CULTIVO DE *Meyerozyma guilliermondii* EM BATELADA E BATELADA ALIMENTADA PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS A PARTIR DE GLICEROL BRUTO

BRUNO LOUREIRO LADEIRA[1], JANAÍNA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT[2], CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT[3]

RESUMO

Esse trabalho vem contribuir na busca por alternativas tecnológicas visando agregar valor ao glicerol bruto, coproduto oriundo da síntese do biodiesel, por meio do seu uso como fonte de carbono pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* para a produção de lipídios, com potencial para utilização como fonte de ácidos graxos essenciais. A batelada alimentada em frascos agitados foi avaliada utilizando diferentes estratégias de alimentação, na qual a alimentação com somente glicerol bruto em 48 h de cultivo incrementou o teor de lipídios em 23,8% (18,70%), os lipídios totais produzidos em 96,8% (2,42 $g.L^{-1}$), a produtividade de lipídios em 38,8% (0,0143 $g.L^{-1}.h^{-1}$) e a biomassa em 59,0% (12,96 $g.L^{-1}$), em relação aos cultivos em batelada. O perfil de ácidos graxos mostrou a predominância de ácidos graxos poli-insaturados, incluindo os ácidos graxos essenciais linoleico (53,2%) e gama-linolênico (29,2%).

PALAVRAS-CHAVES: BATELADA ALIMENTADA. BIODIESEL. GLICEROL RESIDUAL. LEVEDURAS OLEAGINOSAS.

CULTIVATION OF *Meyerozyma guilliermondii* IN BATCH AND FED-BATCH MODES FOR LIPID PRODUCTION FROM CRUDE GLYCEROL

ABSTRACT

This study contributes to the search for technological alternatives which aim at adding value to crude glycerol, a byproduct from biodiesel synthesis, by using it as a carbon source for *Meyerozyma guilliermondii* in lipid production, with potential as a source of essential fatty acids. The fed-batch mode in shake flasks was evaluated by different feeding strategies, in which the feed with only crude glycerol in 48 h cultivation increased lipid content in 23.8% (18.70%), lipid production in 96.8% (2.42 $g.L^{-1}$), lipid productivity in 38.8% (0.0143 $g.L^{-1}.h^{-1}$) and biomass in 59.0% (12.96 $g.L^{-1}$), by comparison with the batch mode. The fatty acid profile showed predominance of polyunsaturated fatty acids, including both linoleic (53.2%) and gamma-linolenic (29.2%) essential fatty acids.

KEYWORDS: BIODIESEL. CRUDE GLYCEROL. FED-BATCH CULTIVATION. OLEAGINOUS YEAST.

[1]Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: bruno.ladeira@furg.br
[2]Docente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: jfmb@vetorial.net
[3]Docente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: burkert@vetorial.net

1. INTRODUÇÃO

Conforme dados da Agência Nacional de Petróleo (ANP), a quantidade de biodiesel puro (B100) produzida em todo território brasileiro no ano de 2016 foi de 3.801.339 m^3, um aumento de aproximadamente 55 vezes em uma década [1]. Esta crescente produção de biodiesel, a partir de oleaginosas e gordura animal, veio acompanhada do incremento da geração de glicerol bruto, já que este constitui o principal subproduto da reação de transesterificação (a cada 10 kg de biodiesel é gerado aproximadamente 1 kg de glicerol), sendo que o mercado em seus usos tradicionais (cosméticos, alimentos, produtos farmacêuticos, entre outros) não consegue absorvê-lo em sua totalidade [20]. Por outro lado, a disposição do glicerol bruto no meio ambiente pode causar sérios problemas ambientais, enquanto que um processo de purificação a fim de remover as impurezas resultantes do processo de produção do biodiesel, de forma a permitir sua utilização em diversos setores industriais, tem alto custo, sendo economicamente inviável, considerando seu baixo valor comercial [12].

Desta forma, é necessário encontrar alternativas para converter o glicerol bruto em produtos de maior valor agregado que possam contribuir para a sustentabilidade da cadeia produtiva do biodiesel. Neste contexto, o glicerol bruto pode ser utilizado como fonte de carbono por diferentes micro-organismos para obtenção de diversos produtos, tais como: 1,3–propanediol [6], ácido cítrico [13,16], ácido succínico [28], carotenoides [21], proteína unicelular [19] e óleo unicelular [23], entre outros.

