

KEYLA CRISTINA FRANCISCO COTRIM

**VIABILIDADE DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Papiliotrema laurentii* UFV-1
EM SORO DE RICOTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Wendel Batista da Silveira

Coorientadores: Antônio G. do Nascimento
José Ivo Ribeiro Júnior
Rafaela Zandonade Ventorim

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C845v
2021 Cotrim, Keyla Cristina Francisco, 1982-
Viabilidade da produção de lipídios por *Papiliotrema
laurentii* UFV-1 em soro de ricota / Keyla Cristina Francisco
Cotrim. – Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (69 f.): il.

Inclui anexos.

Orientador: Wendel Batista da Silveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2021.

Referências bibliográficas: f. 55-62.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.523>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soro de leite. 2. Ricota. 3. Biodiesel. 4. Leveduras .
I. Silveira, Wendel Batista da, 1979-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 637.3

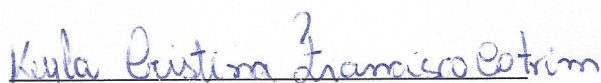
KEYLA CRISTINA FRANCISCO COTRIM


VIABILIDADE DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Papiliotrema laurentii* UFV-1
EM SORO DE RICOTA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de outubro de 2021.

Assentimento:


Keyla Cristina Francisco Cotrim
Autora


Wendel Batista da Silveira
Orientador

AGRADECIMENTOS

“Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas. A ele, pois, a glória eternamente. Amém!” (Carta do Apóstolo Paulo aos Romanos, Capítulo 11, Versículo 36)

A Deus pai, Santo e Criador, a Jesus Cristo, Autor e Consumador da minha fé, ao Espírito Santo, Consolador, pelo amor e pelas muitas bênçãos. *“Porque Deus amou o mundo de tal maneira que deu o seu Filho unigênito, para que todo o que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna.”* (Evangelho de Jesus Cristo Segundo o Apóstolo João, Capítulo 3, Versículo 16)

Ao meu querido pai, Geraldo, que me ensinou que na simplicidade e generosidade se forma um grande ser humano. Que o caráter se constrói na resiliência das provações e que sempre haverá dias difíceis nos quais o melhor é trabalhar ainda mais, enquanto houver fôlego, permanecer firme.

A minha querida, mãe, *In Memoriam* (1962-2018), Cristina, pelo incentivo ao estudo, pelas orações, pelas ligações intermináveis, pelos sorrisos mais lindos que deixava meu dia mais feliz. Sinto a falta de tudo isso, sinto a sua falta, mãe. Saudades.

Aos meus irmãos Joelton e Kelly pelas palavras de encorajamento naqueles dias que me encontrei desesperançosa que foram imprescindíveis para continuar a realização deste trabalho. “Força! Siga em frente!”

Ao meu irmão Batista, *In Memoriam* (1986-2018), por me ensinar que a verdadeira força vem do coração. Saudades, Ba.

Ao meu amado esposo, Weskley, por permanecer ao meu lado, me motivando a conquistar lugares que jamais pensaria almejar, por acreditar em meu potencial e me dizer sempre o quanto sou amada. Sem você eu não teria chegado tão longe. *“Deus mudou o teu caminho até juntares com o meu e guardou a tua vida separando-a para mim. Para onde fores, irei; onde tu repouares, repousarei. Teu Deus será o meu Deus. Teu caminho o meu será.”* Rute 1:16-18

Aos meus amados filhos, Maria Eduarda, Amanda e Henrique, por me ensinarem que *“Herança do Senhor são os filhos; o fruto do ventre, seu galardão. Como flechas nas mãos do guerreiro, assim os filhos da mocidade. Feliz o homem*

que enche deles a sua aljava; não será envergonhado, quando pleitear com os inimigos à porta.” (Salmos, Capítulo 127, Versículos 3 a 5)

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao professor Wendel Batista da Silveira, pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos professores, membros da minha comissão orientadora, Antônio Galvão do Nascimento, José Ivo Ribeiro Júnior e Rafaela Zandonade Ventorim pelo auxílio, atenção, avaliação crítica e valiosas sugestões, sempre oportunas.

