

**Utilização de resíduos agroindustrias para produção de lipídios
microbianos por *yarrowia lipolytica* qu69****Use of agro-industrial waste for the production of microbial lipids by
yarrowia lipolytica qu69**

DOI:10.34117/bjdv5n7-087

Recebimento dos originais: 14/06/2019

Aceitação para publicação: 02/07/2019

Fernanda Arpini Souza

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal da Fronteira Sul
Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul UFFS
Endereço: BR 158 KM 405, Laranjeiras do Sul – PR
E-mail: fernanda_arpini@hotmail.com

Vanessa Gomes da Silva

Mestre em ciência animal pela Universidade Estadual de Londrina
Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul UFFS
Endereço: BR 158 KM 405, Laranjeiras do Sul – PR
E-mail: vanessa.silva@uffs.edu.br

Silvia Helena Tormen

Mestre em tecnologia de Alimentos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul UFFS
Endereço: BR 158 KM 405, Laranjeiras do Sul – PR
E-mail: Silvia.tormen@uffs.edu.br

Caroline Tamura

Graduanda de Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal da Fronteira Sul UFFS
Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul UFFS
Endereço: BR 158 KM 405, Laranjeiras do Sul – PR
E-mail: caroll88@gmail.com

Brenda Vieira de Jesus

Graduanda de Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal da Fronteira Sul UFFS
Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul UFFS
Endereço: BR 158 KM 405, Laranjeiras do Sul – PR
E-mail: brendavieiradjesus@gmail.com

Davi Luis Koester

Graduando de Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal da Fronteira Sul UFFS
Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul UFFS
Endereço: BR 158 KM 405, Laranjeiras do Sul – PR
E-mail: davi_l_koester@hotmail.com

Thiago Bergler Bitencourt

Doutor em Química pela Universidade de Santa Catarina

Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul UFFS
Endereço: BR 158 KM 405, Laranjeiras do Sul – PR
E-mail: bitencourt@uffs.edu.br

RESUMO

Diante do crescente aumento da demanda por alimentos processados ou minimamente processados, surge a necessidade de se realizar o aproveitamento dos subprodutos resultantes desses processamentos que, na maioria das vezes são considerados resíduos, entre eles, cascas, caroços e sementes. Quando descartados de maneira inadequada no meio ambiente, esses resíduos podem provocar danos ambientais. Devido a quantidade de nutrientes disponíveis nos resíduos agroindustriais estes podem ser utilizados em processos de bioconversão e transformados em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Neste trabalho foram utilizados diversos resíduos agroindustriais como fonte de carbono para produção de biomassa pela levedura *Yarrowia lipolytica* QU69 e a biomassa resultante foi analisada quanto a concentração de lipídios e o perfil de ácidos graxos produzidos. A levedura demonstrou eficiência para produção de lipídios principalmente quando utilizado resíduos de casca de mandioca, a biomassa por possuir alto valor lipídico poderá ser utilizada na alimentação animal com isso diminuir custos de produção.

Palavras-chave: bioconversão, levedura, alimento não convencional, ácidos graxos.

ABSTRACT

Faced with the growing demand for processed or minimally processed foods, the need arises to make use of the by-products resulting from these processes, which are often considered as residues, including bark, seeds and seeds. When disposed of improperly in the environment, such waste may cause environmental damage. Due to the amount of nutrients available in agroindustrial waste these can be used in bioconversion processes and transformed into commercial products or raw materials for secondary processes. In this work, several agroindustrial residues were used as a carbon source for biomass production by *Yarrowia lipolytica* yeast QU69 and the resulting biomass was analyzed for lipid concentration and the fatty acid profile produced. The yeast showed efficiency for lipid production mainly when using cassava husk residues, the biomass because it has a high lipid value can be used in animal feed, thus reducing production costs.

Key words: bioconversion, yeast, unconventional food, fatty acids.

1 INTRODUÇÃO

A geração de resíduos e subprodutos é inerente ao processo de beneficiamento de qualquer setor produtivo principalmente no que se refere ao processamento de frutas, vegetais e cereais. Com o aumento da conscientização ecológica, fica evidenciado um grande desafio para as próximas décadas que é equilibrar produção, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental. Devido a quantidade de nutrientes disponíveis nos resíduos

sólidos agroindustriais estes podem ser convertidos por micro-organismos e transformados em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários.

A bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos tem recebido atenção e com isso, se destaca o papel da fermentação no aproveitamento de resíduos sólidos visando à síntese de diversos compostos de alto valor agregado e de grande interesse industrial. O uso da fermentação para transformação dos resíduos possui vantagens como baixo o custo de processo, facilidade da aplicação de micro-organismos, melhora a digestibilidade, melhora o valor nutricional, possui fácil controle e não utiliza produtos químicos contaminantes.

Nos micro-organismos, os lipídios são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. Os lipídios microbianos denominados “Single-cell-oil” (SCO) têm sido considerados uma alternativa interessante, pois são similares em termos da composição em ácidos graxos aos óleos vegetais e animais e possuem a vantagem de serem produzidos a partir de substratos de baixo custo e podem ser utilizados como alternativa para a carência de alimentos ou para a produção de energia

Micro-organismos têm a habilidade de utilizar material orgânico com pouco valor nutricional e transformá-lo em alimento rico em nutrientes por meio da bioconversão. A levedura *Yarrowia lipolytica* é classificada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) e possui capacidade de utilizar diversos substratos, para a produção de biomassa microbiana, é capaz de produzir metabólitos importantes, além de possuir intensa atividade secretora, o que justifica o seu interesse industrial.

A fermentação utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como, agregar valor a matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico.

Com o objetivo de realizar o aproveitamento de resíduos agroindustriais e transformá-los em produto com valor agregado e de interesse industrial foram realizadas fermentações utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* QU69. A biomassa produzida foi avaliada quanto ao teor lipídico e ao perfil dos ácidos graxos produzidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau P.A. e utilizados sem purificação prévia. A cepa de *Yarrowia lipolytica* QU69, foi gentilmente cedida pela

professora Patrícia Valente (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UFRGS – Brasil – RS) e encontra-se depositada na coleção de culturas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a identificação UFMG-CM-Y336. As análises foram realizadas em triplicata e o resultado apresentado é a média aritmética entre os valores obtidos, juntamente com seu intervalo de confiança (IC) a 95%.

2.2. PREPARO DO INÓCULO E FERMENTAÇÃO

Para realizar o preparo do inóculo contendo as células da levedura, primeiramente foi preparado ágar GYP conforme descrito por Csutak *et al.* (2015) contendo glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e ágar 2%; a levedura foi isolada por esgotamento e incubada a 28 °C por 48 horas (estufa Ethik Technology, 4410-5NDRE). Após o período de incubação, algumas colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina e então realizada leitura da densidade óptica a 500 nm a fim de se obter absorvância de 0,104, que conforme estudo prévio (dados não publicados) corresponde ao tubo 0,5 da escala padrão de McFarland e 2×10^6 UFC/mL de células de *Y. lipolytica* QU69.

Foi utilizado meio de suplementação mineral descrito por Santos *et al.* (2013) com modificações, composto de 1% de nitrato de sódio (NaNO_3), 0,1% de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). As fermentações foram realizadas em banho com agitação tipo Dubnoff (Nova Instruments NI 1232) com agitação de 100 rpm, durante 9 dias e com temperatura de 30 °C.

Foram utilizados frascos erlenmeyer com capacidade de 125 mL, contendo 5% de resíduo agroindustrial como fonte de carbono e 50 mL do meio de suplementação, os frascos contendo o resíduo e o meio mineral foram autoclavados, adicionados de 1 mL da suspensão de células contendo 2×10^6 UFC/mL e incubados em banho com agitação de 100 rpm em temperaturas e tempos pré-determinados.