A produção de lipídios microbianos, também denominados *single cell oil* ou óleo unicelular, vem sendo amplamente investigada, sobretudo pela necessidade de se dispor de biomassas alternativas como fonte de lipídios, que possam ser empregadas na produção de biodiesel ou como fontes de ácidos graxos essenciais na alimentação humana e animal [8,9,13,15,23]. As leveduras oleaginosas são capazes de acumular quantidades expressivas de lipídios, principalmente na forma de lipídios neutros, glicolipídios, fosfolipídios e ácidos graxos livres [15].

Um dos fatores mais importantes e estudados na produção de lipídios microbianos é a razão carbono/nitrogênio (C/N) do meio de cultivo, pois o acúmulo de lipídios pelas células é positivamente influenciado pelo excesso da fonte de carbono [3]. Entretanto, elevadas concentrações de substrato inibem o crescimento microbiano em cultivos em batelada. Dessa forma, tem sido proposta a batelada alimentada, a fim de fornecer uma quantidade adicional de substrato sem a ocorrência da inibição [17].

O cultivo em batelada alimentada pode ser efetivo no incremento da densidade celular e do teor de lipídios em micro-organismos oleaginosos. As vantagens desse processo incluem a redução da inibição pelo substrato, a expansão da fase lipogênica e a maior produtividade de lipídios [5,17], sendo que diferentes estratégias de alimentação devem ser avaliadas, visando à melhoria do desempenho da produção lipídica.

Neste contexto, o presente estudo propõe avaliar a produção de lipídios pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* cultivada em frascos agitados em batelada alimentada utilizado glicerol bruto como fonte de carbono, comparando com a batelada simples, definindo uma estratégia de alimentação que proporcione incrementos na produção lipídica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

A levedura *M. guilliermondii*, previamente isolada e identificada [22], foi mantida sob refrigeração (4ºC) em tubos contendo ágar YM (*Yeast Malt)*, com a seguinte composição ($g.L^{-1}$): 10,0 glicose, 5,0 peptona, 3,0 extrato de malte, 3,0 extrato de levedura e 20,0 ágar.

Para a reativação, a partir das culturas estoques foram realizados repiques sucessivos para tubos com ágar YM, sendo incubados em estufa a 30ºC por 48 h.

2.2. Glicerol bruto

Glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel a partir do óleo degomado de soja por via metanólica foi utilizado no preparo dos meios, sem quaisquer etapas de purificação, sendo fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo – Brasil.

2.3. Análise elementar CHN e espectrometria de absorção atômica

Amostras do glicerol bruto e do extrato de levedura (fontes de carbono e nitrogênio) usados nos cultivos foram submetidas a uma análise elementar CHN, utilizando um Analisador Elementar de CHN (Perkin Elmer, modelo 2400, EUA). Os minerais cálcio, magnésio, ferro, zinco, potássio e sódio foram quantificados no glicerol bruto por espectrometria de absorção atômica (Perkin Elmer, modelo Optima 8300, EUA).

2.4. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado usando dois tubos de cultura microbiana reativada, raspados com 10 mL de água peptonada 0,1% cada. Após, a suspensão de células foi transferida para frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 180 mL de caldo YM. A suspensão resultante foi incubada a 30ºC e 180 rpm em uma incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, modelo TE-424, Brasil), monitorando o cultivo por contagem de células em câmara de Neubauer [18].

2.5. Cultivos em frascos agitados

2.5.1. Cultivos em batelada

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume inicial de 200 mL, resultante da adição do meio de cultivo, suspensão de leveduras (inóculo) e água destilada estéril, e cuja composição foi definida de acordo com o delineamento experimental. Os frascos foram inoculados com o volume de inóculo necessário, calculado a partir de contagem realizada em câmara de Neubauer, para que se atingisse uma concentração inicial de 10^7 células.mL^{-1}, sendo mantidos em uma incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, modelo TE-424, Brasil), na temperatura de 30ºC e com agitação de 180 rpm.