Ao professor Raphael, da banca de defesa pelas valiosas contribuições e por tornar este trabalho mais lapidado e valoroso.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos, sugestões, críticas e apoio.

Aos amigos e irmãos da Segunda Igreja Batista em Viçosa, pelos bons momentos compartilhados juntos, pois *“Oh! Como é bom e agradável viverem unidos os irmãos!”* (Livro dos Salmos, Capítulo 133, Versículo 1)

Ao pastor, teólogo, mestre e amigo Luciano, e sua esposa Juliane, pela paciência e disposição para ensinar e cuidar, pois *“...ele mesmo concedeu uns para apóstolos, outros para profetas, outros para evangelistas e outros para pastores e mestres, com vistas ao aperfeiçoamento dos santos para desempenho do seu serviço, para edificação do corpo de Cristo, até que todos cheguemos à unidade da fé e do pleno conhecimento do Filho de Deus, à estatura da plenitude de Cristo...”* (Carta do Apóstolo Paulo aos Efésios, Capítulo 4, Versículos 11 a 13)

Aos colegas de laboratório, Pâmela, Ana, Eduardo, Maurício, Nívea pela constante ajuda e agradável convivência.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

No dia seguinte, viu João a Jesus, que vinha para ele, e disse: Eis o Cordeiro de Deus, que tira o pecado do mundo!”(Evangelho de Jesus Cristo Segundo o Apóstolo João, Capítulo 1, Versículo 29)

“Tende em vós o mesmo sentimento que houve também em Cristo Jesus, pois ele, subsistindo em forma de Deus, não julgou como usurpação o ser igual a Deus; antes, a si mesmo se esvaziou, assumindo a forma de servo, tornando-se em semelhança de homens; e, reconhecido em figura humana, a si mesmo se humilhou, tornando-se obediente até à morte e morte de cruz. Pelo que também Deus o exaltou sobremaneira e lhe deu o nome que está acima de todo nome, para que ao nome de Jesus se dobre todo joelho, nos céus, na terra e debaixo da terra, e toda língua confesse que Jesus Cristo é Senhor, para glória de Deus Pai.” (Carta do Apóstolo Paulo aos Filipenses, Capítulo 2, Versículos 5 a 11).

BIOGRAFIA

KEYLA CRISTINA FRANCISCO COTRIM, filha de Geraldo dos Santos Francisco e Cristina Aparecida dos Santos (*In Memoriam*), nasceu em Ubá, Estado de Minas Gerais, em 02 de abril de 1982. Em agosto de 2003, ingressou no Instituto Federal de Rio Pomba no curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios. Em março de 2005 transferiu-se para o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, vindo a concluí-lo em Agosto de 2008. Em Julho de 2010 iniciou a carreira de professor do magistério superior nas Faculdades Associadas de Uberaba – FAZU, na cidade de Uberaba, MG, onde permaneceu até agosto de 2012. Em março de 2019 iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa – UFV, submetendo-se à defesa pública da dissertação no dia 25 de outubro de 2021.

RESUMO

COTRIM, Keyla Cristina Francisco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2021. **Viabilidade da produção de lipídios por *Papiliotrema laurentii* UFV-1 em soro de ricota.** Orientador: Wendel Batista da Silveira. Coorientadores: Antônio Galvão do Nascimento, José Ivo Ribeiro Júnior e Rafaela Zandonade Ventorim.