2.3. ESCOLHA E PREPARO DOS RESÍDUOS

Nos experimentos foram utilizados resíduos agroindustriais coletados em propriedades rurais próximas ao *campus* da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Laranjeiras do Sul - PR. Os resíduos foram previamente secos a 50 °C por 24 horas, triturados em moinho de rotor martelo (Fortinox STAR FT53) e peneirados em peneiras de 6-8 mesh, estocados em frascos de vidro com tampa em temperatura ambiente. Foram processados resíduos de caroço de abacate, caroço de algodão, cascas de banana, cascas de batata, cascas de batata doce, cascas

de laranja, cascas de mandioca, cascas de maracujá, caule de bananeira, sementes de aveia, sementes de milho e sementes e cascas de trigo.

2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Após o processo de bioconversão a biomassa obtida foi congelada e submetida ao processo de liofilização (Liotop L101). Foram realizadas análises de lipídios totais e análise cromatográfica dos ácidos graxos tanto no resíduo *in natura* quanto na biomassa liofilizada.

Determinação de lipídios (Bligh-Dyer): A análise do teor (%) de lipídios totais foi realizada através da metodologia descrita por Bligh-Dyer (1959) com modificações. Para a análise foram utilizados 2,0 g de amostra que foi adicionada de clorofórmio e álcool metílico e submetida a agitação durante trinta e cinco minutos em agitador magnético, após esse período foi adicionada solução de sulfato de sódio 1,5% para que ocorresse a separação das fases. Foram coletados 15 mL da fase inferior que foi adicionada em tubo de ensaio onde foi adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro para retirar os possíveis traços de água que poderiam estar presentes na amostra. Na última etapa foram coletados 5 mL da solução do tubo de ensaio e colocados em béquer previamente tarado, o solvente presente na amostra foi evaporado em temperatura ambiente e posteriormente o béquer foi pesado para se calcular o teor de lipídios da amostra através da diferença da massa do béquer.

Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM): Para a análise do perfil dos ácidos graxos por cromatografia, as amostras de lipídios foram submetidas ao processo de transesterificação e transformadas em ésteres metílicos conforme procedimento descrito na IUPAC (1987) e utilizado por Aued-Pimentel *et al.* (2005). Foram adicionados n-hexano e solução de KOH em metanol ao resíduo lipídico obtido na análise de Bligh-Dyer, realizada agitação e adicionada solução saturada de cloreto de sódio para separar as fases, coletada a fase orgânica e realizada diluição de 12,5 vezes com n-hexano para então realizar a injeção no cromatógrafo. A análise cromatográfica do perfil de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra acoplado a espectrômetro de massa GC-2010Plus. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida NST 5 ms de 30 m com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 µm. As condições de operação foram: temperatura programada da coluna: 110 °C (2 min), taxa de aquecimento 10 °C/min até 200 °C (10 min), 5 °C/min até 230 °C (20 min); temperatura do injetor 250 °C; temperatura do detector 200 °C; velocidade linear do gás de arraste (hélio) 40 cm/s. A corrida

com detector de massa foi realizada no modo “scan”, percorrendo massas de 35 a 500 m/z, energia de ionização de 70eV por impacto de elétrons.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados quanto a área de pico e identificados por similaridade utilizando como referência as bibliotecas NIST08, NIST08s e NIST11.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A biomassa produzida foi analisada quanto ao teor de lipídios e os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Resultados obtidos quanto ao teor lipídico da fonte de carbono *in natura* e da biomassa liofilizada acompanhados do incremento lipídico após o processo de bioconversão

Fonte de carbono	Lipídios na fonte de carbono* (%)	Lipídios na biomassa liofilizada* (%)	Variação lipídica (%)
Caroço de abacate	4,9 ± 1,1	4,3 ± 0,8	-12
Caroço de algodão	19,6 ± 1,5	8,8 ± 0,3	-55
Casca de banana	5,6 ± 0,7	5,4 ± 0,6	-4,28
Casca de batata	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	92
Casca de batata doce	2,5 ± 0,8	2,6 ± 0,6	1,57
Casca de laranja	4,0 ± 0,2	10,1 ± 0,9	158
Casca de mandioca	1,2 ± 0,4	9,4 ± 1,8	660
Casca de maracujá	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,0	-6
Caule de bananeira	2,6 ± 0,5	5,5 ± 0,5	110
Sementes de aveia	6,0 ± 0,3	8,4 ± 0,9	39
Sementes de milho	5,4 ± 1,6	4,2 ± 0,5	-22
Sementes e cascas de trigo	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,7	-8,70

*Os resultados apresentados correspondem a média aritmética ± o intervalo de confiança (IC) a 95%.