O meio de cultivo utilizado continha 30 g.L^{-1} glicerol bruto, 1,2 g.L^{-1} extrato de levedura, 5 g.L^{-1} KH_2PO_4, 3 g.L^{-1} $MgSO_4.7H_2O$, 1 g.L^{-1} Na_2HPO_4, 0,0002 g.L^{-1} $ZnSO_4.7H_2O$ e pH inicial ajustado em 5,5 antes da esterilização (121ºC por 15 min). Este meio de cultivo foi estabelecido em ensaios prévios (dados não publicados).

Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-definidos, sendo centrifugadas a 1157 *x* g (centrífuga Eppendorf, modelo 5804 R, Alemanha) por 15 min para a determinação da biomassa e lipídios, este último apenas ao término dos cultivos (120 h).

2.5.2. Cultivos em batelada alimentada

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, modelo TE-424, Brasil), utilizando 180 rpm e 30ºC. As estratégias de alimentação testadas corresponderam à adição de 20 mL (10% do volume inicial) de glicerol bruto (dissolvido em água destilada) ou de meio de cultivo (o mesmo utilizado na batelada simples), que foram alimentados após 48 h ou 96 h do

início dos cultivos. As concentrações dos componentes nas alimentações foram estabelecidas de forma a fornecer a mesma quantidade de cada componente inicialmente adicionado ao meio.

Amostras foram coletadas em tempos pré-definidos, centrifugadas a 1157 *x* g (centrífuga Eppendorf, modelo 5804 R, Alemanha) por 15 min para a determinação da biomassa e lipídios, este último apenas ao término dos cultivos (120 h). Os ensaios foram realizados em quadruplicata, sendo os dados tratados por análise de variância e teste de Tukey a 95% de confiança, a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os modos de cultivo.

2.6. Métodos analíticos

2.6.1. Determinação da biomassa

A biomassa foi determinada com leitura de absorvância a 600 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP 22, China) e posterior conversão à concentração mássica através de uma curva-padrão obtida para o micro-organismo [7].

2.6.2. Determinação dos lipídios

Os lipídios intracelulares foram determinados pelo método de BLIGH e DYER [4]. A biomassa seca foi tratada com HCl 2 M para o rompimento da parede celular. O *pellet* foi submetido a extrações sucessivas utilizando clorofórmio, metanol e água como solventes. A fase clorofórmio foi separada, o solvente evaporado e os lipídios quantificados por gravimetria.

Os lipídios totais produzidos foram calculados através da multiplicação da concentração de biomassa pelo teor de lipídios (base seca). A produtividade de lipídios foi calculada dividindo lipídios totais produzidos pelo tempo de cultivo.

2.6.3. Perfil de ácidos graxos

Para separar e quantificar os ácidos graxos, a fração lipídica foi esterificada pelo método adaptado de METCALFE, SCHMITZ e PELKA [14]. As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo a gás (Shimadzu, 2010 Plus, Japão), equipado com injetor *split/splitless*, coluna capilar RTX®-1 (30 m x 0,25 mm diâmetro interno x 0,25 µm) e detector por ionização de chama. O gás de arraste foi hélio em uma vazão de 1,25 $mL.min^{-1}$. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 260°C, sendo o volume injetado de 1 µL.

As condições cromatográficas de separação foram temperatura inicial da coluna 50°C, elevando-se para 200°C, em uma taxa de 6°C.min^{-1}, permanecendo nesta temperatura por 4 min. Na segunda rampa de aquecimento, a taxa de aumento foi de 2°C.min^{-1} até 240°C, permanecendo por 10 min. A comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos foi usada para identificação do perfil de ácidos graxos das amostras, sendo quantificados pela normatização das áreas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização dos substratos

A Tabela 1 apresenta a caracterização do glicerol bruto e do extrato de levedura quanto à composição de carbono, hidrogênio e nitrogênio. A Tabela 2 mostra a composição de alguns minerais presentes no glicerol bruto.

TABELA 1. Caracterização do glicerol bruto e extrato de levedura quanto à composição de carbono, hidrogênio e nitrogênio.