O soro de ricota é um resíduo da indústria de laticínios geralmente descartado no ambiente sem tratamento. A sua utilização como meio de fermentação para a produção de lipídios por leveduras oleaginosas é considerada uma alternativa promissora para o seu aproveitamento. Os lipídios microbianos podem ser utilizados como fontes alternativas aos óleos vegetais para produção de oleoquímicos e biocombustíveis derivados de ácidos graxos, como, por exemplo, o biodiesel. Atualmente, os óleos comestíveis são utilizados como fontes de triacilgliceróis para a produção de biodiesel, mas, a produção desses óleos compete com produção de alimentos por terras agricultáveis e recursos hídricos. Neste contexto, a levedura *Papiliotrema laurentii* pode ser utilizada como uma fonte de lipídios, pois, além de acumular mais de 20% da sua massa seca na forma de lipídios, assimila a lactose do soro de ricota como fonte de carbono e energia. Portanto, este trabalho avaliou o efeito dos fatores biomassa inicial, pH e razão Volume do meio/Volume do frasco (VM/F) sobre a produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota. O delineamento experimental utilizado foi o Fatorial 2^3+1 sob o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 8 combinações entre os fatores estudados e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, para avaliar seus efeitos sobre o teor lipídico (%) utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM). Os maiores valores de teor de lipídios, produção de lipídios e formação de biomassa, os quais correspondem a 46,0 %, 9,3 g.L⁻¹ e 20,1 g.L⁻¹, respectivamente, foram obtidos na seguinte condição: pH inicial igual a 5, biomassa inicial, representada pela densidade óptica de células igual a 1, e a razão VM/F 50/500 (0,1). Na condição de cultivo que favoreceu o acúmulo de lipídios por *P. laurentii* UFV-1, os ácidos graxos mais abundantes foram os C16 (31,4 %) e os C18 (67,2 %), os quais são os mais importantes para a qualidade do biodiesel. A qualidade do biodiesel produzido com esse óleo microbiano atende as normas europeias (EN 14214), americanas (ASTM D 6751) e brasileiras (RANP 45) de qualidade, com

valores de Índice de Iodo (IV) de 67,9, Número de Cetanos (CN) 59,6, Maior Valor de Aquecimento (HHV) 39,4 MJ/kg, Viscosidade Cinemática 3,9 mm²/s, Ponto de Nuvem 9,9 °C e Densidade 0,87 g/cm³.

Palavras-chave: Biodiesel. Lactose. Soro de ricota. Leveduras oleaginosas. Teor de lipídios.

ABSTRACT

COTRIM, Keyla Cristina Francisco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2021. **Feasibility of lipid production by *Papiliotrema laurentii* UFV-1 from ricotta whey.** Adviser: Wendel Batista da Silveira. Co-Advisers: Antônio Galvão do Nascimento, José Ivo Ribeiro Júnior and Rafaela Zandonade Ventorim.

The ricotta whey is a dairy waste usually disposal in the environment without treatment. Its use as fermentation medium for lipid production by oleaginous yeasts is considered a promising alternative for its utilization. Microbial lipids can be used as alternative feedstocks to vegetable oils for the production of oleochemicals and fatty-acid derived biofuels, such as biodiesel. Currently, edible oils are used as a source of triacylglycerols for the production of biodiesel, but their production competes with food production for arable land and water resources. In this context, the yeast *Papiliotrema laurentii* can be used as lipid source due to its capacity of accumulating more than 20% of its dry mass in the form of lipids and assimilating lactose from ricotta whey as carbon and energy source. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of initial biomass, pH and culture medium to flask ratio (VM/F) on lipid production by *P. laurentii* UFV-1 from ricotta whey. The experimental design used was the 2^3+1 Factorial design under the Completely Randomized Design (CRD), with 8 combinations among the studied factors and three repetitions in the central point, totaling 11 assays, to evaluate their effects on lipid content (%) using Response Surface Methodology (RSM). The highest values of lipid content, lipid production and biomass formation, corresponding to 46.0 %, 9.3 g.L⁻¹ and 20.1 g.L⁻¹, respectively, were obtained under the following condition: initial pH equal to 5, initial biomass, represented by the optical density of cells equal to 1, and the VM/F ratio 50/500 (0.1). In the cultivation condition that favored the lipid accumulation by *P. laurentii* UFV-1, the most abundant fatty acids were C16 (31.4 %) and C18 (67.2 %), which are the most important for biodiesel quality. The quality of biodiesel produced with this microbial oil meets the European (EN 14214), American (ASTM D 6751) and Brazilian (RANP 45) quality standards, with Iodine Value (IV) of 67.9, Cetane Number (CN) 59.6, High Heat Value (HHV) 39.4 MJ/kg, Kinematic Viscosity 3.9 mm²/s, Cloud Point 9.9 °C and Density 0.87 g/cm³.

