensaio 1 com 2,5 g/L em 70 h de processo e no Ensaio 2 em aproximadamente 8 g/L no tempo de 92 h, que contém as maiores razões molares C/N, ou seja, quando a fonte de nitrogênio é limitante.

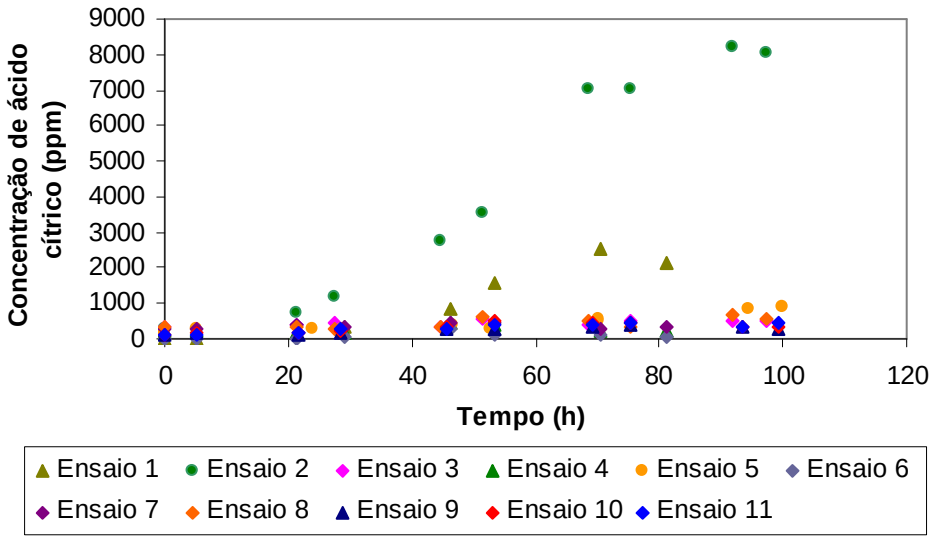

Figura 4.27. Cinética de produção de ácido cítrico para os experimentos do 1º planejamento experimental no cultivo de *Yarrowia lipolytica*. Dosagem pelo método químico de MARIER & BOULET (1958).

Para confirmar os resultados de dosagem da concentração de ácido cítrico realizada pelo método químico, análises utilizando o método enzimático (*Biopharm*) foram executadas, cujo príncipio consiste na dosagem específica de ácido cítrico. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.2, junto com as condições para cada um dos experimentos e suas respectivas razões molares C/N. A dosagem enzimática confirma que apenas os ensaios 1 e 2 produziram uma quantidade significativa de ácido cítrico. Pelo ensaio 1 foram produzidos 0,59 g/L em 81 h de processo e pelo ensaio 2 foram produzidos 0,55 g/L de ácido cítrico em 45 h. Nota-se que houve discrepância entre os valores dos métodos químico e enzimático. Isto pode ser decorrente ao fato do método químico não dosar unicamente o ácido cítrico. Portanto, foi utilizado somente o método enzimático para dosagem de ácido cítrico dos demais ensaios.

Observando a Tabela 4.2, a produção de ácido cítrico em termos de concentração máxima e produtividade foi maior para os dois ensaios cujas razões molares foram as mais altas deste planejamento, seguindo o mesmo comportamento observado por PAPANIKOLAU *et al* (2002). A partir do ensaio 1, cuja razão molar C/N foi de 325, houve a produção de 0,5903 g/L de ácido cítrico, que foi a máxima obtida neste planejamento, já o ensaio 2 gerou a maior produtividade de 0,01242 g/L*h na razão molar C/N de 1623. Em termos de coeficiente de rendimento (concentração de ácido cítrico produzido/glicerol utilizado inicialmente), o Ensaio 1 foi o melhor.

Tabela 4.2 Planejamento experimental e respectivos resultados para a otimização do 1º planejamento experimental, 2^{k-1}, k = 4. Dosagem de ácido cítrico realizada por método enzimático.

Ensaio	Glicerol PA (g/L)	Extrato de Lêvedo (g/L)	(NH4)2SO4 (g/L)	Agitação (rpm)	Ácido Cítrico (g/L)	Produtividade (g/L*h)	Razão Molar C/N
1	40	0,5	0	160	0,5903 (81 h)	0,00728	325
2	200	0,5	0	250	0,5526 (45 h)	0,01242	1623
3	40	10	0	250	0,0129 (27 h)	0,00047	16
4	200	10	0	160	0,0147 (46 h)	0,00032	81
5	40	0,5	10	250	0,0069 (100 h)	0,00007	8
6	200	0,5	10	160	0,0028 (46 h)	0,00006	42
7	40	10	10	160	0,0245 (46 h)	0,00053	6
8	200	10	10	250	0,0202 (92 h)	0,00022	28
9	120	5,25	5	205	0,0128 (75 h)	0,00024	33
10	120	5,25	5	205	0,0166 (53 h)	0,00031	33
11	120	5,25	5	205	0,0114 (99 h)	0,00021	33

Para análise estatística utilizando o programa *statistica*, versão 7.0, a máxima concentração e produtividade de ácido cítrico foram os parâmetros utilizados como variáveis de resposta.

A magnitude dos efeitos estimados de cada variável é apresentada no diagrama de Pareto (Figura 4.28), fornecendo o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis possui sobre a concentração final de ácido cítrico, e estabelecendo quais destes efeitos encontram-se dentro do grau de confiança estabelecido para a análise (90%).

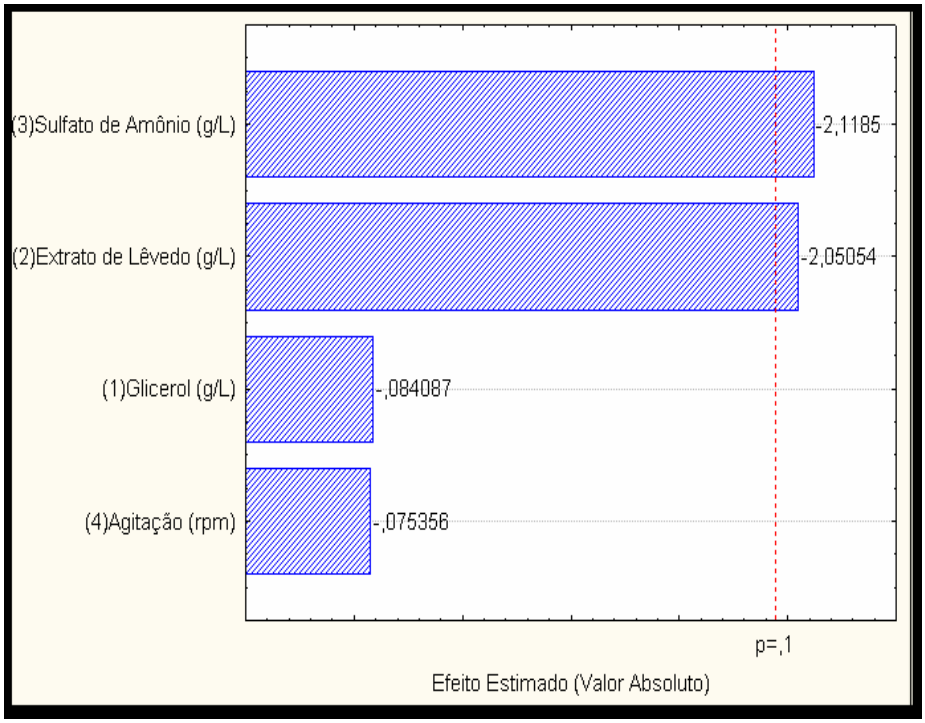

Figura 4.28. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}. A variável dependente é a concentração de ácido cítrico.

Analisando o diagrama de pareto, observa-se que as variáveis concentrações de sulfato de amônio e de extrato de lêvedo são estatisticamente significativas e exercem um efeito negativo, indicando que níveis menores levariam à obtenção de concentração mais alta de ácido cítrico. O glicerol e a agitação não influenciaram estatisticamente a resposta, dentro das condições estudadas.

Para alcançar uma produção maior de ácido cítrico três ensaios foram realizados utilizando as condições dos ensaios 1 e 2 deste primeiro planejamento experimental e adicionando acetato de sódio ao meio de cultivo uma vez que VENTER *el al.* (2004) conseguiram aumentar a produção de ácido cítrico em torno de 37 vezes no cultivo de *Yarrowia lipolytica* UOFS Y – 1701 em óleo de girassol adicionando acetato de sódio ao meio na proporção de 1:3. Como a fonte de carbono do presente estudo é diferente, foram elaborados 3 ensaios com proporções distintas. No ensaio 1 utilizou-se as condições do ensaio 2 do 1º planejamento, ou seja, 200 g/L de glicerol PA, 0,5 g/L de extrato de lêvedo com 250 rpm de agitação, e para seguir a mesma proporção massa de acetato:massa de fonte de carbono utilizada pelo autor foram adicionados 67 g/L de acetato de sódio ao meio. No ensaio 2 utilizou-se a as mesmas condições do ensaio 2 do 1º planejamento, porém apenas adicionou-se 10 g/L de acetato de sódio ao meio, pois VENTER *el al.* (2004) em seus estudos trabalharam com 10 g/L de acetato de sódio para 30 g/L de óleo de girassol. Para o ensaio 3 foi utilizada as mesmas concentrações de massa de acetato e massa de fonte de carbono utilizada pelo autor, ou seja, 10 g/L de acetato de sódio para 30 g/L de glicerol PA, com 0,5 g/L de extrato de lêvedo e a 160 rpm (condição do ensaio 1 do 1º planejamento). O 4º ensaio diferenciou-se do ensaio 2 do 1º planejamento apenas pela composição do pré-inóculo, com a substituição da glicose por glicerol puro.

A Tabela 4.3 ilustra as condições para cada um dos experimentos. Esta nova tentativa, porém, não obteve sucesso conforme resultados apresentados na Tabela 4.4. Todas as concentrações de ácido cítrico obtidas foram menores que 0,59 g/L (máxima concentração obtida pelo 1º planejamento). As cinéticas dos cultivos dos quatro ensaios realizados são apresentadas na Figura 4.30. O pH dos ensaios 1, 2 e 3 permaneceu próximo a neutralidade até o final do processo. Nestes ensaios foi acrescentado acetato de sódio. O crescimento celular no ensaio 1 ficou inibido, permanecendo praticamente constante até o final do processo. Provavelmente, o componente acetato de sódio foi acrescentado em excesso inibindo o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica*. Apesar de o ensaio 1 ter o menor crescimento celular em relação aos ensaios 2 e 3, foi o que gerou uma quantidade menos desprezível de concentração de ácido cítrico. Provavelmente porque quando se promove crescimento celular, a produção de acido cítrico é inibida. O perfil de crescimento celular do ensaio 2 com adição de 10 g/L de acetato de sódio (Figura 4.30) foi semelhante ao perfil do ensaio 2 do 1º planejamento

(Figura 4.29). O crescimento celular para o ensaio 3 foi favorecido. Houve redução do valor de pH ao longo do processo para o ensaio 4 e o perfil de crescimento foi semelhante ao ensaio 2 do 1º planejamento experimental, porém a concentração de ácido cítrico foi a menor obtida.

Tabela 4.3 – Ensaios utilizando a composição dos ensaios 1 e 2 do 1º planejamento experimental com adição de acetato de sódio.

Ensaio	Glicerol PA (g/L)	Acetato (g/L)	Pré-Inóculo	Rotação (rpm)	Extrato de Lêvedo (g/L)
1	200	67	Glicose	250	0,5
2	200	10	Glicose	250	0,5
3	30	10	Glicose	160	0,5
4	200	0	Glicerol	250	0,5

Tabela 4.4. Concentração máxima obtida pelos ensaios com adição de acetato de sódio.

Ensaio	Ácido Cítrico (g/L)
1	0,24 (72 h)
2	0,15 (89 h)
3	0,17 (72 h)
4	0,06 (89 h)

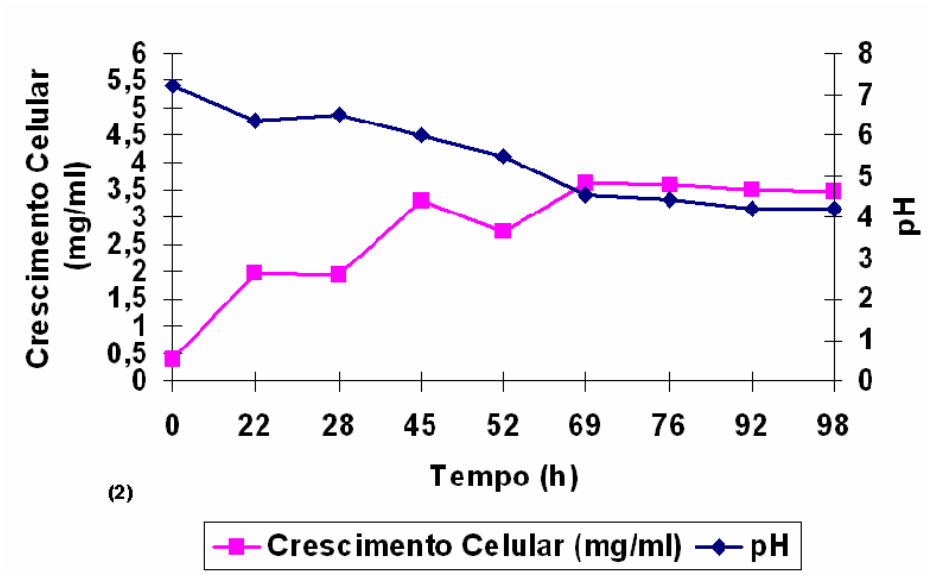

Figura 4.29. Cinética de crescimento celular e pH no cultivo de *Yarrowia lipolytica* do ensaio 2 do 1º planejamento experimental.

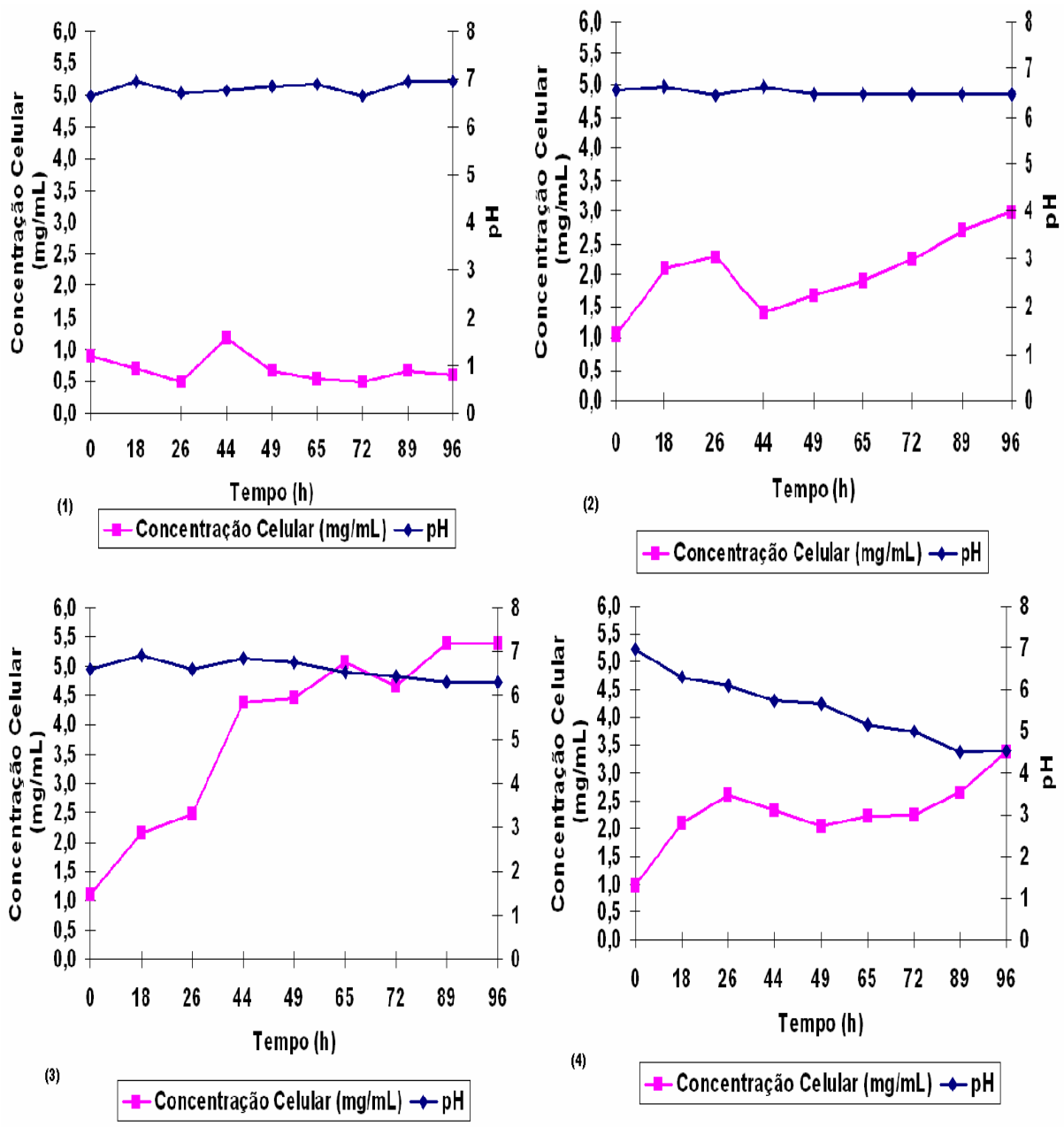

Figura 4.30. Cinética de crescimento celular e pH no cultivo de *Yarrowia lipolytica* dos ensaios 1, 2 e 3 com adição de acetato e ensaio 4 substituindo a glicose do pré-inóculo por glicerol puro.

4.3. Segundo Planejamento Experimental 2^k, sendo K = 2

Com o objetivo de otimizar a produção de ácido cítrico, um segundo planejamento fatorial completo do tipo 2^k, onde k = 2 foi elaborado. Os parâmetros adotados como variáveis independentes foram: concentrações de glicerol PA e de extrato de lêvedo. Aumentou-se a faixa de trabalho da variável concentração de glicerol PA e diminuiu-se a faixa de trabalho da concentração de extrato de lêvedo em relação aos valores usados no primeiro planejamento uma vez que para a faixa de 40 a 200 g/L a variável concentração de glicerol PA não foi estatisticamente significativa e a variável

concentração de extrato de lêvedo foi significativa estatisticamente com efeito negativo sobre a resposta concentração de ácido cítrico. Como a agitação não influenciou a resposta na faixa estudada e uma vez que obteve-se o melhor resultado no ensaio 2 em termos de produtividade de ácido cítrico, a agitação foi mantida constante e igual a 250 rpm. Não houve adição de sulfato de amônio neste planejamento. A Tabela 4.5 mostra os valores adotados para as duas variáveis independentes estudadas.