Elemento	Glicerol bruto	Extrato de levedura
Carbono (% m/m)	29,9 ± 0,7	38,9 ± 0,2
Hidrogênio (% m/m)	7,7 ± 0,2	6,7 ± 0,1
Nitrogênio (% m/m)	0,14 ± 0,02	10,6 ± 0,1

Resultados expressos como média e estimativa do desvio padrão de três determinações.

Pode-se verificar que o glicerol bruto constitui uma fonte de carbono importante para o cultivo microbiano. Além disso, apresentou quantidades significativas de sódio, além de zinco e potássio, que podem constituir micronutrientes importantes para o desenvolvimento microbiano. De acordo com GAO et al. [10], as impurezas encontradas no glicerol bruto podem exercer papel positivo ou negativo no crescimento celular e acúmulo de lipídios, dependendo do micro-organismo.

TABELA 2. Minerais presentes no glicerol bruto.

Elemento	Glicerol bruto
Cálcio ($mg.kg^{-1}$)	<LD
Magnésio ($mg.kg^{-1}$)	<LQ
Ferro ($mg.kg^{-1}$)	<LD
Zinco ($mg.kg^{-1}$)	0,48 ± 0,01
Potássio ($mg.kg^{-1}$)'	9,1 ± 0,1
Sódio (% m/m)	2,1 ± 0,1

Resultados expressos como média e estimativa do desvio padrão de três determinações. LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação (LD para magnésio é de 0,16 $mg.kg^{-1}$).

3.2. Cultivos em batelada alimentada

Cultivos em batelada alimentada foram realizados utilizando o mesmo meio de cultivo da batelada simples, avaliando diferentes estratégias de alimentação. A maior produção de lipídios foi obtida com a alimentação de glicerol bruto em 48 h de cultivo (Tabela 3), atingindo 18,70%, 2,42 $g.L^{-1}$ e 0,0143 $g.L^{-1}.h^{-1}$ para as respostas teor de lipídios, lipídios totais produzidos e produtividade de lipídios, respectivamente, diferindo-se estatisticamente das demais condições estudadas. A alimentação contendo apenas glicerol bruto permite manter a relação C/N em patamares elevados, o que pode contribuir para um maior acúmulo de lipídios.

Esta estratégia de alimentação (G-48), quando comparada ao cultivo em batelada, representou um incremento de 23,8%, 96,8%, 38,8% e 59,0% no teor de lipídios, lipídios totais, produtividade de lipídios e biomassa, respectivamente. As maiores concentrações de biomassa (Tabela 3) foram alcançadas quando o cultivo foi alimentado com meio concentrado em 48 h e 96 h (M-48 e M-96). Este comportamento pode ser explicado pela presença de extrato de levedura na alimentação, que contribui para uma relação C/N mais baixa, favorável ao crescimento celular, em detrimento do acúmulo de lipídios. Desta forma, um aspecto relevante ao estabelecer as condições para a batelada alimentada é o impacto da alimentação na relação C/N do meio, que deve conciliar o aumento da biomassa e o acúmulo de lipídios.

TABELA 3. Ensaios em batelada alimentada e respostas obtidas.

Ensaio	Teor de lipídios (%)	Lipídios totais ($g.L^{-1}$)	Produtividade de lipídios ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Biomassa ($g.L^{-1}$)
G-48	18,70 ±0,26[a]	2,42 ± 0,04[a]	0,0143 ± 0,0003[a]	12,96 ± 0,18[b]
G- 96	16,73 ± 0,66[b]	1,99 ± 0,06[b]	0,0119 ± 0,0004[b]	11,93 ± 0,11[c]
M-48	9,60 ± 0,17[d]	1,45 ±0,01[c]	0,0087 ± 0,0001[c]	15,19 ± 0,21[a]
M-96	6,86 ± 0,28[e]	1,05 ± 0,05[e]	0,0063 ± 0,0002[d]	15,46 ± 0,13[a]
Batelada	15,10 ± 0,18[c]	1,23 ± 0,02[d]	0,0103 ± 0,0001[b]	8,15 ± 0,06[d]

Resultados expressos como média e estimativa do desvio padrão de quatro repetições. Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$). G-48: alimentação com glicerol bruto em 48 h; G-96: alimentação com glicerol bruto em 96 h; M-48: alimentação com meio em 48 h; M-96: alimentação com meio em 96 h.