Keywords: Biodiesel. Lactose. Ricotta whey. Oleaginous yeast. Lipid content.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA.....	15
2.1	Biodiesel.....	15
2.2	Microrganismos oleaginosos.....	16
2.3	Fenótipo oleaginoso em leveduras.....	19
2.4	Diversidade de habitat e versatilidade da <i>Papiliotrema laurentii</i>	20
2.5	Fatores que afetam o acúmulo de lipídios.....	22
2.6	Soro de ricota.....	23
2.7	Metabolismo de lactose em leveduras.....	24
3	HIPÓTESE.....	26
4	OBJETIVO GERAL.....	27
4.1	Objetivos Específicos.....	27
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1	Microrganismo e manutenção.....	28
5.2	Inóculo.....	28
5.3	Meio de Cultivo.....	28
5.4	Esterilização do soro de ricota.....	28
5.5	Análises físico-químicas do soro de ricota.....	29
5.5.1	Determinação do pH.....	29
5.5.2	Determinação de Nitrogênio Total.....	29
5.6	Condições de cultivo da levedura <i>P. laurentii</i> UFV-1 em soro de ricota.....	29
5.7	Crescimento da levedura <i>Papiliotrema laurentii</i> UFV-1.....	30
5.8	Delineamento experimental.....	30
5.9	Parâmetros Fermentativos.....	32
5.10	Procedimentos analíticos.....	32

5.10.1	Consumo de lactose	32
5.10.2	Extração e quantificação de lipídios.....	33
5.10.3	Perfil de ácidos graxos.....	33
5.10.4	Predição das propriedades do Biodiesel.....	33
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1	Determinação da razão C/N do soro de ricota.....	35
6.2	Avaliação do crescimento e produção de lipídios por <i>P. laurentii</i> UFV-1 em soro de ricota	36
6.3	Acúmulo de lipídios em <i>P. laurentii</i> UFV-1 cultivada em soro de ricota.....	38
6.4	Produção de biomassa	40
6.5	Produção de lipídios	41
6.6	Consumo de lactose	43
6.7	Rendimento de lipídios por substrato	43
6.8	Rendimento de lipídios por massa celular	44
6.9	Produtividade volumétrica de lipídios	45
6.10	Perfil de ácidos graxos de <i>P. laurentii</i> UFV-1 e as propriedades do biodiesel..	50
7	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	64

1 INTRODUÇÃO

A utilização de combustíveis fósseis como fonte de energia contribui para a crescente emissão de gases do efeito estufa. Assim, a utilização de fontes alternativas de energia, como os biocombustíveis, é de grande interesse para mitigar os impactos ambientais causados pela emissão desses gases (DUGAR; STEPHANOPOULOS, 2011). Dentre os biocombustíveis, o biodiesel tem se destacado como alternativa ao diesel fóssil por ser renovável, biodegradável, menos tóxico e de menor potencial poluidor (MAZA et al., 2020). Esse biocombustível é produzido a partir de uma fonte lipídica pela reação de transesterificação com um álcool na presença de um catalisador. Tradicionalmente, são utilizados lipídios de origem vegetal, especialmente de fontes comestíveis, tais como soja ou palma para a produção do biodiesel. Entretanto, a utilização de óleos vegetais apresenta alguns inconvenientes, tais como a competição por terras aráveis e fontes hídricas, os quais poderiam ser destinados para a produção de alimentos (AROUS et al., 2017).

Nesse contexto, os lipídios extraídos de microrganismos oleaginosos têm sido considerados uma fonte promissora de óleo para a produção do biodiesel, o chamado biodiesel de terceira geração (GÁLVEZ-LÓPEZ et al., 2019). Esses microrganismos têm a capacidade de acumular pelo menos 20% (m/m) de sua massa seca na forma de lipídios (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2010). Dependendo das condições de cultivo tais como pH, temperatura, aeração e as razões carbono/nitrogênio (C/N), o teor de lipídios pode atingir valores próximos a 70% (m/m) (LI; DU; LIU, 2008).

Dentre os microrganismos oleaginosos, as leveduras se destacam quanto às altas taxas de crescimento e acúmulo de lipídios, facilidade para o escalonamento de bioprocessos, maior controle do cultivo em biorreatores e emprego de estratégias de engenharia metabólica para construção de linhagens com maior produção de lipídios (CAROTA et al., 2017; MORALES; HÉLIAS; BERNARD, 2019). Além disso, o perfil de ácidos graxos dos óleos produzidos por esses microrganismos é, quimicamente, semelhante ao encontrado no óleo de soja e em outras plantas utilizadas na produção de biodiesel (TANIMURA et al., 2015).