Tabela 4.5. Fatores e níveis analisados no 2º planejamento experimental 2^k, com k=2

	Nível		
Variáveis Independentes	**-1**	**0**	**1**
Concentração de Glicerol PA (g/L)	150	200	250
Concentração de Extrato de lêvedo (g/L)	0,1	0,5	0,9

A Tabela 4.6 mostra os resultados do planejamento fatorial completo 2^2 assim como os valores das concentrações de glicerol PA e extrato de lêvedo utilizadas.

Tabela 4.6. Matriz do 2º planejamento fatorial com os valores reais e os resultados experimentais.

Ensaio	Glicerol PA (g/L)	Lêvedo (g/L)	Ácido Cítrico (g/L)	Razão Molar C/N	$Y_{Cit/glic}$ (mg/g)
1	150	0,1	2,51 (76 h)	6085	18,00
2	250	0,1	1,62 (45 h)	10141	6,48
3	150	0,9	0,90 (76 h)	676	6,00
4	250	0,9	0,74 (76 h)	1127	2,96
5	200	0,5	1,37 (76 h)	1622	6,85
6	200	0,5	1,13 (76 h)	1622	5,65

Os dados apresentados na Tabela 4.6 indicam que a concentração de ácido cítrico variou de 0,74 a 2,51 g/L. É possível observar que as maiores produções de ácido cítrico foram obtidas quando foram utilizadas as maiores razões molares de C/N (experimentos 1 e 2). O fator de rendimento de produto em relação à concentração inicial do substrato ($Y_{Cit/glic}$) foi maior para o ensaio 1 (18,00 mg/g), ou seja, para cada grama de substrato adicionado ao meio há a produção de 0,018 g de ácido cítrico para este ensaio. A concentração de ácido isocítrico no ponto de máxima produção de ácido cítrico (76 h) foi 0,98 g/L, proporcionando uma razão ácido cítrico: ácido isocítrico ($R_{AC/AIC}$) de 2,56:1.

A magnitude dos efeitos estimados de cada variável é apresentada no diagrama de Pareto (Figura 4.31), fornecendo o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis possui sobre a concentração final de ácido cítrico, e estabelecendo quais destes efeitos encontram-se dentro do grau de confiança estabelecido para a análise (90%).

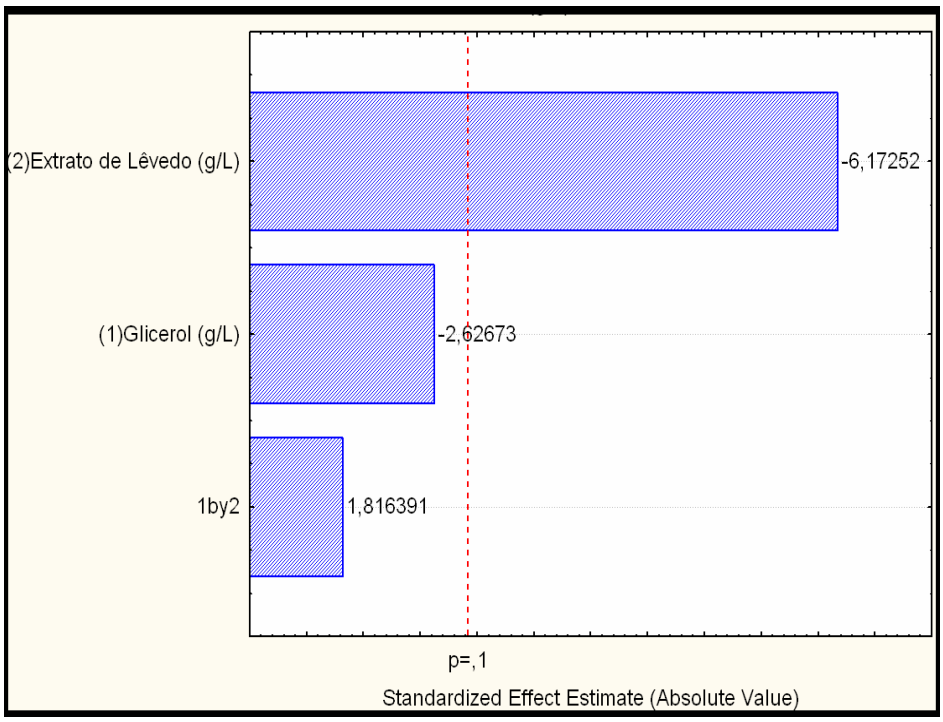

Figura 4.31. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial completo 2^2 Variável dependente: Concentração de ácido cítrico (g/L).

A variável concentração de glicerol PA não é significativa estatisticamente, não influenciando a resposta de concentração de ácido cítrico na faixa estudada, ou seja, de 150 a 250 g/L. A interação entre as duas variáveis também não influenciou a resposta nas condições estudadas. Já a variável extrato de lêvedo é estatisticamente significativa com efeito negativo, ou seja, uma diminuição da concentração deste levaria a um aumento da concentração de ácido cítrico.

A ANOVA (Análise de Variância) considerando todos os termos está apresentada na Tabela 4.7. O coeficiente de determinação para a concentração de ácido cítrico foi igual a 96%. O teste F foi significativo já que o F calculado foi maior que o F tabelado (9,16), sendo o modelo adequado (equação. 4.1) para descrever os resultados através de superfície de resposta.

Tabela 4.7 – Análise de variância para a concentração de ácido cítrico obtida no 2º planejamento experimental.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}
Regressão	1,953118	3	0,651039	16,10
Resíduo	0,080876	2	0,040438	
Total	2,033994	5		

$F_{3;\,2;\,0,1}$ = 9,16; Coeficiente de determinação: R^2 = 96%

$$\text{Ácido Cítrico (g/L)} = 1{,}38 - 0{,}26 * X_1 - 0{,}62 * X_2 + 0{,}18 * X_1X_2 \qquad (4.1)$$

sendo:

X_1: Concentração de glicerol PA (g/L)

X_2: Concentração de extrato de lêvedo (g/L)

Os melhores valores de concentração de ácido cítrico (g/L) foram obtidos em meios compostos por 150 g/L ou 250 de glicerol PA e 0,1 g/L de extrato de levedura, ou seja, na menor concentração de nitrogênio.

Com o objetivo de interpretar com maior clareza o comportamento da produção ácido cítrico dentro das possíveis condições de processo, a superfície de resposta e a curva de contorno são apresentadas nas Figuras 4.32 e 4.33, onde é apresentado o perfil da variação da concentração de ácido cítrico em função das duas variáveis glicerol PA e extrato de levedura.

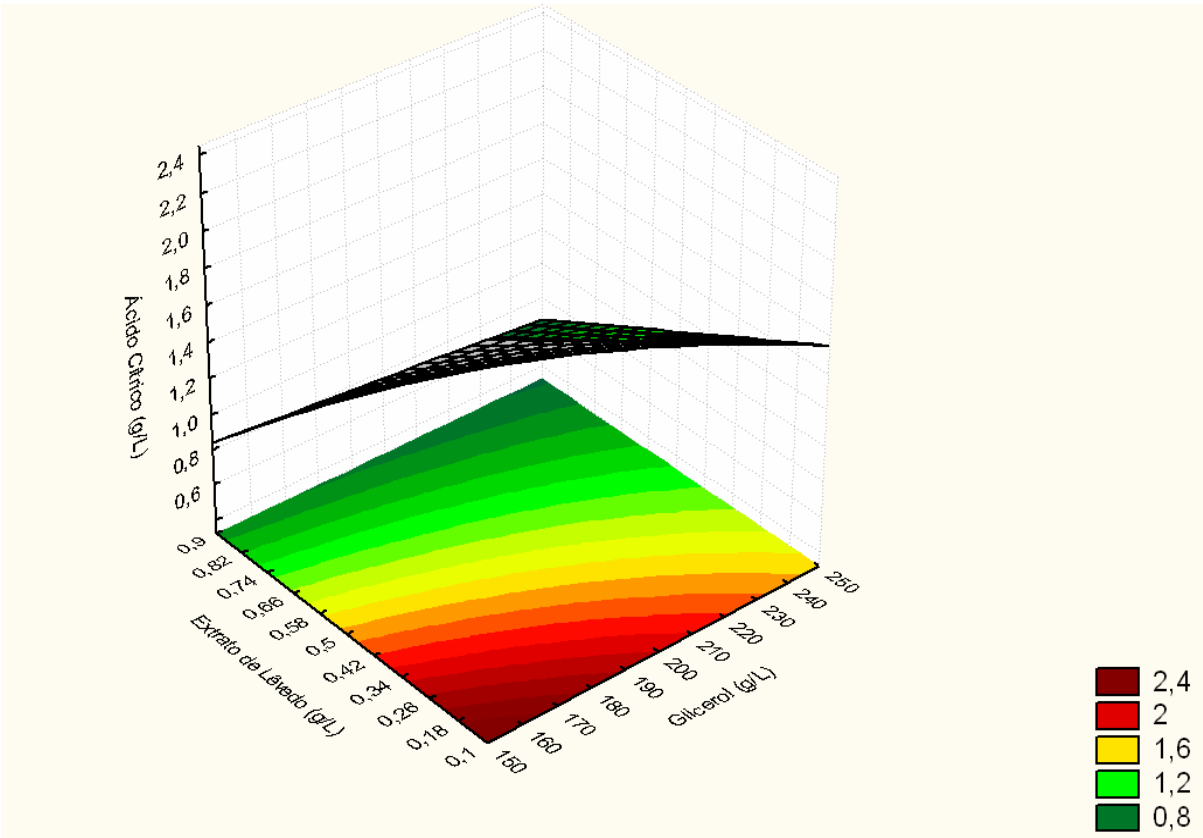

Figura 4.32 – Superfície de resposta da concentração de ácido cítrico em relação às concentrações de glicerol PA e de extrato de levedura do 2º Planejamento Experimental 2^k no cultivo de *Yarrowia lipolytica.*

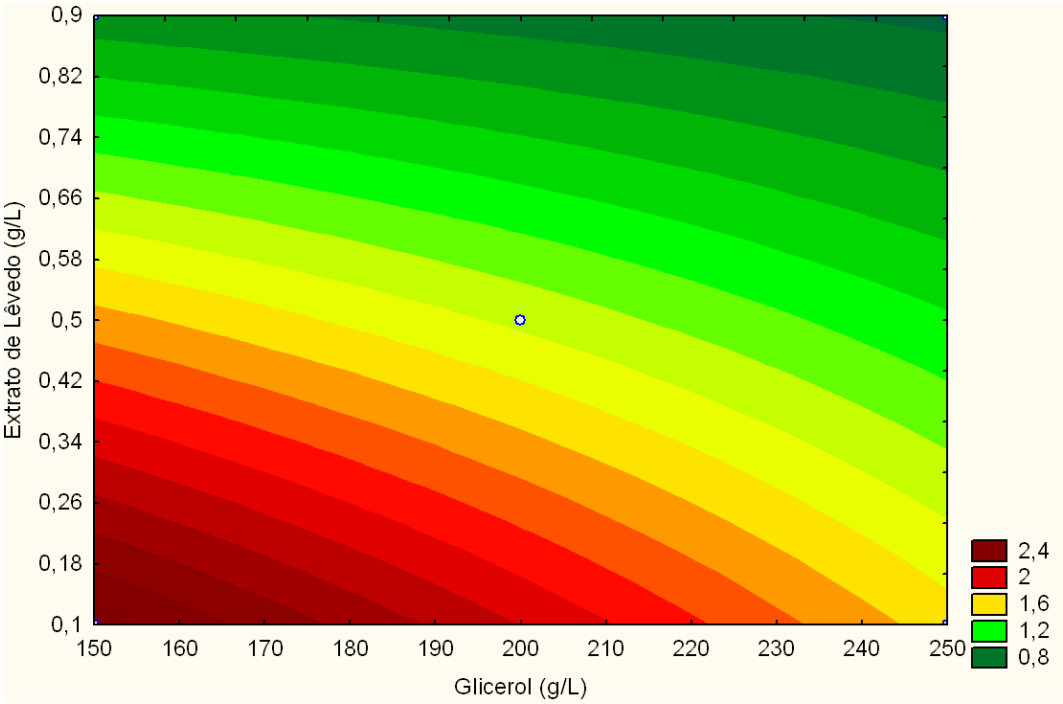

Figura 4.33. Curva de contorno para a concentração de ácido cítrico em relação às concentrações de glicerol PA e de extrato de levedura do 2º Planejamento Experimental 2^k no cultivo de *Yarrowia lipolytica*.

Através da análise da superfície de resposta e da curva de contorno verifica-se que a diminuição das concentrações de extrato de levedura e de glicerol PA conduzem a maiores valores finais de concentração de ácido cítrico. Quando o meio contém 150 g/L de glicerol PA e 0,1 g/L de extrato de levedura a 250 rpm, a produção de ácido cítrico pode ser superior a 2,51 g/L.

A partir dos resultados do segundo planejamento experimental e observando que o ensaio 1 forneceu uma concentração de ácido maior, um experimento foi realizado substituindo o glicerol P.A por glicerol proveniente da produção de biodiesel nas mesmas condições do ensaio 1 do 2º planejamento, ou seja, concentração de glicerol igual a 150 g/L, extrato de lêvedo igual a 0,1 g/L, utilizando 250 rpm de agitação e em meio mineral não tamponado. Para este ensaio houve uma produção de 3,65 g/L de ácido cítrico em 98 h de processo conforme é ilustrado na Figura 4.34. A razão molar C/N é de 6085 e o $Y_{Cit/glic}$ é de 0,024.

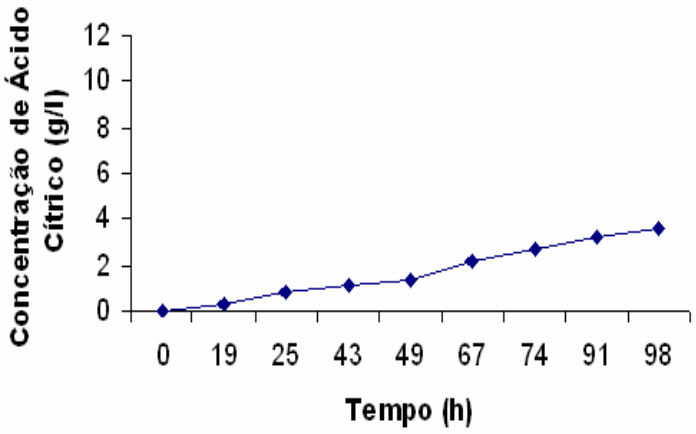

FIGURA 4.34. Produção de Ácido Cítrico utilizando os mesmos valores dos fatores do ensaio 1 do 2º planejamento utilizando glicerol proveniente da produção do biodiesel em meio mineral não tamponado

Novos ensaios foram realizados utilizando os mesmos valores do ensaio 1 do 2º planejamento para avaliar a influência do meio mineral tamponado na produção de ácido cítrico. A nova composição para o meio mineral tamponado foi anteriormente citada na Seção 3.7.4 de materiais e métodos. Nessas condições, o glicerol da produção do biodiesel também foi testado. Utilizando o glicerol PA em meio mineral tamponado foi produzido 10,65 g/L de ácido cítrico em 98 h conforme é mostrado na Figura 4.35. O $Y_{cit/glic}$ foi igual a 71 mg/g aumentando, aproximadamente, 4 vezes em relação ao mesmo ensaio em meio mineral não tamponado. A razão molar C/N é de 6085. A concentração de ácido isocítrico foi de 1,53 g/L no tempo final de processo igual a 98 h, estabelecendo uma razão ácido cítrico: isocítrico ($R_{AC/ISC}$) de 6,96:1, que aumentou 3

vezes comparado com a razão ácido cítrico:isocítrico do ensaio 1 do 2º planejamento em meio mineral não tamponado.

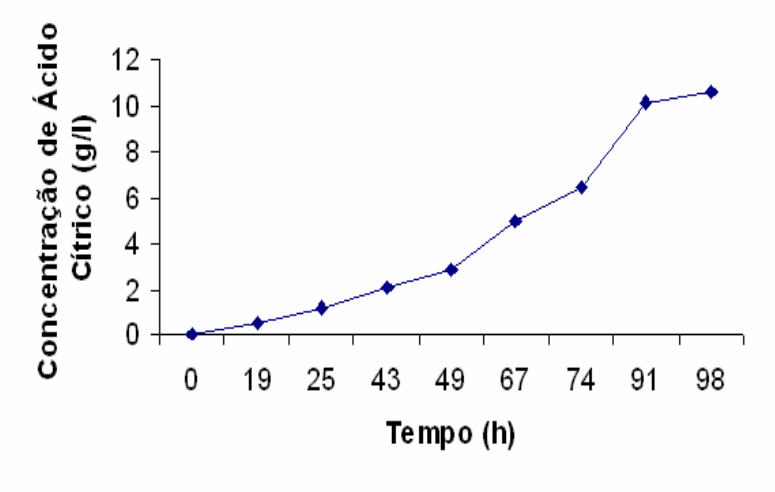

FIGURA 4.35. Produção de Ácido Cítrico utilizando os mesmos valores dos fatores do ensaio 1 do 2º planejamento experimental utilizando glicerol P.A em meio mineral tamponado

Para o experimento que utilizou o co-produto gerado na produção do biodiesel em meio mineral tamponado a produção obtida foi de 4,18 g/L de ácido cítrico após 98h de processo, conforme ilustrado na Figura 4.36. A razão molar C/N é de 6085 e o $Y_{cit/glic}$ obtido foi 0,028.

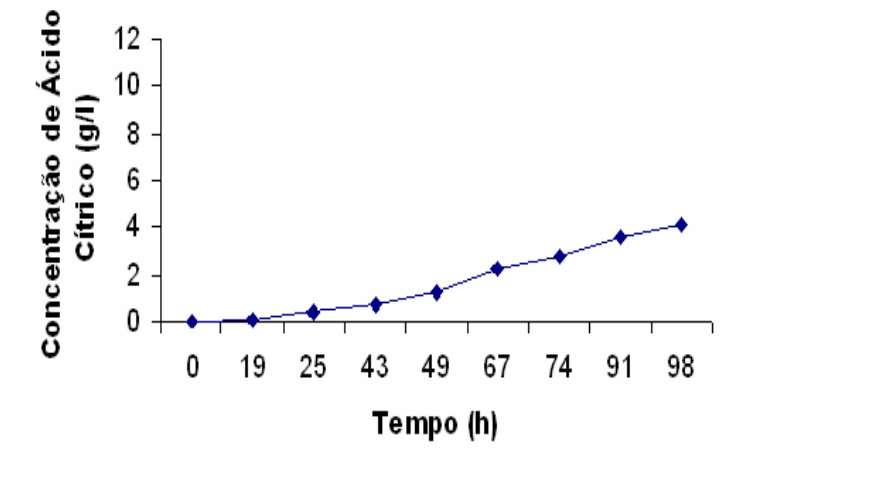

FIGURA 4.36. Produção de Ácido Cítrico utilizando os mesmos valores dos fatores do ensaio 1 do 2º planejamento experimental utilizando glicerol do biodiesel em meio mineral tamponado

A concentração dos sais que compõem o meio mineral influenciou a produção final de ácido cítrico. Em meio mineral tamponado, utilizando tanto o glicerol P.A quanto glicerol da produção de biodiesel, a concentração de ácido cítrico foi maior. Resultados similares foram encontrados por PAPANIKOLAOU *et al.* (2002).