Analisando a tabela pode ser observado que fontes de carbono como caroço de algodão e abacate, casca de banana, casca de batata doce, casca de maracujá, sementes de milho e sementes e cascas de trigo, obtiveram resultados negativos quanto ao ganho lipídico indicando que não são fontes adequadas para bioconversão para produção de lipídios com *Y. lipolytica* QU69 nas condições aplicadas no experimento. Poli *et al.* (2014) e Christophe *et al.* (2012)

relatam que meios de suplementação onde é realizada a adição de nitrogênio favorecem a produção de proteínas, pois o nitrogênio estimula a reprodução celular enquanto que meios onde há deficiência de nitrogênio ocorre maior produção de lipídios, pois a levedura produz óleo no intuito de proteger e manter suas células ativas no meio deficiente.

As fontes de carbono que obtiveram resultados positivos quanto à produção de lipídios foram cascas de batata, cascas de laranja e o caule de bananeira. Estas fontes podem ser consideradas meios em que a levedura possuiu dificuldades em se adaptar e como consequência produziu óleo na tentativa de proteger as células e mantê-las ativas.

No caso da utilização das cascas de mandioca, esta foi fonte de carbono que obteve maior variação quanto ao teor de lipídios, que foi de 660% resultados positivos e expressivos considerando que o resíduo in natura das cascas de mandioca possuía $1,2\% \pm 0,4$ e após os nove dias da bioconversão a biomassa apresentou teor lipídico de $9,4\% \pm 1,8$. Adicionalmente as cascas de mandioca apresentavam alta solubilidade no meio de suplementação o que contribuiu para maior difusão entre meio de suplementação, fonte de carbono e células da levedura.

3.1 ANÁLISE DO PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS: DEPOIS DE REALIZADA A QUANTIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS PRODUZIDOS, ESTES FORAM ESTERIFICADOS, SEGUNDO METODOLOGIA DESCRITA PREVIAMENTE E ANALISADOS QUANTO AO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTE NAS AMOSTRAS.

Foram considerados apenas compostos com percentual de similaridade acima de 80%. Os resultados são descritos em ácidos graxos correspondentes aos ésteres metílicos identificados na análise e são expressos em porcentagem da área do pico em relação ao total de ésteres metílicos de ácidos graxos detectados na amostra.

Entre os ácidos graxos detectados, alguns possuíam área de pico inferior a 10%, entre eles estão ácido paulínico (C20:1 n-7) com variação da área de pico entre 4,3 e 7,1%, ácido palmitoleico (C16:1 n-7 *cis*) com área de 1,5 a 6,7%, ácido cáprico (C10:0t) que foi detectado apenas no resíduo e na biomassa resultante da fermentação com cascas de batata doce em contração de 6,5 e 3,4%, respectivamente. Já o ácido heneicosanóico (C21:0t) presente na biomassa resultante da fermentação com sementes de aveia com área de pico de 1,6% e ácido pentadecanoico (C15:0t) em concentrações que variaram de 1,1 a 9,2%.

Alguns ácidos graxos foram produzidos durante o processo de bioconversão, entre os quais os ácidos graxos de cadeia longa (entre 16 e 18 carbonos), foram encontrados em maior proporção o ácido palmítico (C16:0t) em concentrações que variaram de 25,4 a 53,1%, ácido heptadecanoico (C:17n-7t) encontrado apenas na biomassa resultante da bioconversão com cascas de banana em concentração de 13,9% , ácido eláídico (C18:1 n-9t) presente na maior parte das biomassas analisadas em concentrações que variaram de 11,1 até 47,2%, (apenas as biomassas produzidas com resíduos de caroço de abacate, cascas de banana e caule de bananeira não apresentaram este composto), ácido linoléico (C18:2 n-9,12cis) presente em todas as biomassas exceto no caule de bananeira em concentrações que variaram de 17,2 a 53,5%,.