Algumas leveduras oleaginosas, tais como *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis* e *Lipomyces starkeyi* são reconhecidas pela grande capacidade de acúmulo de lipídios em condições

limitantes de nitrogênio e excesso de carbono (BATI; HAMMOND; GLATZ, 1984). Recentemente, foi isolada uma nova linhagem da levedura oleaginosa *Papiliotrema laurentii*, referida como *P. laurentii* UFV-1, capaz de acumular lipídios em meios de cultivo contendo xilose e glicose como fontes de carbono sob restrição de nitrogênio (VIEIRA et al., 2020b). *P. laurentii* também é reconhecida por sua capacidade de assimilar lactose como fonte de carbono e energia (CAROTA et al., 2017). Essa característica abre perspectiva para se avaliar a produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 a partir do cultivo em soro de ricota.

O soro de ricota é um efluente da indústria de laticínios constituído por lactose, traços de proteínas, gorduras e sais minerais. Devido a sua composição, o soro de ricota apresenta alto potencial poluidor, portanto, este efluente deve ser tratado antes do seu descarte no ambiente (GAJO et al., 2016; SANSONETTI et al., 2010). A sua utilização como meio de fermentação para a produção de lipídios representa uma alternativa promissora que alia o seu aproveitamento à geração de um produto biotecnológico. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi aumentar a produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 a partir de soro de ricota.

2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

2.1 Biodiesel

Biocombustíveis são produzidos a partir de biomassas, isto é, matérias-primas orgânicas renováveis e, portanto, são uma alternativa sustentável aos combustíveis fósseis. O biodiesel, segundo biocombustível líquido renovável mais comercializado no Brasil, pode ser utilizado como substituto ao diesel, pois estes combustíveis apresentam composição química semelhante. Contudo, a utilização de biodiesel causa menos danos ao ambiente, pois além de ser biodegradável, a emissão de compostos poluentes proveniente da sua combustão é menor comparado à combustão do diesel (CASPETA; NIELSEN, 2013; ELRAYIES, 2018).

O biodiesel é produzido a partir da reação de transesterificação, na qual três moléculas de alcoóis de cadeias curtas (metanol ou etanol) reagem com uma molécula de triacilglicerol na presença de um catalisador ácido, básico ou enzimático. Esta reação leva à formação de ésteres alquílicos e glicerol (principal subproduto da produção de biodiesel) (MA et al., 2018). A utilização do metanol na reação de transesterificação leva à formação de um éster metílico de ácido graxo (FAME), enquanto o uso do etanol na reação de transesterificação permite a obtenção de um éster etílico de ácido graxo (FAEE) (BUIJS; SIEWERS; NIELSEN, 2013).

O biodiesel de primeira geração é produzido a partir de óleos vegetais comestíveis, tais como soja, colza, palma, girassol e canola. Por outro lado, o de segunda geração é produzido a partir de óleos não comestíveis, principalmente pinhão manso (*Jatropha curcas*) ou gorduras animais. O biodiesel de terceira geração utiliza óleo de origem microbiana como matéria-prima para sua produção (BEOPOULOS et al., 2009).

No Brasil, desde 2008, tornou-se obrigatória a adição de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo, valor este que aumentou ao longo dos anos. Dados da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2020), mostraram que a produção de biodiesel no ano de 2020 foi de 6,4 bilhões de litros, principalmente em decorrência do aumento da adição do biodiesel ao diesel convencional que foi de 12 % no ano de 2020, conforme a Lei nº 13.263/2016.

No Brasil, a produção de biodiesel ocorre majoritariamente a partir do óleo de soja (ANP, 2020). Contudo, a utilização deste óleo afeta sua disponibilidade para o consumo de animais e humanos (AROUS et al., 2017). Além disso, o aumento do consumo deste óleo destinado à produção de biodiesel requer grandes áreas de plantio, o que favorece a competição por terras aráveis e recursos hídricos, como também pode levar a um desbalanço econômico elevando os preços dos alimentos e contribuir para o desflorestamento de áreas ambientalmente protegidas (TANIMURA et al., 2015).