Analisando a Figura 4.37 relacionada aos perfis de crescimento celular e pH dos ensaios 1 do 2º planejamento em meio mineral não tamponado (Figura 4.37 A) e em meio mineral tamponado (Figura 4.37 B), foi observado que o crescimento de *Yarrowia lipolytica* foi favorecida pelo meio mineral não tamponado e a maior variação de pH foi também para este ensaio, de 6,66 para 4,08. Para o ensaio 1 do 2º planejamento em meio mineral tamponado o pH variou de 7,34 para 5,76. A produção de ácido cítrico foi maior para o ensaio de menor crescimento celular, ou seja, para o ensaio em meio mineral tamponado. Portanto, todos os ensaios dos planejamentos seguintes foram conduzidos em meio mineral tamponado.

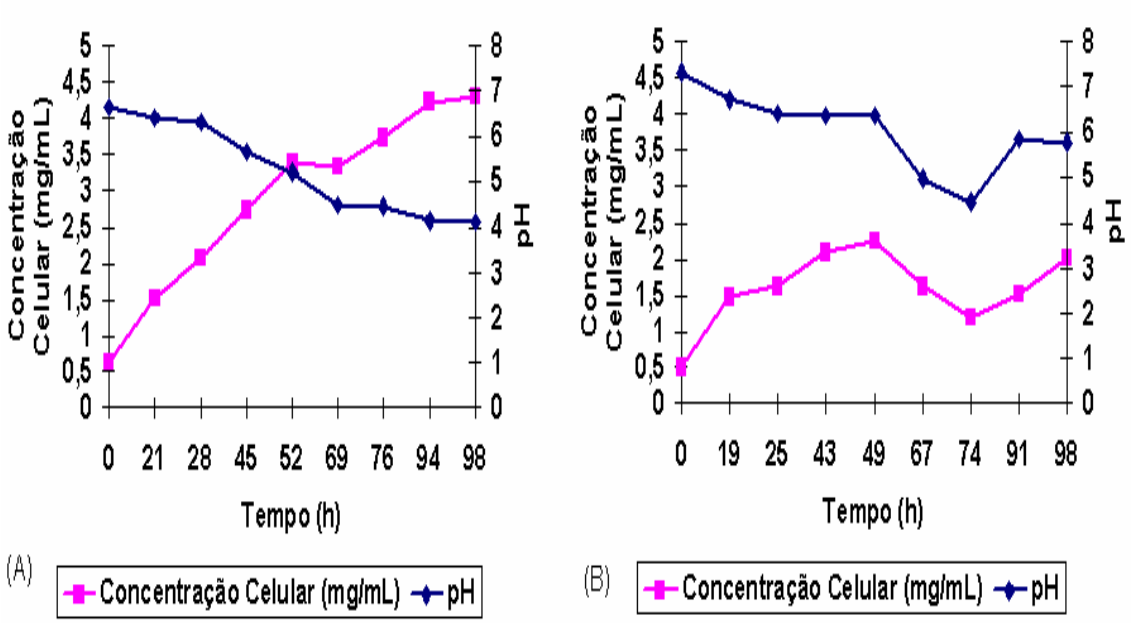

Figura 4.37. Cinética de crescimento celular e pH no cultivo de *Yarrowia lipolytica* dos ensaios 1 do 2º planejamento experimental em meio mineral não tamponado (A) e em meio mineral tamponado (B).

4.4. Terceiro Planejamento Experimental 2^k, sendo K = 3

Com o objetivo de investigar o efeito das concentrações de glicerol e de extrato de levedura na produção de ácido cítrico, um terceiro planejamento experimental foi realizado. Para selecionar as melhores condições para a produção de ácido cítrico, foi aplicado o método do planejamento fatorial 2^3 completo, com o uso do programa de computação *Statistica* 7.0. Como o segundo planejamento indicou um efeito negativo do glicerol PA, a faixa de concentração de glicerol adotada foi de 30 a 50 g/L (baseado no ensaio 1 do 1º planejamento experimental) e os níveis mínimos e máximos para a concentração de extrato de levedura foram 0,1 a 0,9 g/L, respectivamente. A agitação entrou como variável independente neste planejamento na faixa de 160 a 250 rpm respectivamente.

O valor original e codificado de cada nível utilizado e os 10 ensaios com as respostas concentração de ácido cítrico e produtividade estão apresentados na Tabela 4.8.

Os valores das variáveis respostas concentração de ácido cítrico e produtividade de ácido cítrico variaram de 0,68 a 14,04 g/L e 0,007 a 0,149 g/(L.h) nas condições estudadas, para os 10 experimentos. É valido ressaltar que a diferença entre estes pontos de máximo e mínimo é bem maior do que a variação do valor da concentração de ácido cítrico e produtividade para as condições do ponto central, onde se estuda a reprodutibilidade dos experimentos, indicando que as variações observadas nos valores da concentração e produtividade de ácido cítrico são decorrentes das diferenças na formulação dos meios de cultivo estudados.

Os melhores resultados para concentração de ácido cítrico e produtividade foram obtidos nos mesmos ensaios, os ensaios 5 e 6, com 30 e 50g/L de glicerol PA, 0,1 g/L de extrato de levedura e a 250 rpm, ou seja, quando se realizou os experimentos na menor concentração de extrato de lêvedo e na maior agitação. Além disso, os ensaios que foram realizados utilizando menores níveis para a agitação resultaram em uma menor produção de ácido cítrico.

Tabela 4.8. Código e valores reais das variáveis do planejamento experimental 2^k, sendo k = 3

Ensaio	Glicerol PA		Extrato de Lêvedo		Agitação		Ácido Cítrico	Produtividade	Razão Molar	$Y_{Cit / Glic}$
	Código	Valor (g/L)	Código	Valor (g/L)	Código	Valor (rpm)	(g/L)	(g/ (L.h))	C/N	
1	-1	30	-1	0,1	-1	160	1,67 (80 h)	0,021	1217	0,056
2	1	50	-1	0,1	-1	160	1,46 (94 h)	0,016	2028	0,029
3	-1	30	1	0,9	-1	160	0,69 (101 h)	0,007	135	0,023
4	1	50	1	0,9	-1	160	0,68 (80 h)	0,009	225	0,014
5	-1	30	-1	0,1	1	250	14,04 (93 h)	0,149	1217	0,468
6	1	50	-1	0,1	1	250	11,40 (93 h)	0,121	2028	0,228
7	-1	30	1	0,9	1	250	7,89 (93 h)	0,084	135	0,263
8	1	50	1	0,9	1	250	6,35 (93 h)	0,068	225	0,127
9	0	40	0	0,5	0	205	4,69 (96 h)	0,046	325	0,117
10	0	40	0	0,5	0	205	4,91 (88 h)	0,052	325	0,123

Analisando a cinética de crescimento celular dos ensaios do 3º planejamento e relacionando com a concentração máxima de ácido cítrico obtida, observa-se que para os ensaios onde o crescimento celular foi alto, a concentração de ácido cítrico foi menor. O ensaio 1 ilustrado na Figura 4.38 atingiu a máxima concentração celular de 6,40 mg/mL e produziu apenas 1,67 g/L (80 h) de ácido cítrico. O ensaio 2 alcançou a máxima concentração de biomassa de 6,82 mg/mL e uma produção de 1,46 g/L (94 h) de ácido cítrico. Este comportamento foi semelhante para os ensaios 3 e 4, onde também produziu uma quantidade pequena de ácido cítrico. Para o ensaio 5 (Figura 4.39), de maior produção de ácido cítrico, o crescimento celular foi menor, com máxima concentração celular de 4,44 mg/mL e para o ensaio 6 (Figura 4.39), que também apresentou alta produção de ácido cítrico, a máxima concentração celular foi de 4,73 mg/mL. O crescimento celular para os ensaios 7 e 8 (Figura 4.39) foi 7,04 mg/mL e 7,44 mg/mL respectivamente.

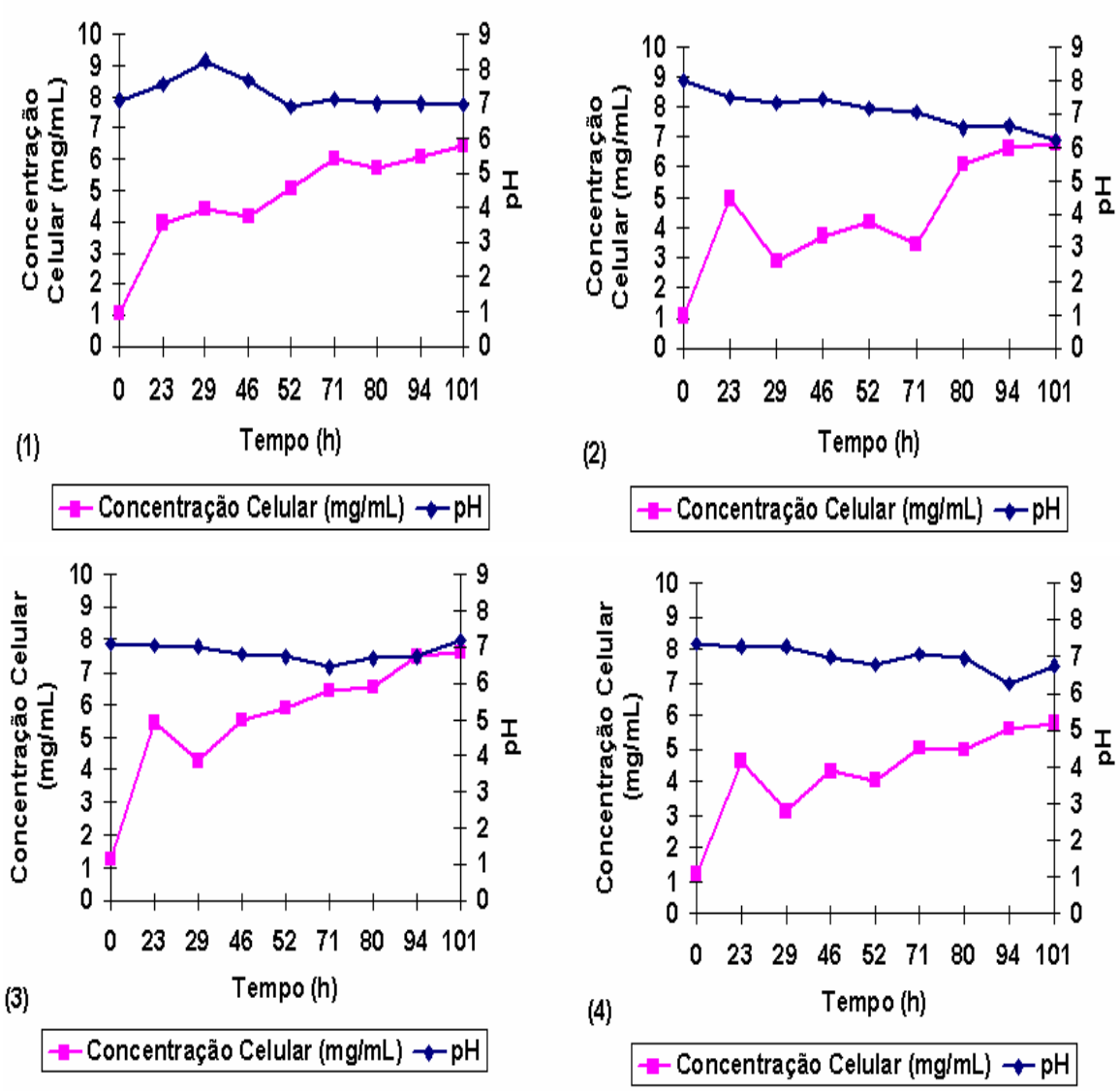

Figura 4.38. Cinética de crescimento celular e pH no cultivo de *Yarrowia lipolytica* dos ensaios 1 - 4 do 3º planejamento

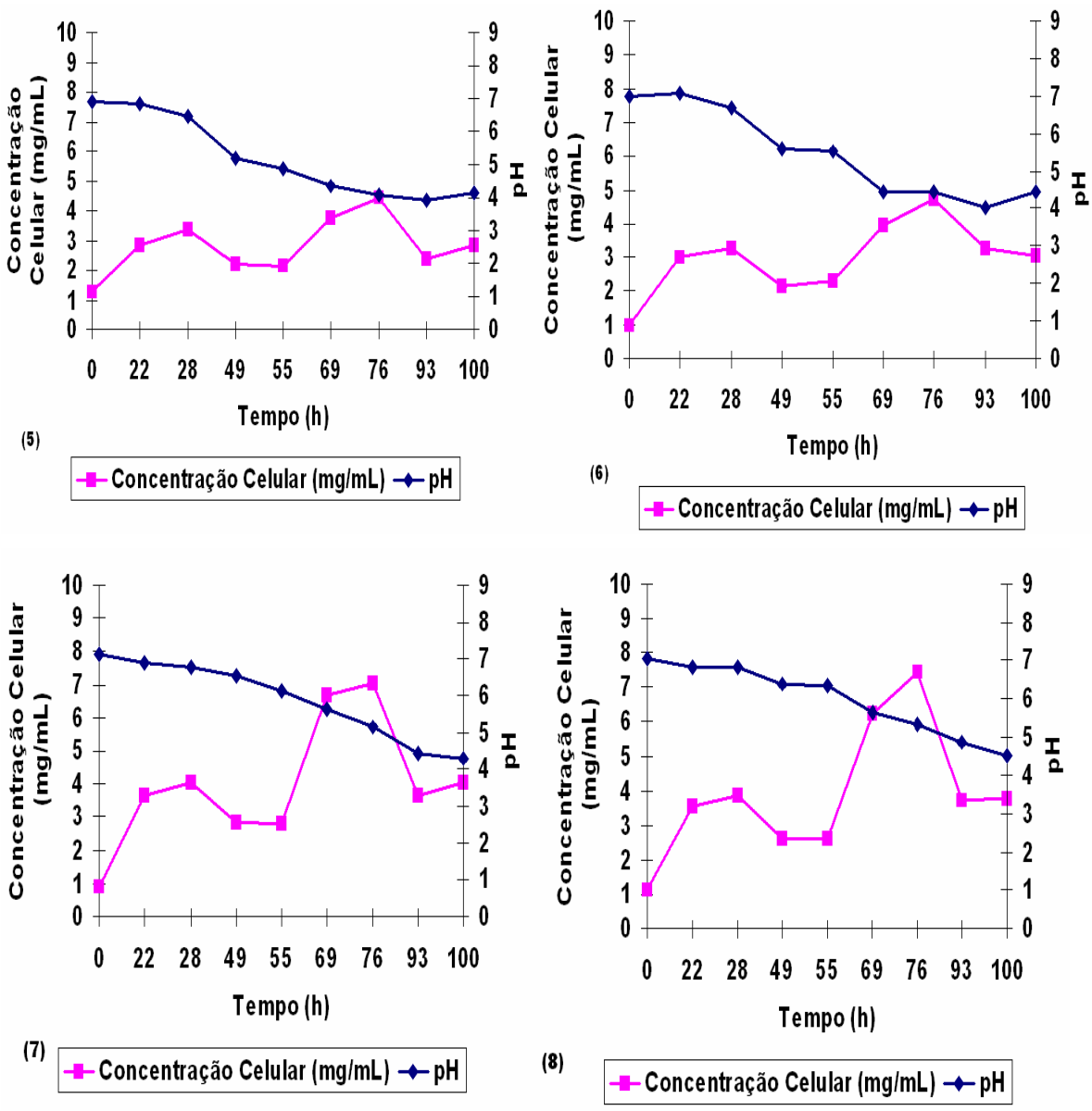

Figura 4.39. Cinética de crescimento celular e pH no cultivo de *Yarrowia lipolytica* dos ensaios 5 - 8 do 3º planejamento.

A Figura 4.40 apresenta o diagrama de Pareto do 3º planejamento experimental calculado considerando diferentes tipos de interação entre as variáveis independentes e para a variável dependente concentração de ácido cítrico. Analisando o diagrama foi observado que a variável agitação foi a que apresentou um maior efeito significativo sobre a variável de resposta (α = 95%), seguido pela concentração de extrato de lêvedo. A agitação apresentou um efeito positivo e a concentração de extrato de lêvedo forneceu um efeito negativo, ou seja, um incremento na concentração de extrato de lêvedo (nível -1 para +1) conduziu a um decréscimo na produção de ácido cítrico. Os resultados mostram que a concentração de ácido cítrico não foi afetada pela variável concentração de glicerol PA na faixa estudada. A interação extrato de lêvedo/agitação apresentou um efeito estatisticamente negativo sobre a concentração de ácido cítrico. Além disso, as

interações glicerol PA/agitação e glicerol PA/extrato de lêvedo não influenciaram significativamente o valor da resposta na faixa de concentração estudada.

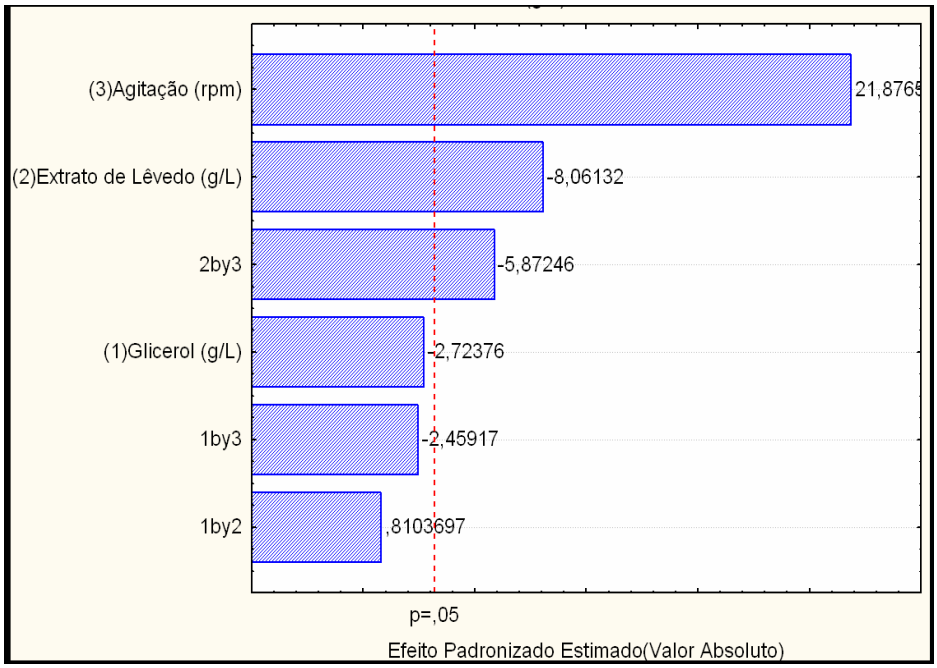

Figura 4.40. Diagrama de Pareto para a concentração de ácido cítrico do 3º planejamento experimental

O diagrama de Pareto relacionado à produtividade (Figura 4.41) apresenta os efeitos padronizados das variáveis sobre a produtividade de ácido cítrico, indicando que as variáveis agitação e concentração de extrato de lêvedo são estatisticamente significativas a 5% de significância. A interação entre as variáveis extrato de lêvedo e agitação também é estatisticamente significativa dentro da faixa estudada. É a partir do valor de $T_{\text{tabelado (3;5\%)}} = 3{,}18$ que os efeitos são determinados significativos.