Através do acompanhamento da biomassa de *M. guilliermondii* ao longo dos cultivos em batelada alimentada (Figura 1), é possível verificar que houve um prolongamento do crescimento microbiano quando comparado ao cultivo em batelada, permitindo a obtenção de maiores concentrações de biomassa.

No cultivo de *Lipomyces starkeyi* utilizando glicose e xilose como fontes de carbono, foi relatado um aumento da biomassa de 27,5 $g.L^{-1}$ para 85,4 $g.L^{-1}$, e nos lipídios produzidos de 9,0 $g.L^{-1}$ para 41,8 $g.L^{-1}$ quando a batelada alimentada repetida foi utilizada em substituição à batelada simples [2]. A batelada alimentada utilizada no cultivo de *Cryptococcus* sp. com glicose resultou em incrementos na biomassa de 9,4 $g.L^{-1}$ para 11,4 $g.L^{-1}$ e nos lipídios totais produzidos de 6 $g.L^{-1}$ para 7,3 $g.L^{-1}$, quando comparado com o cultivo em batelada [5]. *Candida freyschussii,* cultivada usando glicerol como fonte de carbono, produziu 4,7 $g.L^{-1}$ de lipídios e 15,2 $g.L^{-1}$ de biomassa em batelada, aumentando para 20 $g.L^{-1}$ e 65 $g.L^{-1}$, respectivamente, quando cultivada em batelada alimentada [17].

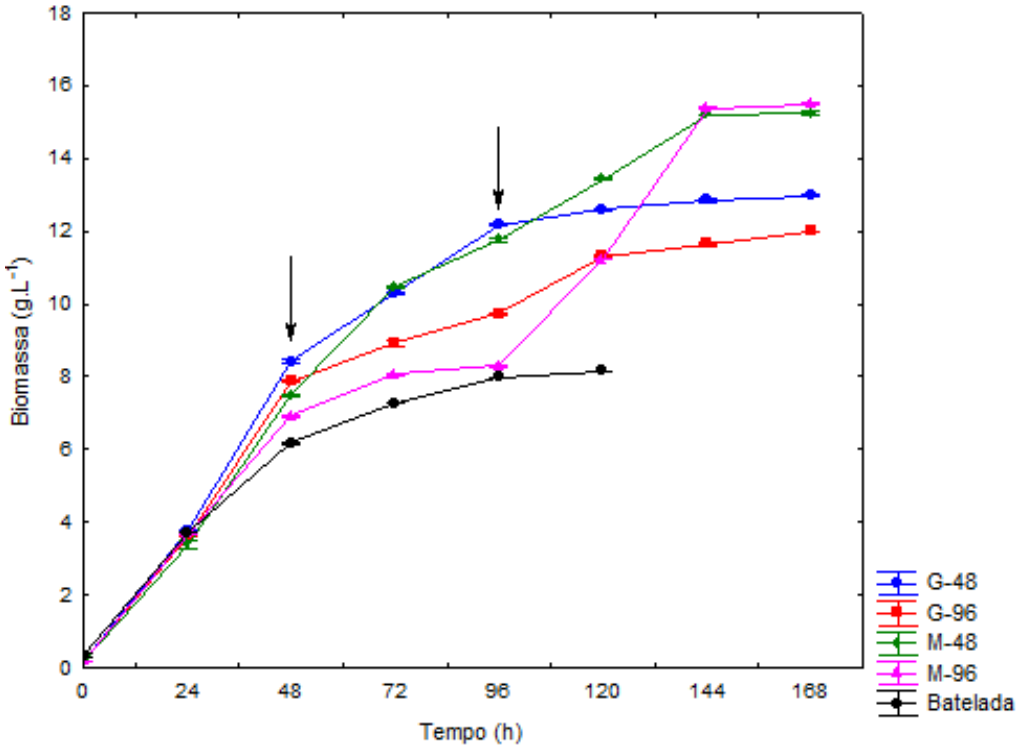

FIGURA 1. Acompanhamento da biomassa de *M. guilliermondii* ao longo dos cultivos em batelada alimentada. G-48: alimentação com glicerol bruto em 48 h; G-96: alimentação com glicerol bruto em 96 h; M-48: alimentação com meio em 48 h; M-96: alimentação com meio em 96 h.