Resultados semelhantes quanto ao perfil de ácidos graxos foram relatados por Mattanna et al. (2014) quando utilizaram 16 cepas de *Y. lipolytica* para produção de lipídios, no entanto foi relatado maior ganho lipídico em fermentação realizada em três dias

Quanto a biomassa produzida em fermentações utilizando caule de bananeira como fonte de carbono pode ser observado na Tabela 1 que foi obtido ganho lipídico de 110%, porém quando analisado o perfil dos ácidos graxos presentes na amostra não foi detectado nenhum ácido graxo, indicando que quando realizada análise de lipídios foram extraídos compostos lipofílicos que possuem afinidade com o solvente mas que, todavia não são ácidos graxos.

Durante as análises pode ser verificado que alguns ácidos graxos estavam presentes na fonte de carbono e foram consumidos pela levedura durante o processo de bioconversão. Zhu, Zong e Wu (2008) e Kitcha e Cheirsilp (2011) relataram uma diminuição do conteúdo lipídico após um longo período de cultivo, sugerindo que micro-organismos oleaginosos utilizam lipídios acumulados na proliferação celular após uma diminuição da glicose disponível durante a fase estacionária.

4 CONCLUSÃO

Através dos experimentos realizados pode ser concluído que a levedura *Y. lipolytica* QU69 possui potencial para utilização em processos de bioconversão. Os processos utilizados no decorrer do experimento não apresentaram alto custo de investimento e são processos verdes, isto é, não foram utilizados reagentes que possam agredir o meio ambiente ou expor o manipulador a riscos de contaminação.

Quanto às fontes de carbono de caroço de algodão e abacate, casca de banana, casca de batata doce, casca de maracujá, sementes de milho e sementes e cascas de trigo, o processo

realizado neste trabalho foi de nove dias e as células podem ter produzido maior quantidade e variedade de ácidos graxos com estas fontes de carbono, porém estes foram consumidos em função do longo tempo de fermentação, diante disso devem ser considerados novos estudos com variação do meio de suplementação, temperatura e agitação, buscando condições adequadas para que haja incremento lipídico.

A utilização de resíduos agroindustriais de cascas de batata, cascas de laranja, cascas de mandioca e sementes de aveia como fonte de carbono se mostrou viável e se apresenta como alternativa para agregar valor comercial a resíduos que quando descartados de maneira inadequada no meio ambiente podem acarretar problemas.

A levedura utilizada demonstrou eficiência no que se refere a produção de lipídios com diversas fontes de carbono e principalmente quando utilizado resíduos de casca de mandioca, a biomassa por possuir alto valor lipídico poderá ser utilizada na alimentação animal com isso diminuir custos de produção.

REFERÊNCIAS

AUED-PIMENTEL, S. *et al.* Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia gasosa. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 64(2):167-172, 2005.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem*, Ottawa, v. 27, n. 8, p. 911-917, 1959.

CHRISTOPHE, G. *et al.* Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food. *Braz. arch. biol. technol.*, [s.l.], v. 55, n. 1, p.29-46, fev. 2012. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132012000100004>.

CSUTAK, O. *et al.* Biotechnological Applications of *Yarrowia lipolytica* CMGB32. *Agric. Agric. Sci. Procedia*, [s.l.], v. 6, p.545-553, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.083>.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Standard

Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives. Blackwell Scientific Publications, 7th Edition; Method 2.301; *Report of IUPAC Working Group WG 2/87*; 1987.

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *Energy Procedia*, [s.l.], v. 9, p.274-282, 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2011.09.029>.

MATTANNA, P. *et al.* Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. *Revista Brasileira de Biociências: Braz. J. Bio.*, Porto Alegre, v.12, n 2 p.121-126, abr./jun. 2014.

POLI, J. S. *et al.* Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* [s.l.], v. 161, p.320-326, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.083>.

SANTOS *et al.* Detecção de lipase por cepa de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*. In: CONICBIO / CONBIO / SIMCBIO, 2013, Recife - PE. Resumos Expandidos. Recife, v. 2, p. 1 – 11, 2013

ZHU, L.Y.; ZONG, M.H.; WU, H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresour. Technol.*, [s.l.], v. 99, n. 16, p.7881-7885, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.033>.