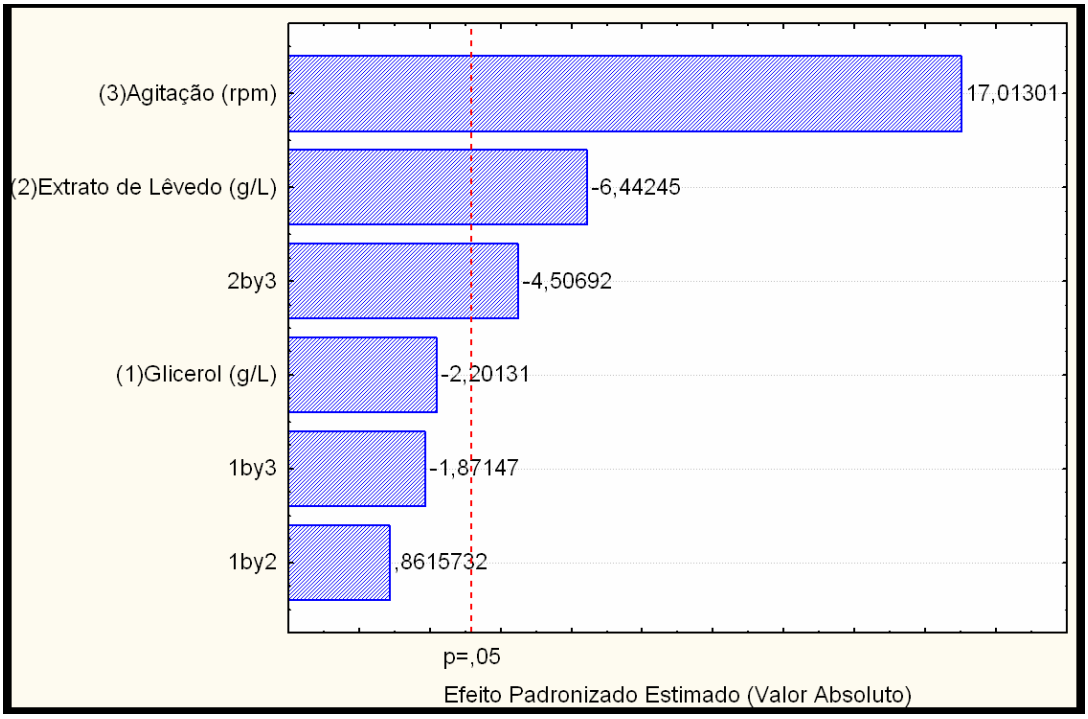

Figura 4.41. Diagrama de Pareto para a produtividade de ácido cítrico do 3º planejamento experimental

Os resultados mostraram que a agitação no nível máximo e glicerol PA e extrato de lêvedo no nível mínimo foram as melhores condições para a produção do ácido cítrico em termos de concentração e em termos de produtividade alcançando o valor de 14,04 g/L e de 0,149 g/L*h. Para este ensaio a produção de ácido isocítrico foi de 1,89 g/L no mesmo tempo em que foram produzidos 14,04 g/L de ácido cítrico após 93 h de processo, com uma razão ácido cítrico: ácido isocítrico ($R_{AC/ISC}$) de 7,4:1. Para o tempo de 100 h a produção de ácido cítrico reduziu para 3,85 g/L e a concentração de ácido isocítrico aumentou para 2,13 g/L, reduzindo a $R_{AC/ISC}$ para 1,81:1. A diminuição da concentração de ácido cítrico no final da fermentação pode ser atribuído ao fato do ácido cítrico ter sido convertido em ácido isocítrico ou ter sido consumido pela levedura para seu crescimento. Como mostra a Figura 4.42, a levedura reinicia seu crescimento de 93 h de processo até 100 h de processo, período em que houve redução da concentração de ácido cítrico.

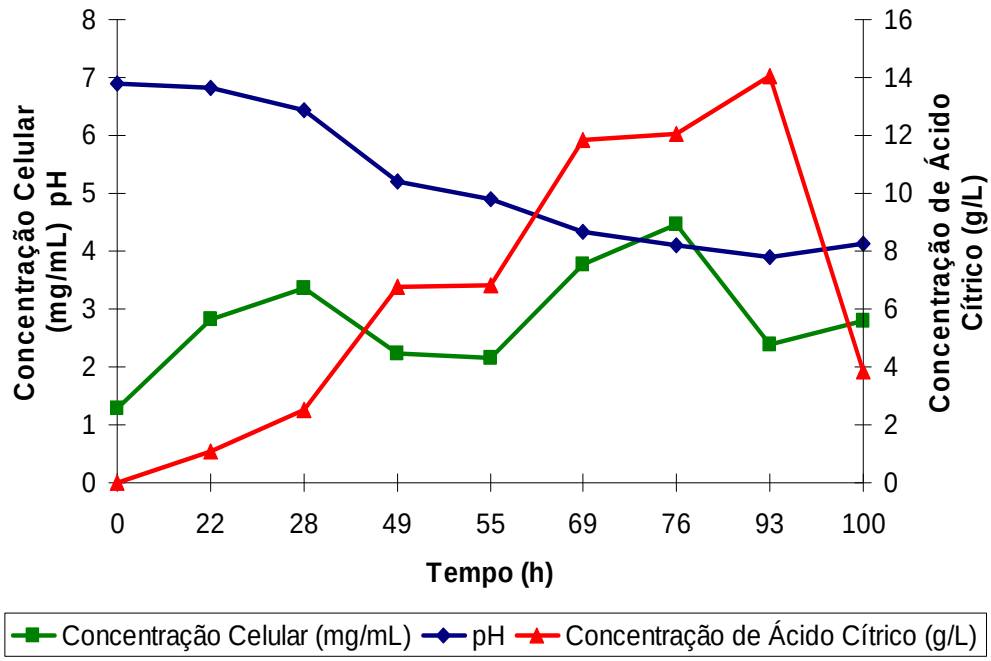

Figura 4.42. Cinética de crescimento celular, pH e concentração de ácido cítrico no cultivo de *Yarrowia lipolytica* do ensaio 5 do 3º planejamento.

O segundo ensaio de máxima produção de ácido cítrico foi o ensaio 6, com 11,40 g/L de ácido cítrico em 93 h de processo e produtividade de 0,121 g/L*h . A produção de ácido isocítrico neste ponto foi de 2,05 g/L e para o final do processo a concentração de ácido cítrico diminuiu para 3,52 g/L (Figura 4.43) enquanto a concentração de ácido isocítrico aumentou para 2,13 g/L. A $R_{AC/ISC}$ para o ponto de máxima produção de ácido cítrico foi de 5,6:1 e para o final da fermentação foi de 1,65:1. A diminuição da concentração de ácido cítrico no final do processo pode ser atribuído ao fato do ácido cítrico ter sido convertido em ácido isocítrico. Para os 2 ensaios que proporcionaram uma concentração maior de ácido cítrico a $R_{AC/ISC}$ diminuiu no final do cultivo. As curvas de crescimento celular foram bem similares para os dois ensaios. O valor de pH para o ensaio 5 reduziu de 6,89 para 3,9 e sofrendo um pequeno aumento no final do processo para 4,13 e para o ensaio 6 variou de 6,98 para 4,02 sofrendo uma pequena elevação para 4,44. Este comportamento de aumento do pH do meio pode ser atribuído ao consumo do ácido cítrico no final do processo. A razão molar entre C/N dos ensaios 5 e 6 foi 1217 e 2028 respectivamente, que se diferenciam entre si somente pela concentração de glicerol. Porém, a maior concentração foi obtida pelo ensaio 5, cuja razão molar entre C/N é menor comparada ao ensaio 6. Portanto, através destes resultados apresentados é possível afirmar que existe uma razão molar ótima entre carbono e nitrogênio para otimizar a produção de ácido cítrico por *Y. lipolytica*.

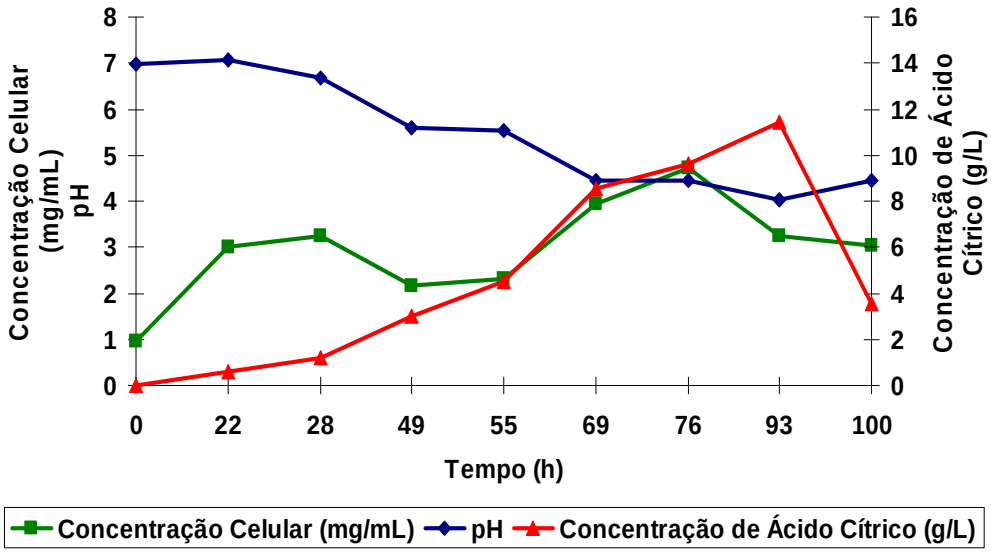

Figura 4.43 - Cinética de crescimento celular, pH e concentração de ácido cítrico no cultivo de *Yarrowia lipolytica* do ensaio 6 do 3º planejamento.

Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão dos modelos de 1ª ordem para a concentração e produtividade de ácido cítrico em função das variáveis codificadas e verificar a sua validade através da análise de variância (Tabela 4.9). Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados aos resíduos.

Tabela 4.9. ANOVA para concentração e produtividade de ácido cítrico.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados		Grau de Liberdade		Quadrado Médio		F_{calc}	
	Ácido Cítrico (g/L)	Prod. (g/L/h)	Ácido Cítrico (g/L)	Prod. (g/L/h)	Ácido Cítrico (g/L)	Prod. (g/L/h)	Ácido Cítrico (g/L)	Prod. (g/L/h)
Regressão	186,7238	0,020795	3	3	62,24	$6,93 * 10^{-3}$	67,51	58,24
Resíduo	5,5311	0,000716	6	6	0,9219	$1,19 * 10^{-4}$		
Total	192,255	0,021511	9	9				

Ácido Cítrico (g/L): $F_{3;\,6;\,0,05} = 4,76$; Coeficiente de correlação: $R^2 = 97,12\%$;
Produtividade (g/L*h): $F_{3;\,6;\,0,05} = 4,76$; Coeficiente de correlação: $R^2 = 96,67\%$

Pelos resultados mostrados na Tabela 4.9, observa-se que o valor do teste F calculado para a concentração de ácido cítrico foi cerca de 14 vezes maior do que o valor tabelado e para a produtividade 12 vezes maior. O coeficiente de correlação para a concentração de ácido cítrico foi igual a 97,12% e 96,67% para a produtividade, indicando que os modelos de 1ª ordem obtidos são estatisticamente significativos e preditivos para as variáveis estudadas. Dessa forma, a concentração e produtividade de

ácido cítrico podem ser preditas em função da concentração de extrato de lêvedo e agitação através das equações 4.2 e 4.3 respectivamente.

$$\text{Ácido Cítrico (g/L)} = 5{,}38 - 1{,}62\ X_2 + 4{,}40\ X_3 - 1{,}18\ X_2X_3 \qquad (4.2)$$
$$\text{Produtividade (g/L*h)} = 0{,}057 - 0{,}018\ X_2 + 0{,}046\ X_3 - 0{,}012\ X_2X_3 \qquad (4.3)$$

sendo:

X_2 : Concentração de extrato de lêvedo (g/L)

X_3: Agitação (rpm)

Portanto, os modelos foram considerados adequados para descrever as superfícies de resposta para analisar as melhores condições da concentração de glicerol PA, concentração de extrato de levedura e agitação que levam aos maiores valores de produção do ácido cítrico. As superfícies de resposta estão apresentadas nas Figuras 4.44 a 4.46 para a variável resposta concentração de ácido cítrico.

Observa-se na superfície de resposta (Figura 4.44) que a concentração de ácido cítrico é mais expressiva na condição mínima tanto para a variável concentração de extrato de lêvedo quanto para a variável concentração de glicerol PA e que se a concentração de extrato de lêvedo for alta (nível +1) a produção de ácido cítrico permanece ao redor de 4 g/L para toda a faixa de concentração de glicerol PA. Observa-se que a produção de ácido cítrico foi maior sob limitação de crescimento celular pela baixa concentração de nitrogênio (alta razão molar C/N).

Vários trabalhos na literatura reportam o efeito da alta razão molar C/N na produção de ácido cítrico por microrganismos. Em 2007, LEVINSON *et al.* produziram ácido cítrico utilizando glicerol puro como fonte de carbono. As culturas foram crescidas em condições limitantes de nitrogênio. O meio de crescimento para a cepa *Y. lipolytica* NRRL YB-423 foi otimizado variando a razão carbono e nitrogênio com o objetivo de aumentar a proporção de ácido cítrico e ácido isocítrico e foi concluído que o melhor resultado foi obtido na razão C/N de 343-686. RYMOWICZ *et al*. (2008) também constatou uma maior produção de ácido cítrico sob limitação de crescimento por nitrogênio ou outros componentes minerais como enxofre, fósforo e magnésio. PAPANIKOLAOU *et al*. (2002) estudaram altas razões molares de C/N e o resultado foi satisfatório uma vez que a concentração de ácido cítrico aumentou para 33 e 35 g/L com rendimento de 0,44 e 0,42 g/g de glicerol bruto consumido. Estes autores mostraram que alta razão molar C/N aumenta a produção de ácido cítrico, corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

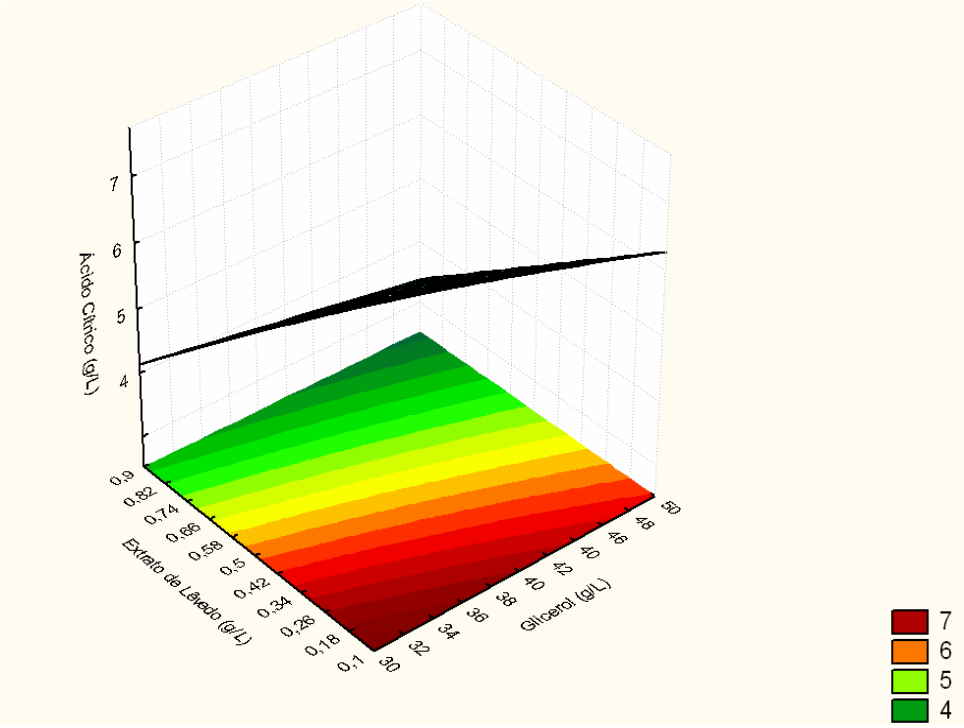

Figura 4.44 - Superfície de resposta da concentração de ácido cítrico em relação às concentrações de extrato de levedura e de glicerol PA

A Figura 4.45 mostra o perfil da variação da concentração de ácido cítrico em função das variáveis agitação e concentração de glicerol PA. Observa-se que a variável glicerol PA na faixa estudada não influencia a produção de ácido cítrico, sendo esta maior para valores mais elevados de agitação.