3.3. Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos da biomassa da levedura *M. guilliermondii* cultivada em bateladas simples (Tabela 4) indicou a presença de 0,94% de ácidos graxos saturados, 11,22% de ácidos graxos monoinsaturados e 85,9% de ácidos graxos poli-insaturados. Portanto, é possível afirmar que essa biomassa mostra-se promissora como fonte de ácidos graxos poli-insaturados considerados essenciais, em particular os ácidos linoleico (53,2%) e gama-linolênico (29,2%), e esse aspecto torna-a uma potencial fonte desses ácidos graxos em alimentação humana, animal e na área farmacêutica.

TABELA 4**.** Perfil de ácidos graxos dos lipídios da biomassa de *M. guilliermondii* cultivada em meio contendo glicerol bruto.

Ácidos graxos	Composição (%)
Ácidos graxos saturados	
C16:0	0,35
C17:0	0,11
C23:0	0,48
Ácidos graxos monoinsaturados	
C 14:1	0,07
C16:1	10,8
C17:1	0,09
C18:1	ND
C24:1n9	0,26
Ácidos graxos poli-insaturados	
C18:2	53,2
C18:2n6t	ND
C18:3n6	29,2
C18:3n3	3,5

ND: não detectado.

Os ácidos graxos essenciais mais importantes para a alimentação humana são o ácido linolênico (ômega-6) e o ácido linoleico (ômega-3), sendo que sua importância está associada à sua capacidade de se transformar em substâncias biologicamente mais ativas, com funções especiais no equilíbrio homeostático, e em componente estrutural das membranas celulares e do tecido cerebral e nervoso [24]. O ácido linoleico também é requerido na formulação de rações para alimentação animal [11,25,26], enquanto o ácido gama-linolênico apresenta efeitos anti-inflamatórios, por exemplo sobre artrite reumatoide, eczema e psoríase, e pode incrementar a eficácia de alguns agentes anticancerígenos [27], entre outras aplicações.

A produção de lipídios microbianos utilizando glicerol bruto como fonte de carbono resultou em percentuais de ácido linolênico na ordem de 1,76%, 6,9%, 4,2% e 6,7% respectivamente, para as leveduras *Rhodotorula glutinis* [8]*, Candida*

freyschussii [17], *Lipomyces starkeyi* [23] e *Rhodosporidium toruloides* [10]. Entretanto, SPIER et al. [23] observaram 23,1% de ácido linolênico para a levedura *Candida cylindracea* cultivada em glicerol bruto como fonte de carbono. Estas mesmas leveduras apresentaram proporções de ácido linoleico 15,91% [8], 24,7% [17], 42,5% [23] e 39,5% [10]. Desta forma, pode-se afirmar que *M. guilliermondii* produziu lipídios com proporções expressivas dos ácidos linoleico e gama-linolênico, quando comparada com outras leveduras cultivadas em meio à base de glicerol bruto.

4. CONCLUSÕES

No cultivo de *M. guilliermondii* em batelada alimentada, a alimentação somente de glicerol bruto em 48 h de cultivo levou a incrementos de 23,8%, 96,8%, 38,8% e 59,0% no teor de lipídios, lipídios totais, produtividade de lipídios e biomassa, respectivamente, em relação aos cultivos em batelada, atingindo valores de 18,70%, 2,42 $g.L^{-1}$, 0,0143 $g.L^{-1}.h^{-1}$ e 12,96 $g.L^{-1}$, respectivamente. No perfil de ácidos graxos dos lipídios microbianos, observou-se a predominância de ácidos graxos poli-insaturados, com elevados percentuais dos ácidos graxos essenciais linoleico (C18:2), com 53,2%, e gama linolênico (C18:3n6), com 29,2. Dessa forma, a produção de lipídios por *M. guilliermondii* em meio contendo glicerol bruto como principal fonte de carbono em batelada alimentada pode constituir uma alternativa importante para o aproveitamento e valorização desse coproduto gerado da cadeia produtiva do biodiesel, contribuindo para a sua sustentabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ANP. Agência Nacional do Petróleo. Dados estatísticos. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos>. Acesso em: 11 jul. 2017.