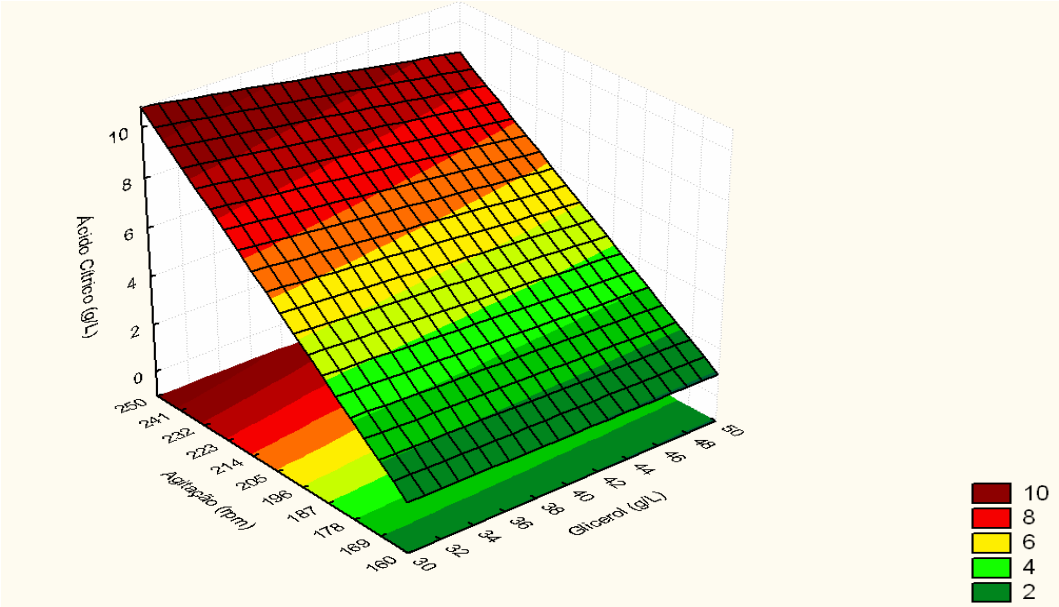

Figura 4.45 - Superfície de resposta da concentração de ácido cítrico em relação à agitação e a concentração de glicerol PA

A Figura 4.46 mostra o perfil da variação da concentração de ácido cítrico em relação às duas variáveis que possuem maior efeito no processo, a concentração de extrato de levedura e agitação. Esta Figura mostra que o aumento da agitação e a diminuição do extrato de levedura conduzem a maiores valores finais para ácido cítrico e que a agitação é o fator mais representativo do processo, ou seja, fixando a agitação no nível mais baixo e variando a concentração de extrato de lêvedo não haverá aumento significativo na produção. Já aumentando a agitação, independente da concentração de extrato de levedura, a produção de ácido cítrico vai aumentar, sendo mais expressiva na condição máxima (+1) da agitação e na condição mínima da concentração de extrato de lêvedo.

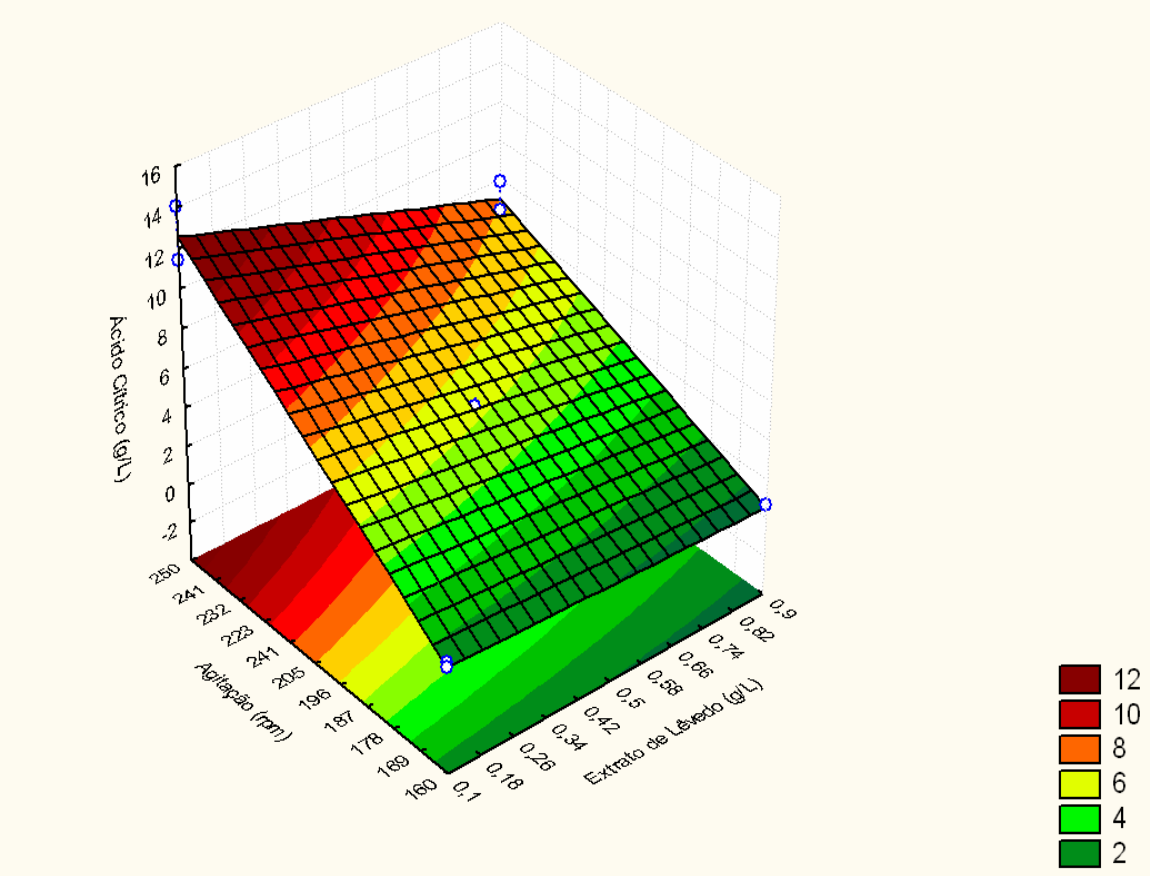

Figura 4.46 - Superfície de resposta da concentração de ácido cítrico em relação à agitação e a concentração de extrato de lêvedo

A Tabela 4.10 apresenta os valores experimentais da concentração de ácido cítrico e os valores previstos pelo modelo codificado, que foi validado pela ANOVA, bem como os desvios e desvios relativos de cada ensaio, quantificando a porcentagem do valor experimental menos o previsto pelo modelo em relação ao experimental.

Tabela 4.10 – Valores experimentais e previstos pelo modelo da concentração de ácido cítrico e desvios para o planejamento 2^3.

Ensaio	Ácido Cítrico (g/L)	Valor Previsto (g/L)	Desvio (Y-^Y)	Desvio Relativo (%)
1	1,67	1,42	0,25	15,00
2	1,46	1,42	0,04	2,93
3	0,69	0,54	0,15	21,69
4	0,68	0,54	0,14	21,11
5	14,04	12,58	1,46	10,37
6	11,40	12,58	-1,18	-10,33
7	7,89	6,98	0,91	11,48
8	6,35	6,98	-0,63	-9,88
9	4,69	5,38	-0,69	-14,81
10	4,91	5,38	-0,47	-9,64

Mesmo a análise estatística tendo sido realizada a $p<0,05$ e a ANOVA sendo válida, têm-se desvios de até 22%, com maiores desvios na menor concentração de ácido cítrico que foi obtida nos ensaios 3 e 4, onde se tem a menor agitação e menor razão molar C/N. Isto normalmente ocorre considerando processos que envolvem microrganismos, mas na região de interesse os desvios relativos são baixos (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

As Figuras 4.47 e 4.48 apresentam os valores observados experimentalmente versus os valores previstos pelo modelo para as respostas concentração e produtividade de ácido cítrico respectivamente.

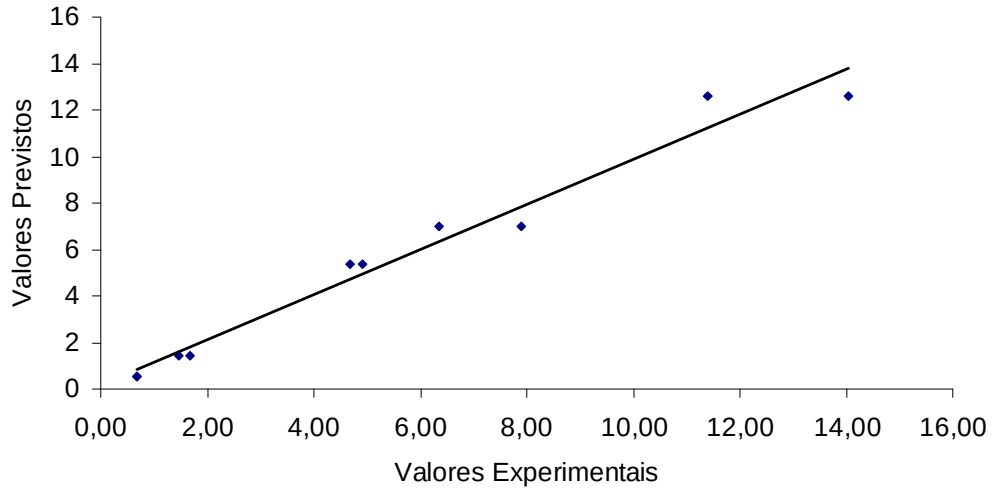

Figura 4.47 – Valores Experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta concentração de ácido cítrico

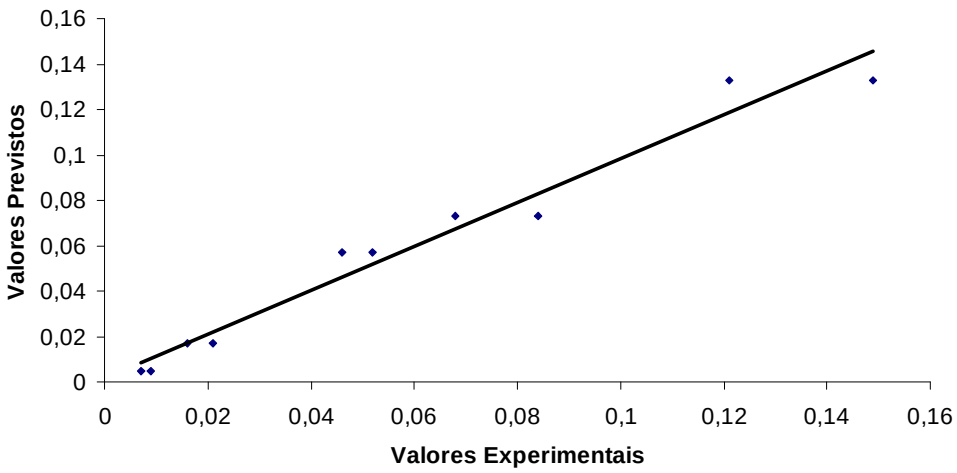

Figura 4.48 – Valores Experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta produtividade de ácido cítrico

Como as superfícies não apresentaram um máximo absoluto, um estudo mais detalhado da influência do efeito da concentração de extrato de levedura e do efeito da agitação foi realizado através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2.

4.5. Quarto Planejamento Experimental: Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2

Um planejamento experimental completo DCCR 2^2 foi realizado para analisar a interação entre a agitação e a concentração de extrato de levedura. A concentração de glicerol PA utilizada em todos os ensaios foi 30 g/L uma vez que no 3º planejamento não foi estatisticamente significativa tendo sido fixada na condição inferior.

As faixas estudadas da concentração de extrato de levedura e agitação são apresentadas na Tabela 4.11. Os níveis foram escolhidos de acordo com os resultados do 3º planejamento fatorial completo 2^3, descrito no item 4.4. Os valores do ponto central (0,1 g/L de extrato de levedura e 250 rpm) foram escolhidos de acordo com o experimento n° 5 do planejamento fatorial 2^3, onde se observou uma produção de 14,04 g/L em 93 h de processo.

Tabela 4.11. Faixa de valores estudados no DCCR 2^2

Variáveis Independentes	Nível (g/L)				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
Extrato de levedura	0,0295	0,0500	0,1000	0,1500	0,1705
Agitação	193,6	210,0	250,0	290,0	306,4

Os resultados do planejamento experimental estão apresentados na Tabela 4.12. O maior valor da concentração de ácido cítrico foi encontrado nas condições do ensaio 8. O resultado obtido foi de 16,49 g/L após 94 h de fermentação, sendo 28 vezes maior do que àquele inicialmente obtido no 1º planejamento para processo de produção de ácido cítrico que apresentou valor de 0,59 g/L. A concentração de ácido isocítrico para este ensaio foi de 1,37 g/L nesta mesma etapa do processo. Logo, a razão ácido cítrico: isocítrico ($R_{AC/ISC}$) foi de 12:1 conforme Tabela 4.13. A razão molar C/N para este ensaio foi 714 e o $Y_{cit/glic}$ foi de 0,55. Para o ponto central, onde se estuda a reprodutibilidade dos experimentos o $Y_{cit/glic}$ foi de 0,32 e 0,35.

Tabela 4.12. Matriz do planejamento experimental DCCR 2^2, com os valores codificados e reais e os resultados experimentais.

	Extrato de lêvedo		Agitação		Ácido Cítrico	Razão Molar	$Y_{Cit / Glic}$ inicial
Ensaios	Código	Valores Reais	Código	Valores Reais	(g/L)	C/N	
1	-1	0,0500	-1	210,0	12,29 (88 h)	2434	0,41
2	1	0,1500	-1	210,0	11,95 (88 h)	811	0,40
3	-1	0,0500	1	290,0	9,43 (88 h)	2434	0,31
4	1	0,1500	1	290,0	12,10 (93 h)	811	0,40
5	0	0,1000	0	250,0	9,51 (93 h)	1217	0,32
6	0	0,1000	0	250,0	10,38 (93 h)	1217	0,35
7	-1,41	0,0295	0	250,0	12,84 (94 h)	4125	0,43
8	+1,41	0,1705	0	250,0	16,49 (94 h)	714	0,55
9	0	0,1000	-1,41	193,6	10,67 (94 h)	1217	0,36
10	0	0,1000	1,41	306,4	13,91 (99 h)	1217	0,46

A máxima produção de ácido cítrico para o ensaio 1 foi de 12,29 g/L em 88 h. Neste momento foi produzido 0,87 g/L de ácido isocítrico estabelecendo uma $R_{AC/ISC}$ de 14,13:1. No final do processo a concentração de ácido cítrico diminuiu para 8,1 g/L e aumentou a concentração de ácido isocítrico para 1,11 g/L, com $R_{AC/ISC}$ de 7,30:1. O ensaio 2 teve a produção máxima de ácido cítrico de 11,95 g/L em 88 h e neste momento a concentração de ácido isocítrico foi de 0,88 g/L, com $R_{AC/ISC}$ de 13,58:1 Posteriormente, a produção de ácido cítrico reduziu para 6,05 g/L e aumentou-se a concentração de ácido isocítrico para 1,03 g/L com $R_{AC/ISC}$ de 5,87:1. O mesmo comportamento de redução da concentração de ácido cítrico e aumento de ácido isocítrico, observado anteriormente, foi observado nos ensaios 1 e 2, o que reforça a teoria do consumo de um dos ácidos para produção do outro ou para crescimento celular. Observando a curva de crescimento de *Y. lipolitica* em meio de cultivo contendo glicerol PA (Figura 4.49) é possível perceber que após a fase estacionária (70 h) reinicia-se uma fase exponencial de crescimento e um ligeiro aumento da concentração de ácido isocítrico. PAPANIKOLAOU *et al.* (2002) observaram que após

a exaustão total do glicerol bruto do meio de cultivo, houve algum consumo do citrato acumulado e no experimento realizado com glicose como substrato também houve consumo do ácido cítrico produzido após ter sido totalmente consumida por *Y. lipolitica*. O perfil de pH foi semelhante para os ensaios 1 e 2 reduzindo de 7,04 para 4,70 e de 7,11 para 4,63 respectivamente.

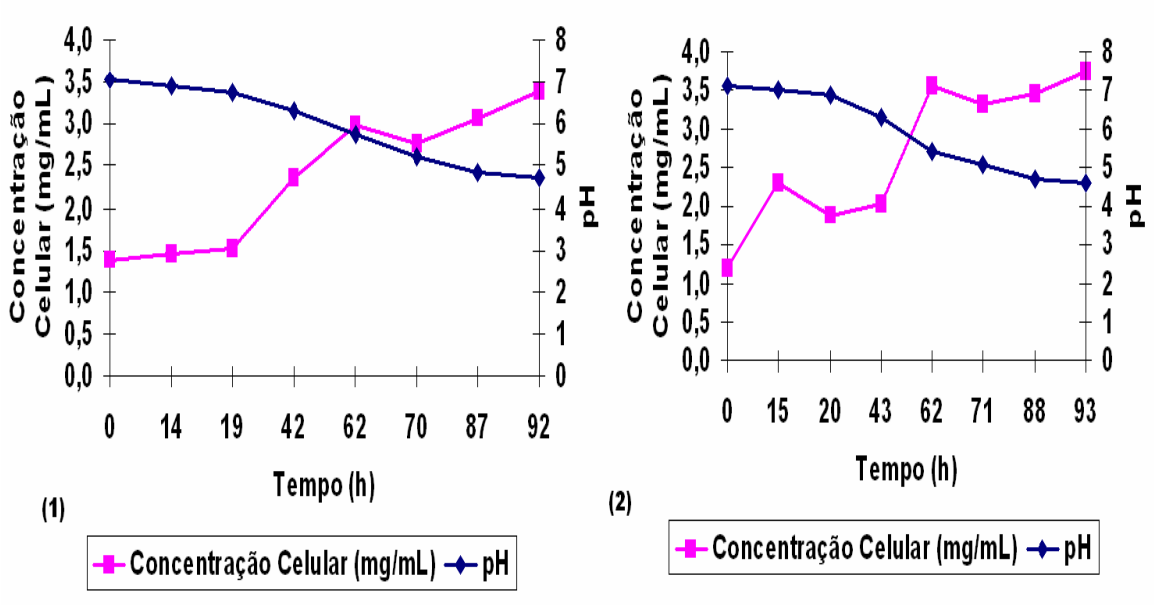

Figura 4.49 - Cinética de crescimento celular e pH do meio de cultivo de *Yarrowia lipolytica* dos ensaios 1 e 2 do 4º planejamento experimental.

A Tabela 4.13 evidencia os resultados de concentração de ácido cítrico e isocítrico bem como a razão entre estes dois ácidos ($R_{AC/ISC}$) para os ensaios 3 ao 10 do 4º planejamento. Para o ensaio 8 também ocorreu redução da concentração de ácido cítrico de 16,49 g/L para 14,29 g/L no tempo de 100 h de processo.

Tabela 4.13. Razão Ácido Cítrico: Isocítrico para os ensaios 3 – 10 do 4º planejamento

Ensaio	Ácido Cítrico (g/L)	Ácido Isocítrico (g/L)	Razão Ac. Cítrico/Isocítrico
3	9,43	0,88	10,7:1
4	12,10	1,03	11,7:1
5	9,51	1,03	9,2:1
6	10,38	1,14	9,1:1
7	12,84	1,10	11,7:1
8	16,49	1,37	12,0:1
9	10,65	1,20	8,9:1
10	13,91	1,36	10,2:1

O diagrama de Pareto (Figura 4.50) mostra que os fatores concentração de extrato de levedura e agitação correspondentes ao efeito linear e a interação extrato de levedura/agitação não foram estatisticamente significativos nas faixas estudadas. Os

fatores correspondentes aos efeitos quadráticos da agitação e extrato de levedura também não influenciaram a resposta ácido cítrico.

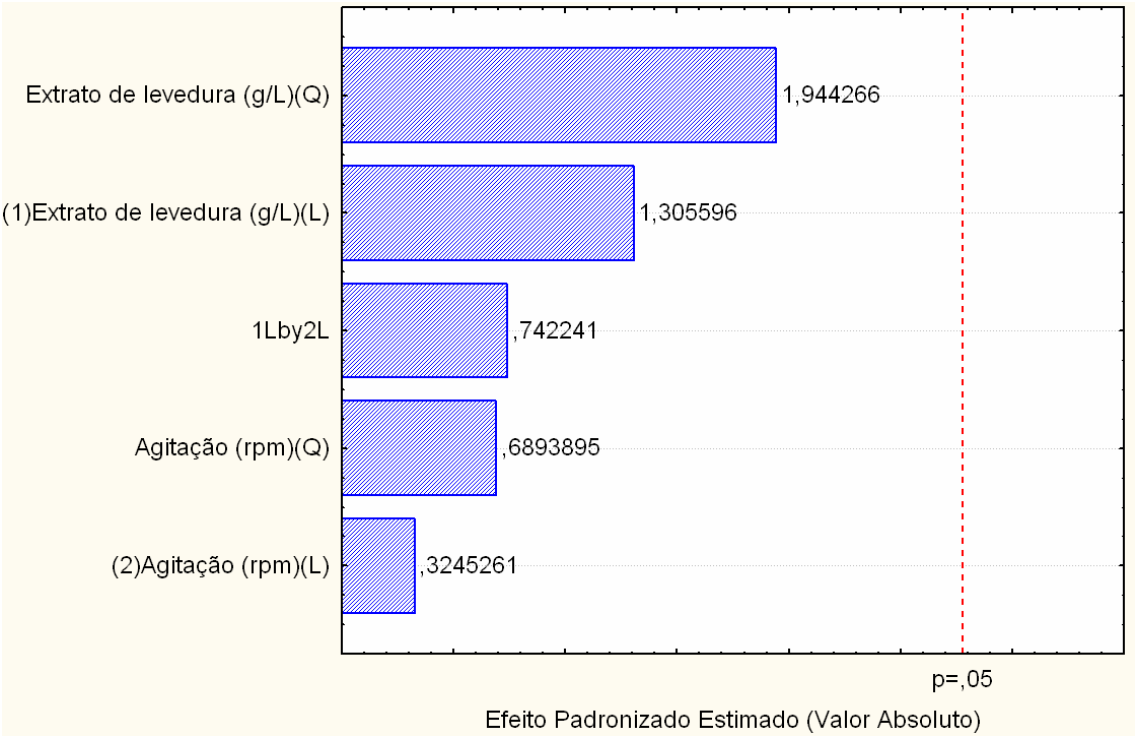

Figura 4.50 – Diagrama de Pareto para a concentração de ácido cítrico do 4º planejamento

Como todos os efeitos, com exceção da média, foram considerados não significativos estatisticamente e o valor do coeficiente de correlação foi baixo (60%) não foi possível gerar modelo e realizar a análise estatística. Logo, indicando que as faixas ótimas de trabalho foram encontradas.

4.6. Experimento com glicerol da produção de biodiesel na condição ótima

Foi feito um teste nas mesmas condições do ensaio 8 do quarto planejamento, substituindo o glicerol PA por glicerol da produção de biodiesel. As condições experimentais deste ensaio foram escolhidas já que foi o ensaio que gerou a maior concentração de ácido cítrico. A concentração de ácido cítrico obtida foi de 6,75 g/L e a concentração de ácido isocítrico foi de 1,58 g/L em 94 h de processo. A $R_{AC/ISC}$ foi de 4,27:1. O $Y_{cit/glic}$ neste caso foi de 0,23.

Com intuito de avaliar o crescimento de *Y. lipolytica* durante o cultivo nas condições do ensaio 8 para glicerol PA e glicerol proveniente da produção de biodiesel a Figura 4.51 apresenta os perfis cinéticos. O crescimento celular foi menor para glicerol PA do que para glicerol bruto. Provavelmente, o crescimento com glicerol bruto

foi maior, devido à capacidade de consumir óleos comestíveis e substratos hidrofóbicos da espécie *Y. lipolytica* (BARTH AND GAILLARDIN, 1997). Como o glicerol bruto utilizado como matéria-prima para a produção de ácido cítrico foi proveniente da reação de transesterificação de óleo de soja é possível que ainda houvesse traços deste componente no glicerol. O crescimento celular mais elevado para glicerol bruto pode ter desfavorecido a produção de ácido cítrico já que a produção deste ácido é maior em condições limitantes do crescimento celular. PAPANIKOLAOU *et al*. (2002), RYMOWICZ *et al*., (2006) e FICKERS *et al*., (2005) citam que o processo de produção de ácido cítrico é favorecido em condições limitantes de crescimento celular causadas por diferentes fatores de nutrição. Para haver produção de ácidos orgânicos, principalmente o cítrico, o ciclo de Krebs deve ser interrompido, o que desfavorece o crescimento celular.

O valor de pH foi similar para os dois casos reduzindo de 7,06 a 4,06 e 7,24 a 4,42 para glicerol PA e glicerol da produção de biodiesel, respectivamente.

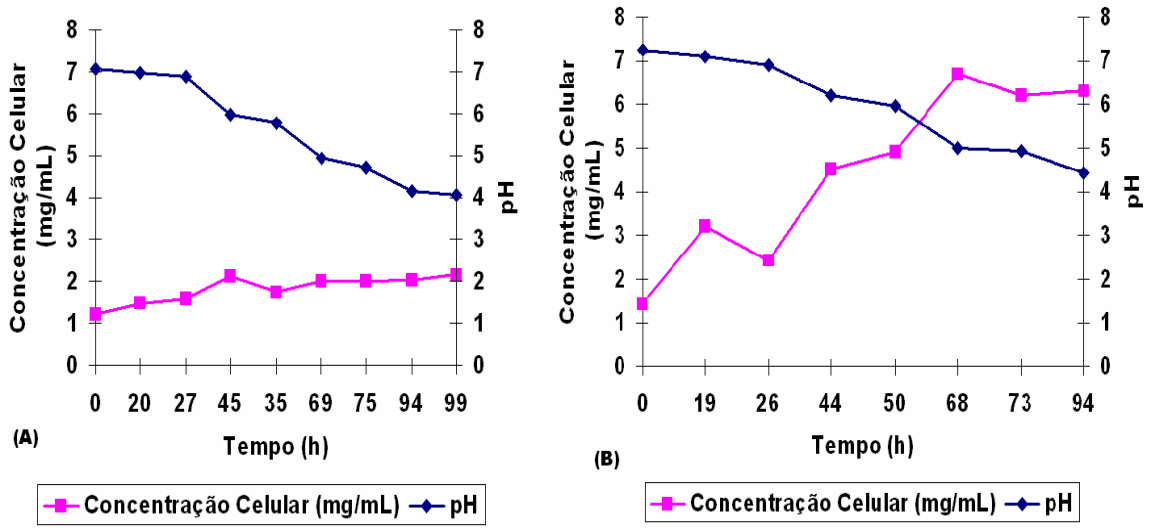

Figura 4.51 - Perfis de crescimento e pH do meio de cultivo de *Y. lipolytica* nas condições ótimas obtidas pelo planejamento DCCR 2^2 utilizando glicerol PA (A) e glicerol da produção de biodiesel (B).

4.7. Influência da adição de acetato de sódio ao meio otimizado

Conforme já foi mencionado na revisão bibliográfica, VENTER *et al*., (2004) aumentaram a razão de ácido cítrico:ácido isocítrico significativamente através da adição de acetato de sódio no meio de cultivo. VENTER *et al*. (2004) alcançaram uma produção de 0,5 g/L de ácido cítrico com uma razão de 1,7:1 de ácido cítrico: ácido isocítrico após 120 h de cultivo de *Y. lipolytica* UOFS Y-1701 para o experimento controle (apenas óleo de girassol). Quando cultivou um meio contendo ambos óleo de

girassol e acetato de sódio a produção de ácido cítrico alcançou o valor de 18,7 g/L após 120 h e uma razão de ácido cítrico:isocítrico de 3,7:1.

Portanto, testes foram realizados com adição de acetato em meios cuja composição segue a condição otimizada após o quarto planejamento. Estes testes foram feitos com glicerol PA e glicerol bruto com diferentes proporções. Os resultados são apresentados na Tabela 4.14. É possível perceber que para glicerol PA (ensaios 1 e 2 da Tabela 4.14) não houve aumento de produção de ácido cítrico com adição de acetato de sódio e para adição da maior quantidade de acetato (ensaio 2) a concentração de ácido cítrico foi ainda menor. Para o ensaio 1 e 2, a concentração de ácido isocítrico foi de 2,30 g/L e 2,54 g/L respectivamente, após 94 horas de processo, quando a produção de ácido cítrico foi máxima (Tabela 4.15). Observa-se que a adição de acetato além de ter diminuído a concentração máxima de ácido cítrico favoreceu o aumento da concentração do ácido isocítrico reduzindo $R_{AC/ISC}$ e o $Y_{cit/glic}$ para os ensaios com glicerol PA.

Quando foi utilizado glicerol bruto, a adição de acetato de sódio (ensaios 3 e 4 da Tabela 4.14) promoveu um aumento de 34% e 6% de produção de ácido cítrico quando 5,06 e 10 g/L de acetato foram adicionados, respectivamente. Como conseqüência houve um aumento no $Y_{cit/glic}$ de 30,43% e 4,35% quando 5,06 e 10 g/L de acetato foram adicionados, respectivamente. Como o glicerol bruto utilizado não apresentava grau de pureza de 100%,a adição de acetato promoveu uma produção maior de ácido cítrico em comparação com o ensaio sem adição de acetato, ou seja, falta carbono para a produção. Foi observado que quando uma maior concentração de acetato foi utilizada (ensaio 4 da Tabela 4.14) houve redução da produção de ácido cítrico. Apesar do pequeno aumento da concentração de ácido cítrico para os ensaios realizados com glicerol da produção de biodiesel, a concentração de ácido isocítrico também foi favorecida com a adição de acetato de sódio conforme se pode observar na Tabela 4.15, reduzindo a $R_{AC/ISC}$ de 13,58% e 33,72% para os ensaios 3 e 4. O mesmo comportamento foi observado quando se trabalhou com glicerol PA como fonte de carbono. Portanto, a adição de acetato de sódio ao meio de cultivo favorece a produção do ácido isocítrico por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Comparando o presente estudo sem adição de acetato de sódio com o estudo incial de VENTER *et al.* (2004), que produziu 0,5 g/L de ácido cítrico, a produção de ácido cítrico foi 13,5 vezes maior do que a produção obtida por estes.

É importante observar que a matéria-prima utilizada no presente trabalho foi glicerol da produção de biodiesel, um sub-produto da reação de transesterificação para a produção do biodiesel que é o produto de interesse desta reação. Portanto, o glicerol proveniente da produção do biodiesel é de custo mais baixo, a sua utilização diminui a

geração de poluentes e excedentes na produção de biodiesel e a produção de ácido cítrico a partir desta matéria-prima agrega valor a um resíduo e sem o custo adicional da inclusão do acetato de sódio ao meio de cultivo.

Tabela 4.14 – Produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* com adição de acetato de sódio em meios constituídos por glicerol P.A e glicerol da produção de biodiesel.

Ensaio	Tipo de glicerol e quantidade (g/L)	Extrato de Lêvedo (g/L)	Acetato (g/L)	Agitação (rpm)	Ácido Cítrico (g/L)	$Y_{cit/glic}$
1	P.A 30	0,1705	5,06	250	10,10 (94 h)	0,34
2	P.A 30	0,1705	10,00	250	5,90 (94 h)	0,20
3	Bruto 30	0,1705	5,06	250	9,05 (94 h)	0,30
4	Bruto 30	0,1705	10,00	250	7,14 (94 h)	0,24

Tabela 4.15 – Comparação entres os ensaios realizados na condição otimizada sem e com adição de acetato de sódio ao meio de cultivo com glicerol PA e glicerol da produção de biodiesel.

Tipo e concentração de glicerol (g/L)	Tempo de Processo (h)	Acetato de Sódio (g/L)	Ácido Cítrico (g/L)	Ácido Isocítrico (g/L)	$R_{AC/ISC}$
P.A 30	94	-	16,49	1,37	12,00:1
P.A 30	94	5,06	10,10	2,30	4,39:1
P.A 30	94	10,00	5,90	2,54	2,32:1
Bruto 30	94	-	6,75	1,58	4,27:1
Bruto 30	94	5,06	9,05	2,45	3,69:1
Bruto 30	94	10,00	7,14	2,52	2,83:1

Analisando a cinética de crescimento de *Y. lipolytica* na Figura 4.52, verifica-se que o crescimento celular da levedura para os ensaios 1 e 2 foi maior do que para o ensaio 8 (condição ótima) sem adição de acetato. O comportamento do crescimento celular foi similar para estes dois casos. A adição de mais uma fonte de carbono pode ter favorecido o crescimento da levedura, desviando a rota metabólica.

Para o ensaio 8, o pH teve uma queda de 7,06 a 4,06 (Figura 4.51 A), para o ensaio 1 variou de 7,26 para 5,82 e para o ensaio 2 permaneceu praticamente o mesmo do início ao fim (Figura 4.52). O pH do meio também pode ser um fator para explicar a menor produção de ácido cítrico nos ensaios 1 e 2. É possível notar que a queda de pH foi maior para o ensaio 8, que teve maior produção de ácido cítrico em comparação com os ensaios 1 e 2. O 2º ensaio dentre estes 3 que obteve a maior produção do ácido teve a segunda maior queda de pH (ensaio 1) e por último, o ensaio 2 que gerou uma quantidade de ácido cítrico menor manteve o valor de pH praticamente igual do início

até o final. É possível que o acetato de sódio tenha gerado uma condição de neutralidade do início ao fim do experimento por ter sido colocado em excesso neste ensaio. VENTER *et al*. (2004) reportaram que a adição de acetato ao meio que continha óleo de girassol aumentou significativamente a produção do ácido γ-linolênico por *Mucor* e a explicação para este ocorrido seria a larga diferença no pH, isto é, 2,2 e 8,0 quando cultivada na ausência e na presença do acetato, respectivamente.

A partir da Figura 4.52, foi possível observar que o perfil de crescimento celular foi similar para os ensaios realizados com glicerol do biodiesel sem e com adição de acetato. Para o ensaio com glicerol bruto sem acetato o pH reduziu de 7,24 a 4,42, para o ensaio 3 com adição de acetato o pH reduziu de 7,21 a 6 e para o ensaio 4, de 7,21 para 6,92. Neste caso, praticamente constante até o fim do cultivo.

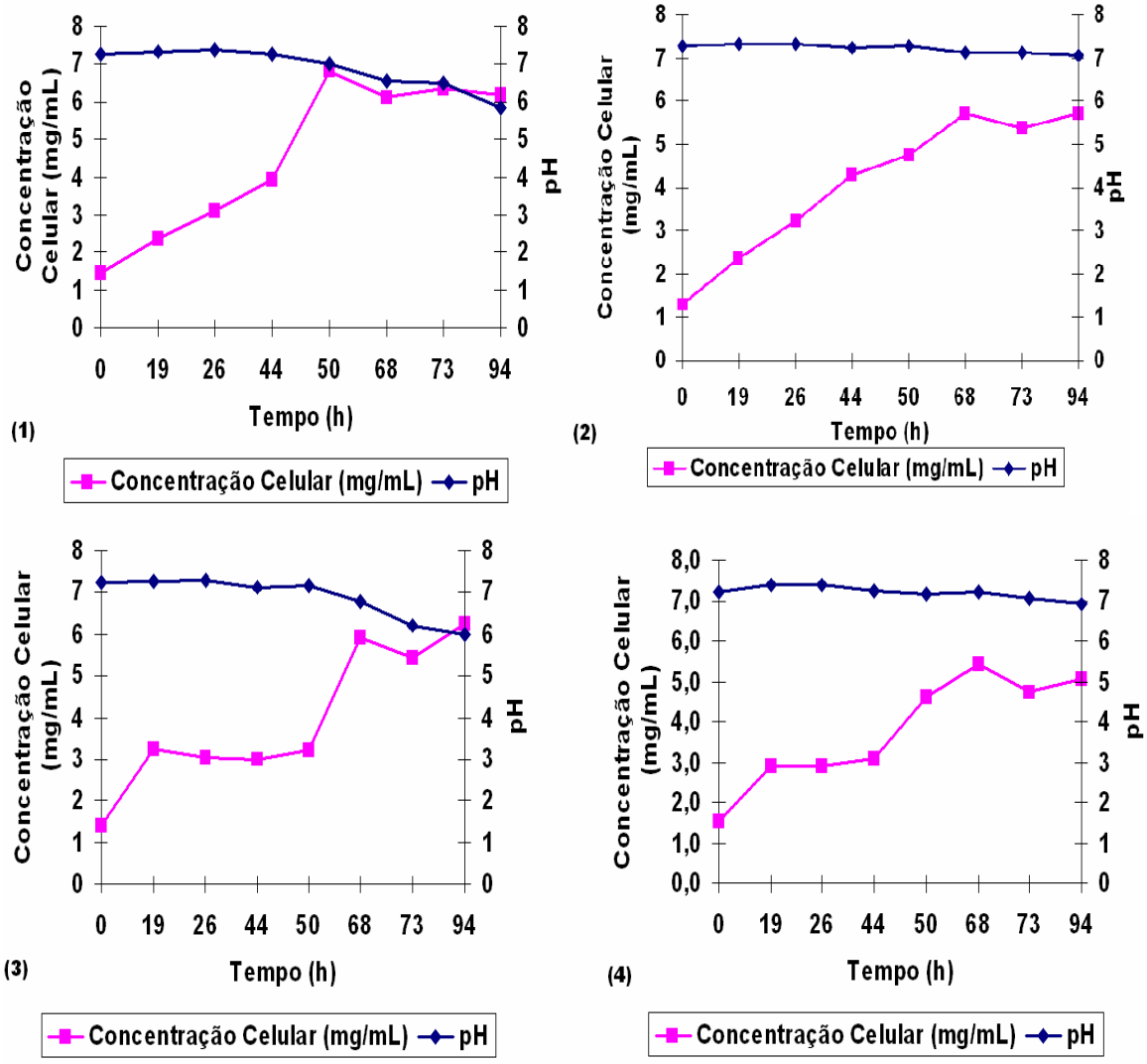

Figura 4.52 - Perfis de crescimento e pH do meio de cultivo de *Y. lipolytica* nas condições ótimas obtidas pelo planejamento DCCR 2^2 utilizando glicerol PA com adição de acetato de sódio: Ensaio (1) 1:3 C/C , ensaio (2) 1:3 M/M e utilizando glicerol proveniente do biodiesel com adição de acetato de sódio: Ensaio (3) 1:3 C/C e ensaio (4) 1:3 M/M. C/C: razão entre a massa de carbono do acetato de sódio e a massa de carbono do glicerol; M/M: razão entre a massa de acetato de sódio e a massa de glicerol

4.8. Análise comparativa dos resultados obtidos nas diferentes etapas do processo de otimização

As Tabelas 4.16 e 4.17 apresentam um resumo dos resultados obtidos com maior produção de ácido cítrico nas diferentes etapas de otimização do processo de produção por *Yarrowia lipolytica*. Observa-se, na Tabela 4.16, que estudando os parâmetros de concentração de glicerol, concentração de extrato de lêvedo e velocidade de agitação houve um aumento da concentração de ácido cítrico de 28 vezes utilizando como fonte de carbono glicerol PA quando comparado com o estudo inicial. O meio de crescimento para a cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 foi otimizado variando a razão carbono e nitrogênio com o objetivo de aumentar a razão entre ácido cítrico e ácido isocítrico ($R_{AC/ISC}$), obtendo-se melhor resultado com a razão C/N de 714. A maior produção de ácido cítrico para glicerol PA (16,49 g/L) foi obtida em meio contendo 30 g/L de glicerol, 0,1705 g/L de extrato de lêvedo, a 250 rpm de agitação e em meio mineral tamponado.