[2] ANSCHAU, A.; XAVIER, M.C.A.; HERNALSTEENS, S.; FRANCO, T.T. Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 214-222, 2014.

[3] BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1193-1206, 2011.

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

[5] CHANG, Y.H.; CHANG, K.S.; HSU, C.L.; CHUANG, L.T.; CHEN, C.Y.; HUANG, F.Y.; JANG, H.D. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose –based media and corncob hydrolysate for microbial oil production. **Fuel**, v. 105, p. 711-717, 2013.

[6] CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S.; DIETZ, D.; DOULGERAKI, A.I.; NYCHAS, G.J; ZENG, A.P. Production of 1,3- propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 101-112, 2011.

[7] CHOI, M.H.; PARK, Y.H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, p. 221-226, 2003.

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

[9] EVANS, C.T.; RATLEDGE, C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, v. 18, p. 630-635, 1983.

[10] GAO, Z.; MA, Y.; WANG, Q.; ZHANG, M.; WANG, J.; LIU, Y. Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by *Rhodosporidium toruloides* yeast 32489. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 373-379, 2016.

[11] GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J.F.; CULIOLI, J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 1-26, 2001.

[12] LEONETI, A.B.; LEONETI, V.A.; OLIVEIRA, S.V.W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138-145, 2012.

[13] MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2351-2358, 2010.

[14] METCALFE, L.D.; SCHIMITZ, A.A.; PELKA, J.R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514-515, 1966.

[15] MEULLEMIESTRE, A.; BREIL, C.; ABERT-VIAN, M.; CHEMAT, F. Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a biojetfuel application. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 190-199, 2016.

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

[17] RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; LEONARDI, A.; BIANCHI, M.M.; RINALDI, T.; AMARETTI, A. Getting lipids from glycerol: New perspectives on biotechnological explotation of *Candida freyschussii*. **Microbial Cell Factory**, v. 13, n. 83, p. 1-11, 2014.

[18] SANTOS, O.E. **Aproveitamento do glicerol gerado na síntese de biodiesel para produção de biomassa de leveduras**. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

[19] SANTOS, E.O.; MICHELON, M.; GALLAS, J.A.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. Raw glycerol as substrate for the production of yeast biomass. **International Journal of Food Engineering**, v. 9, p. 413-420, 2013.

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

[21] SILVA, C.M.; BORBA, T.M.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* using raw glycerol as an additional carbon source. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 4, p. 1-17, 2012.

[22] SPIER, F. **Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto gerado na síntese de biodiesel**. 2014. 190f. Tese. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

[23] SPIER, F.; BUFFON, J.G.; BURKERT, C.A.V. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: Lipid content and fatty acid profile of biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 415-422, 2015.

[24] TAKAHASHI, N.S. **Importância dos ácidos graxos essenciais**. 2005. Disponível em: <http://www.pesca.sp.gov.br>. Acesso em: 15 ago. 2016.

[25] THIEL-COOPER, R.L.; PARRISH, F.C.; SPARKS, J.C.; WIEGAND, B.R.; EWAN, R.C. Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1821-1828, 2001.

[26] ULIANA, O.; SILVA, J.H.S.S.; RADÜNZ NETO, J. Substituição parcial ou total de óleo de canola por lecitina de soja em rações para larvas de jundiá *(Rhamdia quelen)*, pisces, pimelodidae. **Ciência Rural**, v. 31, p. 677-681, 2001.

[27] VAN HOORN, R.; KAPOOR, R.; KAMPHUIS, J. A short review of sources and health benefits of GLA, the good omega-6. **Oilseeds and Fats, Crops and Lipids**, v. 15, p. 262-264, 2008.

[28] ZHANG, X.; SHANMUGAM, K.T.; INGRAM, L.O. Fermentation of glycerol to succinate by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 2397-2401, 2010.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPERGS pela concessão das bolsas de estudo.