A glicerina bruta apresentou potencial de aplicação como matéria – prima para a produção de ácido cítrico. A produção máxima de ácido cítrico utilizando glicerol proveniente do biodiesel foi 6,75 g/L na condição otimizada e sem adição de acetato de sódio. A adição de acetato de sódio proporcionou um ligeiro aumento para 9,05 g/L de ácido cítrico conforme é mostrado na Tabela 4.17.

Tabela 4.16. Evolução dos resultados da concentração de ácido cítrico produzido a partir de cultivo de *Y. lipolytica*, nas diferentes etapas do processo de otimização utilizando glicerol PA.

Condição Experimental	Ácido Cítrico (g/L)	Ácido Isocítrico (g/L)	Razão molar C/N	$Y_{cit/glic}$ (g/g)	$R_{AC/ISC}$
1º planejamento / Não tamponado [a]	0,59 (81 h)	-	325	0,015	-
2º planejamento / Não tamponado [b]	2,51 (76 h)	0,98 (76 h)	6085	0,018	2,56:1
2º planejamento / Tamponado [c]	10,65 (98 h)	1,53 (98 h)	6085	0,071	6,96:1
3º planejamento / Tamponado [d]	14,04 (93 h)	1,89 (93 h)	1217	0,468	7,40:1
4º planejamento / Tamponado [e]	16,49 (94 h)	1,37 (94 h)	714	0,550	12,00:1
Condição Otimizada com 5,06 g/L de acetato de sódio [f]	10,10 (94 h)	2,30 (94 h)	714	0,340	4,39:1
Condição Otimizada com 10 g/L de acetato de sódio [g]	5,90 (94 h)	2,54 (94 h)	714	0,200	2,32:1

[a] Ensaio 1 do 1º planejamento em meio mineral não tamponado: glicerol: 40 g/L, extrato de lêvedo: 0,5 g/L, sulfato de amônio: 0 g/L e agitação: 160 rpm. [b] Ensaio 1 do 2º planejamento em meio mineral não tamponado: glicerol: 150 g/L, extrato de lêvedo: 0,1 g/L e agitação: 250 rpm. [c] Ensaio 1 do 2º planejamento em meio mineral tamponado: glicerol: 150 g/L, extrato de lêvedo: 0,1 g/L e agitação: 250 rpm. [d] Ensaio 5 do 3º planejamento em meio mineral tamponado: glicerol: 30 g/L, extrato de lêvedo: 0,1 g/L e agitação: 250 rpm. [e] Ensaio 8 do 4º planejamento em meio mineral tamponado: glicerol: 30 g/L, extrato de lêvedo: 0,1705 g/L e agitação: 250 rpm. [f] Ensaio 8 do 4º planejamento em meio mineral tamponado e com adição de 5,06 g/L de acetato de sódio: glicerol: 30 g/L, extrato de lêvedo: 0,1705 g/L e agitação: 250 rpm. [g] Ensaio 8 do 4º planejamento em meio mineral tamponado e com adição de 10 g/L de acetato de sódio: glicerol: 30 g/L, extrato de lêvedo: 0,1705 g/L e agitação: 250 rpm.

Tabela 4.17. Evolução dos resultados da concentração de ácido cítrico produzido a partir de cultivo de *Y. lipolytica,* nas diferentes etapas do processo de otimização utilizando glicerol proveniente da produção de biodiesel.

Condição Experimental	Ácido Cítrico (g/L)	Ácido Isocítrico (g/L)	Razão Molar C/N	$Y_{cit/glic}$ (g/g)	$R_{AC/ISC}$
2º planejamento / Não tamponado [a]	3,65 (98 h)	-	6085	0,024	-
2º planejamento / Tamponado [b]	4,18 (98 h)	-	6085	0,028	-
4º planejamento / Tamponado [c]	6,75 (94 h)	1,58 (94 h)	714	0,230	4,27:1
Condição Otimizada com 5,06 g/L de acetato de sódio [d]	9,05 (94 h)	2,45 (94 h)	714	0,300	3,69:1
Condição Otimizada com 10 g/L de acetato de sódio [e]	7,14 (94 h)	2,52 (94 h)	714	0,240	2,83:1

Condições experimentais: glicerol gerado na produção do biodiesel

[a] Condições do ensaio 1 do 2º planejamento em meio mineral não tamponado: glicerol: 150 g/L, extrato de lêvedo: 0,1 g/L e agitação: 250 rpm. [b] Condições do Ensaio 1 do 2º planejamento em meio mineral tamponado: glicerol: 150 g/L, extrato de lêvedo: 0,1 g/L e agitação: 250 rpm. . [c] Condições do ensaio 8 do 4º planejamento em meio mineral tamponado: glicerol: 30 g/L, extrato de lêvedo: 0,1705 g/L e agitação: 250 rpm. [d] Condições do ensaio 8 do 4º planejamento em meio mineral tamponado e com adição de 5,06 g/L de acetato de sódio: glicerol: 30 g/L, extrato de lêvedo: 0,1705 g/L e agitação: 250 rpm. [e] Condições do ensaio 8 do 4º planejamento em meio mineral tamponado e com adição de 10 g/L de acetato de sódio

As Figuras 4.53 e 4.54 apresentam os resultados da concentração de ácido cítrico obtidos durante processo de otimização para as diferentes condições estudadas para glicerol PA (Figura 4.53) e para glicerol da produção de biodiesel (Figura 4.54).

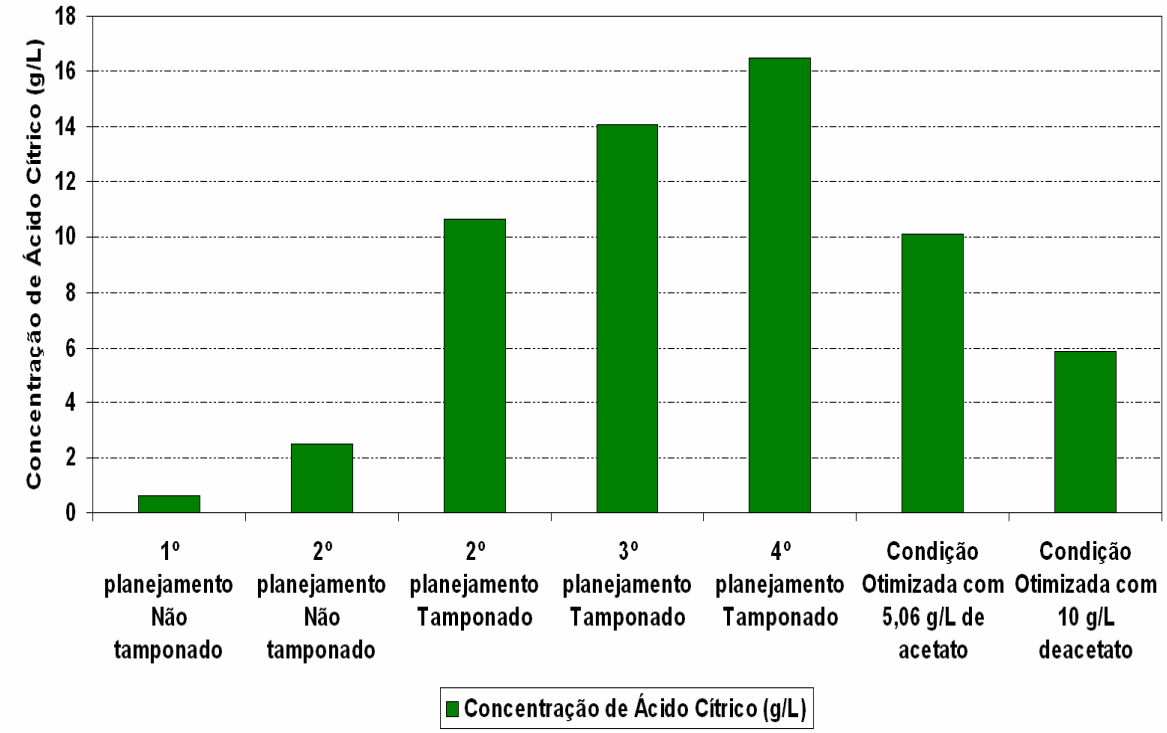

Figura 4.53. Evolução dos resultados da concentração de ácido cítrico produzido a partir de cultivo de *Y. lipolytica* nas diferentes etapas do processo de otimização em glicerol PA.

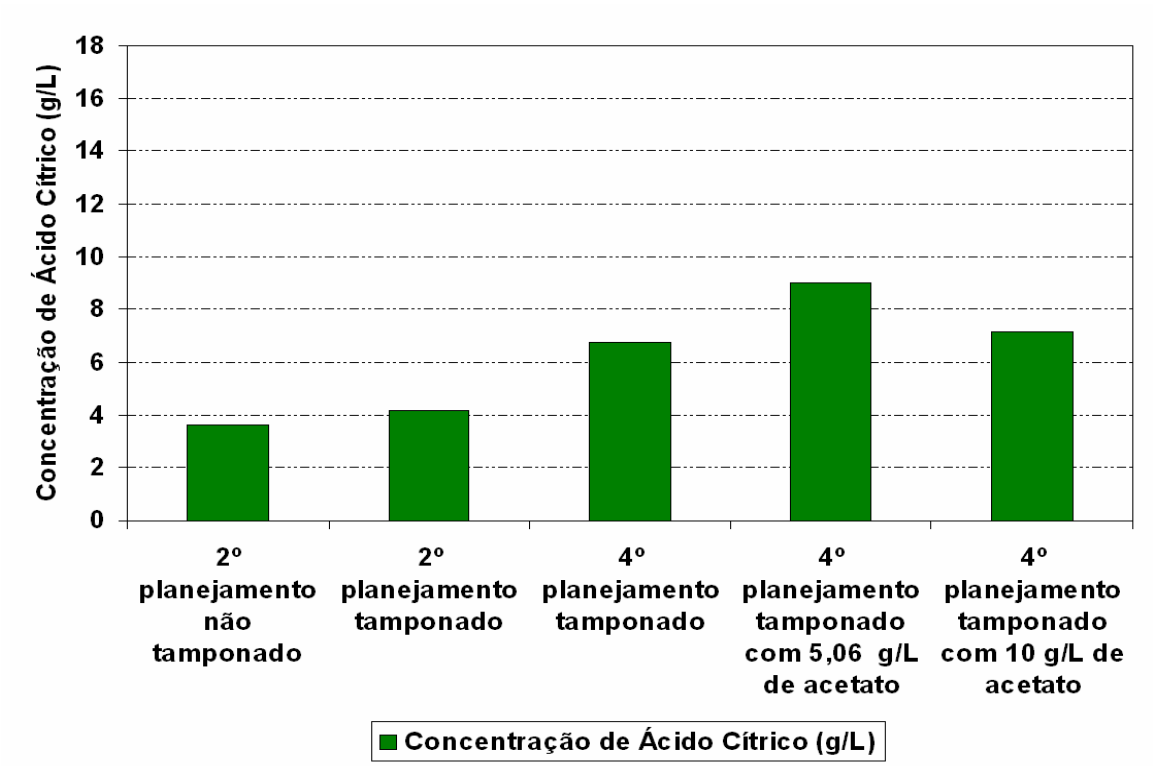

Figura 4.54. Evolução dos resultados da concentração de ácido cítrico produzido a partir de cultivo de *Y. lipolytica* nas diferentes etapas do processo de otimização em glicerol da produção de biodiesel.

4.9. Análise comparativa entre o resultado obtido no presente estudo e resultados registrados na literatura

Observando os resultados da Tabela 4.18, o presente estudo alcançou um rendimento em relação à concentração inicial do substrato glicerol PA de 55% em uma razão molar C/N de 714 em meio de cultivo de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, valor comparável ao reportado por *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 nos estudos iniciais realizados por PAPANIKOLAOU *et al.* (2002), que utilizaram glicerol bruto como substrato. A concentração de ácido cítrico obtido inicialmente por PAPANIKOLAOU *et al.* (2002) foi de 13,7 g/L em uma razão molar C/N de 147, que utilizaram extrato de levedura e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

O presente estudo gerou uma produção de 16,49 g/L de ácido cítrico com $Y_{Cit/Glic}$ igual a 0,55 e $R_{AC/ISC}$ de 12,0:1 após 94 h de processo, resultado similar ao encontrado por LEVINSON *et al.* (2007), que utilizou como fonte de carbono glicerol puro. Porém, utilizou uma razão molar C/N menor e igual a 343. Em seu estudo que utilizou a razão C/N igual a 686, a produção foi de 21,8 g/L de ácido cítrico (Tabela 4.18). O presente estudo utilizou uma concentração de glicerol PA menor que o utilizado por LEVINSON *et al.* (2007) e ambos tiveram um $Y_{Cit/Glic}$ similar e a única fonte de nitrogênio utilizada neste presente estudo foi extrato de lêvedo na concentração de 0,1705 g/L. Já LEVINSON *et al.* (2007) utilizaram como fonte de nitrogênio sulfato de amônio na

concentração de 0,25 g/L e extrato de lêvedo na concentração de 0,25 g/L, além de ter acrescentado no meio de cultivo tiamina hidroclorada. Quando foi utilizado glicerol bruto como substrato LEVINSON *et al.* (2007) alcançaram um $Y_{Cit/Glic}$ de 0,56 e neste presente trabalho o $Y_{Cit/Glic}$ foi de 0,23.

Tabela 4.18. Dados de estudos da produção de ácido cítrico produzidos por espécies de *Yarrowia lipolytica* registrados na literatura e no presente estudo

Tipo e Glicerol Inicial (g/L)	Fonte de N (g/L)	C/N molar	Ácido Cítrico (g/L)	$Y_{Cit / Glic}$	$R_{AC/ISC}$	Referência
Bruto 32	Sulfato de amônio (0,5) Extrato de Levedura (0,5)	98	11,9	0,37	-	PAPANIKOLAOU *et al.* 2002
Bruto 46	Sulfato de amônio (0,5) Extrato de Levedura (0,5)	147	13,7	0,30	-	PAPANIKOLAOU *et al.* 2002
Bruto 80	Sulfato de amônio (0,5) Extrato de Levedura (0,5)	261	33,6	0,42	-	PAPANIKOLAOU *et al.* 2002
Bruto 120	Sulfato de amônio (0,5) Extrato de Levedura (0,5)	388	35,1	0,29	-	PAPANIKOLAOU *et al.* 2002
Puro 40	Sulfato de amônio (0,25 g/L) Extrato de Levedura (0,25 g/L)	343	21,6	0,54	11,3:1	LEVINSON *et al.* 2007
Bruto	Não mostrado	Não mostrado	Não mostrado	0,56	Não mostrado	LEVINSON *et al.* 2007
Puro 30	Extrato de Levedura (0,1705)	714	16,49	0,55	12,0:1	Presente estudo
Bruto 30	Extrato de Levedura (0,1705)	714	6,75	0,23	4,27:1	Presente estudo

Verificando o custo das fontes de nitrogênio utilizadas, o resultado foi satisfatório, uma vez que para o presente trabalho somente foi utilizado como fonte de nitrogênio o reagente extrato de lêvedo e em uma concentração otimizada de apenas 0,1705 g/L, 5 vezes menor do que a concentração de extrato de lêvedo utilizada por PAPANIKOLAOU *et al.* (2002) e 1,47 vezes menor do que a concentração de extrato de lêvedo utilizada por LEVINSON *et al.* (2007), que também utilizaram sulfato de amônio para produção de ácido cítrico por *Y.lipolytica*. A Tabela 4.19 apresenta os custos das fontes de nitrogênio utilizadas neste estudo e no estudo realizado por LEVINSON *et al.* (2007) e PAPANIKOLAOU *et al.* (2002). Desta forma, os resultados do planejamento experimental possibilitaram a redução dos custos de produção.

Tabela 4.19. Custos das fontes de nitrogênio

Fonte de Nitrogênio	Preço (R$/Kg) [c]
Extrato de lêvedo [a]	940,00
Sulfato de amônio [b]	50,00

[a] Extrato de lêvedo - *Oxoid* (Hampshire, UK); [b] Sulfato de amônio - *Oxoid* (Hampshire, UK); [c] Preço em reais (R$) fornecido pela empresa *Termo-Rio Científica Ltda* (RJ, Brasil) no dia 21 de fevereiro 2008.

5. Conclusões e Sugestões

5.1. Conclusões

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682 produz ácido cítrico, na presença de glicerol PA e glicerol bruto como fonte de carbono.

Através deste estudo, foi observado que a relação carbono/nitrogênio é um parâmetro importante na produção do ácido cítrico por esta cepa e que para melhorar a produção de ácido cítrico o meio precisa estar em condições limitantes de nitrogênio.

O sulfato de amônio e extrato de lêvedo foram as variáveis estatisticamente significativas apresentando influência negativa sobre a produção de ácido cítrico. O glicerol PA e a agitação não foram estatisticamente significativos, dentro das faixas de concentração e velocidade estudadas. Desta forma, a combinação de 200g/L de glicerol PA, 0,5 g/L de extrato de lêvedo, 0 g/L de sulfato de amônio e velocidade de agitação de 250 rpm, com razão molar entre carbono/nitrogênio igual a 1623 e em meio mineral não tamponado, propiciou a maior produtividade inicialmente.

Em uma segunda etapa, foi possível a produção de 2,51 g/L de ácido cítrico quando 150 g/L de glicerol PA, 0,1 g/L de extrato de lêvedo e 250 rpm foram utilizados, em meio mineral não tamponado e a uma razão molar C/N de 6085.

O meio mineral tamponado permitiu maior produção de ácido cítrico que foi maior tanto usando glicerol P.A quanto glicerol do biodiesel. Portanto, a concentração dos sais do meio de cultivo influencia significativamente a produção de ácido cítrico.

Em uma terceira etapa, foi possível produzir 14,04 g/L de ácido cítrico a uma razão molar de C/N de 1217 utilizando glicerol PA como fonte de carbono. Os modelos de 1ª ordem para as variáveis concentração e produtividade de ácido cítrico foram validos pela análise de variância.

Em uma última etapa, a produção máxima de ácido cítrico obtida foi de 16,49 g/L, com $Y_{cit/glic}$ igual a 0,55, uma razão molar de C/N de 714 e $R_{AC/ISC}$ igual a 12:1. Foi produzido 6,75 g/L de ácido cítrico utilizando como fonte de carbono glicerol proveniente da produção do biodiesel nas condições otimizadas, mostrando ser um meio de cultura alternativo capaz de suportar o crescimento de *Y. lipolytica* e a biossíntese do ácido cítrico.

A adição de uma fonte de carbono extra (acetato de sódio) só foi necessária, ou seja, só aumentou a produção de ácido cítrico, quando a concentração da fonte de carbono estava fora da faixa ideal de razão C/N. Isso ocorreu quando se utilizou o

glicerol bruto. Portanto, a produção com glicerol bruto precisa ainda ser otimizada, sem a adição de acetato de sódio.

Portanto, o presente trabalho otimizou o processo de produção do ácido cítrico por *Y. lipolytica* em frascos agitados, através de manipulação das condições de meio de cultivo estabelecendo uma razão molar C/N ótima de 714 e $Y_{ci/glic}$ igual a 0,55. Através de planejamentos experimentais a produção de ácido cítrico foi ampliada 28 vezes utilizando glicerol PA. O resultado obtido para o glicerol proveniente da produção do biodiesel foi satisfatório, podendo produzir um produto biotecnológico bruto com capacidade de aplicação futuras em diversos setores.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

- ✓ Otimizar o meio de cultivo utilizando como fonte de carbono glicerol proveniente da produção do biodiesel para a obtenção de meio rico em ácido cítrico;
- ✓ Tendo em vista que os cromatogramas relacionados aos estudos preliminares utilizando diferentes fontes de nitrogênio e em água destilada e Milliq apresentaram picos, determinar os outros ácidos orgânicos produzidos ao longo dos ensaios;
- ✓ Estudar a possibilidade de produção concomitante de ácido cítrico e biosurfactante, já que as condições otimizadas se aproximam das condições de produção de biosurfactante obtidas por FONTES (2008);
- ✓ Estudar a influência de condições de estresse bárico na produção de ácido cítrico;
- ✓ Estudar a produção de ácido cítrico em biorreator para uma possível ampliação de escala;
- ✓ Estudar o processo de purificação do ácido cítrico obtido;
- ✓ Avaliar o potencial de aplicação do ácido cítrico obtido na indústria de alimentos, na área farmacêutica, em cosméticos e em outros produtos industriais uam vez que foi obtido a partir de um resíduo gerado por uma reação de produção de biodiesel que envolve um álcool e uma base;
- ✓ Realizar a dosagem de glicerol de todos os ensaios para verificar o seu consumo por *Yarrowia lipolytica*.

6. Produção Científica

Artigo Submetido para publicação:

SILVA, L.V.; RIBEIRO, R. R.; COELHO, M.A.; AMARAL, P. F. F.; PESSOA, F. L. P. Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* using glycerol as carbon source. New Bitechonolgy, "ECB14 special issue".

Publicação em Anais de Congressos (Trabalho Completo):

SILVA, L.V.; RIBEIRO, R. R.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M.A.; PESSOA, F. L. P. Produção de Ácido Cítrico por *Yarrowia lipolytica* a partir de glicerol em condições limitantes de nitrogênio. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal/RN, 2009.

SILVA, L.V.; RIBEIRO, R. R.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M.A.; PESSOA, F. L. P. Produção de Ácido Cítrico por *Yarrowia lipoytica* a partir de glicerol bruto. I Workshop: biodiesel in foco. UFRJ/RJ, 2009.

SILVA, L.V.; RIBEIRO, R. R.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M.A.; PESSOA, F. L. P. Produção de Ácido Cítrico por *Yarrowia lipoytica* utilizando glicerol proveniente da produção do biodiesel como fonte de carbono. I Seminário de Biodiesel e Coprodutos. ITAL, Campinas/SP, 2009.

Publicação em Anais de Congressos (Resumo):

SILVA, L.V.; RIBEIRO, R. R.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M.A.; PESSOA, F. L. P. Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* using glycerol as carbon source. 14th European Congress on Biotechnology. Barcelona/Spain, 2009.

SILVA, L.V.; RIBEIRO, R. R.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M.A. Otimização da Produção de Ácido Cítrico utilizando como substrato glicerol por *Yarrowia lipoytica*. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Uberlândia/MG, 2009.

RIBEIRO, R. R.; SILVA, L.V.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M.A. Utilização de Planejamento Experimental para otimização da produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica*. XXXI Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artísitica e Cultural da UFRJ.UFRJ/RJ, 2009.

Resumo publicado em revista:

SILVA, L.V.; RIBEIRO, R. R.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M.A.; PESSOA, F. L. P. Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* using glycerol as carbon source. New Biotechnology. ISSN 1871-6784, v.25, s.1, 2.6.082, 2009.

Trabalho Completo submetido para publicação:

SILVA, L.V.; RIBEIRO, R. R.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M.A.; PESSOA, F. L. P. Potencial aplication of raw glycerol from biodiesel in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*.

7. Referências Bibliográficas

AKIYAMA, S. I., SUZUKI, T., SUMINO, Y.; FUKADA, H. Induction and citric acid productivity of fuoro-acetate-sensitive mutant strains of *Candida lipolytica*. Agr. Biol. Chem, v. 37, pp. 879-884, 1973.

AMARAL, P. F. F.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A. M. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; COELHO, M. A. Z.; COUTINHO, J. A. P. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Yeast, v. 23, pp. 867–877, 2006.

ANASTASSIADIS, S.; REHM, H. J. Oxygen and temperature effect on continuous citric acid secretion in *Candida oleophila.* Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458Vol.9 n.4, Issue of July 15, 2006.

ANASTASSIADIS, S., REHM, H.J. Continuous citric acid secretion by a high specific pH dependent active transport system in yeast *Candida oleophila* ATCC 20177. Electronic Journal of Biotechnology, v. 8, pp. 46–161, 2005.

ANASTASSIADIS, S.; AIVASIDIS, S.; WANDREY, C. Citric acid production by Candida strains under intracellular nitrogen limitation. Appl Microbiol Biotechnol, v. 60, pp. 81–87, 2002.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. Revista Analytica, Dezembro 2006/Janeiro 2007, Nº26.

ARZUMANOV, T. E.; SIDOROV, I. A.; SHISHKANOVA, N. V.; FINOGENOVA, T. V. Mathematical modeling of citric acid production by repeated batch culture. Enzyme and Microbial Technology, v. 26, pp. 826-833, 2000.

ASHBY, R. D.; NUÑEZ, A.; SOLAIMAN, D. K.Y.; FOGLIA, T. A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. Journal of the american oil chemists' society, v. 82, pp. 625–630, 2005.

BARBIRATO F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. Propionic acid fermentation from glycerol: Comparison with conventional substrates. Appl Microbiol Biotechnol, v. 47, pp. 441–6, 1997.

BARTH, G.; BECKERICH, J.M.; DOMINGUEZ, A.; KERSCHER, S.; OGRYDZIAK, D.; TITORENKO, V; GAILLARDIN, C. Functional genetics of *Yarrowia lipolytica* In: (de Winde, J.H., Ed.), Functional Genetics of Industrial Yeasts, pp. 228–271. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2003.

BARTH, G. & GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Reviews, v. 19, pp. 21-237, 1997.

BEHR, ARNO.; EILTING, JENS.; IRAWADI, KEN.; LESCHINSKI, JULIA.; LINDNER, FALK. Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. Green Chemistry, v. 10, n. 1, pp.1–140, 2007.

CHERNYAVSKAYA, O. G. ; SHISHKANOVA, N. V. ; IL'CHENKO, A. P. ; FINOGENOVA, T. V. Synthesis of α-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 53 (2), pp. 152-158, 2000.

CHOTANI, G. ; DODGE, T. ; HSU, A. ; KUMAR, M. ; LADUCA, R. ; TRIMBUR, D. The commercial production of chemicals using pathway engineering. Biochim Biophys Acta, v. 154, pp. 434–55, 2000.

CIRIGLIANO, M.C. & CARMAN, G.M. Purification and Characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol., v.50 (4), pp. 846-850, 1985.

CIRIGLIANO, M.C. & CARMAN, G.M. Isolation of a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol., v.48 (4), pp. 747-750, 1984.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. Bioresource technology, v. 70, n.2, pp. 173-180, 1999.

CROLLA, A. & KENNEDY, K. J. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on η-paraffins. Journal of Biotechnology, v. 110, pp.73-84, 2004.

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

ERMAKOVA, I.T.; ERMOLENKO, E.A; FINOGENOVA, T.V. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, v. 22 (3), pp. 341−348, 1986.

FICKERS, P.; BENETTI, P.-H.; WACHE, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M.S.; NICAUD, J.-M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Research, v. 5, pp. 527–543, 2005.

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, v. 41(5), pp. 418–425, 2005.

FONTES, G. C. Produção de Biossurfactante por *Yarrowia lipolytica.* Dissertação apresentada ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

FÖRSTER, A.; AURICH, A.; MAUERSBERGER, S.; BARTH, G. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica.* Applied Microbial and Cell Physiology Appl Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s00253-007-0958-0, 2007.

GANCEDO, J.M. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cereviseae.* FEMS Microbiology Reviews, v. 25, n. 1, pp. 107-123, 2001.

GERIS, R.; SANTOS, N.A. C.; AMARAL, B.A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja – Reação de transesterificação para aulas práticas de Química Orgânica. Quim. Nova, v. 30, n. 5, pp.1369-1373, 2007.

GOOD, D. W.; DRONIUK, R.; LAWFORD, G.R.; FEIN, J. E. Isolation and characterization of a *Sccharomycopis lipolytica* mutant showing increased production of citric acid from canola oil. Can. J. Microbiol., v. 31, pp. 436-440, 1985.

GREWAL, H. S. & KALRA, K.L. Fungal Production Of Citric Acid. Biotechnology Advances, v. 13, n. 2, pp. 209-234, 1995.

GUTIERREZ, J.R. & ERICKSON, L.E. Hydrocarbon Uptake in Hydrocarbon Fermentations, Biotechnol. Bioeng., v.19, pp. 1331-1349, 1977.

HAEGLER, A.N.& MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Appl. Environ. Microbiol., v. 41, n. 1, pp. 173-178, 1981.

IMANDI, S. B. ; BANDARU, V. V. R. ; SOMALANKA, 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, v. 40, pp. 1367–1372, 2007.

ISMAIL, S.A.S.; DEAK, T.; ABD EL-RAHMAN, H.A.; YASSIEN, M.A.M.; BEUCHAT, L.R. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. International Journal of Food Microbiology, v. 64, pp.13–19, 2001.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. J Biosci Bioeng, v.100, pp. 260–265, 2005.

KAMZOLOVA, S. V.; MORGUNOV, I. G.; AURICH, A.; PEREVOZNIKOVA, O. A.; SHISHKANOVA, N. V.; STOTTMEISTER, U. ; FINOGENOVA, T. V. Lipase Secretion and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast Grown on Animal and Vegetable Fat. Food Technol. Biotechnol, v. 43 (2), pp. 113-122, 2005.

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, v. 3, pp. 217-222, 2003.

KARINEN, R.S.; KRAUSE, A.O.I. New biocomponents from glycerol, Applied Catalisys A: General, v. 306, pp. 128-133, 2006.

KAWASSE, F. M.; AMARAL, P. F.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C.; COELHO, M. A. Z. Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. Bioprocess Biosyst Eng., v. 25, pp. 371-375, 2003.

KIM, T. H.; YOUNG, S.O.; KIM, S.J. The possible involvement of de cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil-degrading Yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. J.Microbiol. Biotechnol., v. 10 (3), pp. 333-337, 2000.

KOSHELEVA, N.A.; SMIRNOVA, L. S.; BAIKOVA, L. A. Biosynthesis of a-ketoglutaric acid by microorganisms (in Russian). Izv Akad Nauk SSSR Ser Biol, v. 1, pp. 74-90, 1967.

KRUSE, K.; FÖRSTER, A.; JURETZEK, T.; MAUERSBERGER, S.; BARTH, G. Method for the biotechnological production of citric acid by means of a genetically modified yeast *Yarrowia lipolytica*. WO2004/009828, DE 10333144, 2004.

KUSDIYANTINI, E. ;GAUDIN, P. ; GOMA, G .; BLANC, P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of Phaffia rhodozyma on glycerol as a carbon source during batch fermentation. Biotechnology Letters, v. 20, n.10, pp. 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. Biotechnol Bioeng., v. 72, pp. 41–8, 2001.

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

LI, Y.; CHEN, J.; LUN, S.-Y. Biotechnological production of pyruvic acid. Appl Microbiol Biotechnol, v. 57, pp. 451–459, 2001.

MADZAK, C.; GAILLARDIN, C.; BECKERICH, J.-M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. Journal of Biotechnology, v.109 (1-2), pp. 63-81, 2004.

MAGNUSON, J.K.; LASURE, L.L. Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine. Kluwer Academic/Plenum Publishers., 2004.

MARIER, J. R. & BOULET, M. Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method. Journal of Dairy Science, v. 41, n. 12, pp. 1683-1692, 1958.

MEESTERS, P.A.E.P.; HUIJBERTS, G.N.M; EGGINK, G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 45, pp. 575–579, 1996.

MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V.; PEREVOZNIKOVA, O. A.; SHISHKANOVA, N.V.; FINOGENOVA, T.V. Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica.* Process Biochemistry, v. 39, pp. 1469–1474, 2004.

MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D. J.; WANG, W.; XIU, Z.L. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations. Biotechnol Lett , v. 28, pp. 1755–9, 2006.

MULLER, S.; SANDAL, T.; KAMP-HANSEN, P.; DALBOGE, H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisia*e, *Hansenula polymorph*a, *Kluyveromyces lacti*s, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytic*a Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytic*a, Yeast, v.14, pp. 1267-1283, 1998.

MUNTYAN, L.N. Demands for Vitamins in Yeast of the Genus *Candida* Grown in the Presence of Glucose and *n*-Alkanes. Extended Abstract of Cand. Sci. (Biol.) Dissertation, Pushchino: IBFM AN SSSR, 1976.

NICAUD, J-M.; MADZAK, C.; BROEK, P.V.D; GYSLER, C.; DUBOC, P.; NIEDERBERGER, P.; GAILLARDIN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*, FEMS Yeast Research, v.2, n.3, pp.371-379, 2002.

NOVOTNY, C.; DOLEZALOVA, L.; MUSIL, P.; NOVAK, M. The production of lipases by some *Candida* and *Yarrowia* yeasts. J. Basic Microbiol., v.28, pp.221-227, 1988.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; PANAYOTOU, M. G.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorisation 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, v. 32, pp. 60 – 71, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by Clostridium butyricum. J. Chem. Technol. Biotechnol., v. 78, pp. 542–547, 2003.

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, v. 92, p. 737-744, 2002.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V. Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica.* Dissertação (Doutorado em Ciências), IQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V.; ROCHA-LEÃO, M.H.; SANT'ANNA, G.L. A stable lipase from *Candida lipolytica* – cultivation conditions and crude enzyme characteristics", Appl. Biochem. Biotechnol., v.63-65, pp.73-85, 1997.

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

RANE, K.; SIMS, K. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y 1095: Effect of glucose concentration on yield and productivity. Enzyme Microb. Technol., v.15, pp. 646–651, 1993.

RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Editora Casa do Pão, 1ª edição, 2005.

ROEHR, M.; KUBICEK, C. P.; KOMÍNEK, J. Citric acid. In: Biotecchnology, v. 6, pp. 307-345. (H. J. Rehm, G. Reed, eds.) 2nd ed., Weinheim, Verlag Chemie, 1996.

ROUFS, J.B. Pyruvate: does it amp endurance and burn more fat? Muscle Fitness, v. 57, pp. 195–197, 1996.

RYMOWICZ, W.; RYWIŃSKA, A.; GLADKOWSKI, W. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. Chemical Papers, v. 62, n. 3, p. 239–246, 2008.

RYMOWICZ, W.; RYWIŃSKA, A.; ŻAROWSKA, B.; JUSZCZYK, P. Citric Acid Production from Raw Glycerol by Acetate Mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Pap.*, v. 60 (5), 391-394, 2006.

SOUSA, J. R.; MELO, V. M.M.; GONÇALVES, L. R. B. Avaliação de microrganismos quanto à Conversão doGlicerol obtido do Processo de Produção do Biodiesel em Biossurfactantes. XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM, Curitiba, 2007.

STOTTMEISTER, U.; BEHRENS, U.; WEISSBRODT, E.; BARTH, G.; FRANKE-RINKER, D.; SCHULZE, E. Nutzung von Paraffinen und anderen Nichtkohlenhydrat-Kohlenstoffquellen zur mikrobiellen Citronensa¨uresynthese. Z. Allg. Mikrobiol. v. 22, pp. 399–424, 1982.

SZABO, R.; ŠTOFANÍKOVÁ, V. Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formaton and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*, FEMS Microbiol. Letters, v. 206, pp. 45-50, 2002.

SZABO, R. Dimorphism in *Yarrowia lipolytica:* filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration, Folia Microbiol. v. 44, n.1, pp.19-24, 1999.

TAO, J.; WANG, X.; SHEN, Y.; WEI, D. Strategy for the improvement of prodigiosin production by a Serratia marcescens mutant through fed-batch fermentation. World J Microbiol Biotechnol, v. 21, pp. 969–72, 2005.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. Applied Engineering in agriculture, v. 22, pp. 261-265, 2005.

VENTER, T.; KOCK, J. L. F.; BOTES, P. J.; SMIT, M. S.; HUGO, A. E JOSEPH, M. Acetate Enhances Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* When Grown on Sunflower Oil. Systematic and Appied Microbiology, v. 27, pp. 135-138, 2004.

YIGITOGLU, M. Production of citric acid by fungy. Journal of Islamic Academy of Sciences, v. 5:2, pp. 100-106, 1992.