Neste contexto, é importante explorar outras fontes renováveis de lipídios, como, por exemplo, o óleo produzido por microrganismos oleaginosos, os quais produzem altos teores de lipídios quando cultivados em altas razões carbono/nitrogênio (C/N). Esse óleo pode ser extraído e utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel. É importante destacar que o perfil de ácidos graxos de leveduras é quimicamente semelhante ao do óleo vegetal (TANIMURA et al., 2015). Sendo assim, a utilização de óleo microbiano para a produção de biodiesel pode contribuir para a redução dos recursos destinados ao cultivo dos grãos oleaginosos e diminuição da competição entre a produção de alimentos e produção de biodiesel (AWAD et al., 2019; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

2.2 Microrganismos oleaginosos

Os microrganismos oleaginosos são capazes de acumular mais de 20% (m/m) de sua massa seca na forma de lipídios (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2010; SITEPU et al., 2014). Estes são acumulados no interior da célula microbiana em corpos lipídicos quando cultivados em meios de cultivo com alta razão C/N. Dependendo da condição de cultivo e da concentração molar de carbono e nitrogênio, alguns microrganismos atingem um teor de lipídios de aproximadamente 70 % (m/m) (BHATIA et al., 2019; GONG et al., 2015).

Como pode ser observado na Tabela 1, as bactérias, microalgas, leveduras e os fungos são capazes de acumular altos teores de lipídios (MENG et al., 2009). Dentre os microrganismos oleaginosos, as leveduras e microalgas têm sido utilizadas mais frequentemente do que os fungos filamentosos e as bactérias (OCHSENREITHER et al., 2016; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

Tabela 1- Teor lipídico (m/m) obtido por microalgas, bactérias, leveduras e fungos.

Microrganismos	Teor de óleo (%)	Microrganismos	Teor de óleo (%)
Microalgas		Leveduras	
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45–47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	50–77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Bactérias		Fungos	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27–38	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Rhodococcus opacus</i>	24–25	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18–24	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40	<i>Mortierella vinacea</i>	66

Fonte: Meng et al., 2009.

A utilização de bactérias oleaginosas apresenta como principal entrave o acúmulo de lipídios na membrana externa na forma de poli-hidroxialcanoatos (PHA), o que torna o processo de extração mais complexo (TANIMURA et al., 2015). Os fungos filamentosos, por sua vez, são comumente usados para produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de interesse médico e dietético como o ácido araquidônico (ARA), o ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentanóico (EPA) (SITEPU et al., 2014).

As microalgas têm sido bastante estudadas como fonte de óleo para a produção de biodiesel (CHISTI, 2007; ZHU et al., 2012). Porém, microalgas requerem grandes áreas para o seu cultivo, pois requerem uma fonte luminosa para o crescimento e são menos eficientes no que diz respeito à acumulação de lipídios do que outros microrganismos (Tabela 1). Além disso, o cultivo de microalgas é afetado pelas variações ambientais e contaminação por bactérias e protozoários (HUANG et al., 2017). Por outro lado, há um maior controle das condições de cultivo em fotobiorreatores (sistemas fechados). Contudo, a implementação desses

sistemas é mais onerosa (MA et al., 2018), e requer a remoção de gás oxigênio pois o seu acúmulo eleva a pressão no interior do tanque. Outro problema associado ao uso de microalgas é a presença de pigmentos que podem ser extraídos juntamente com os lipídios durante a extração, dificultando dessa forma sua quantificação (AMI et al., 2014).

As leveduras oleaginosas têm sido amplamente estudadas para a produção de ácidos graxos. As vantagens do emprego de leveduras frente às microalgas incluem o crescimento mais rápido, os altos rendimentos de biomassa obtidos, e menor susceptibilidade de contaminação do bioprocessamento com bactérias devido à maior tolerância de leveduras em cultivos realizados em valores baixos de pH (SITEPU et al., 2014). Outra característica importante é a capacidade que as leveduras apresentam de assimilar uma vasta gama de fontes de carbono e energia. Por exemplo, *Yarrowia lipolytica* cresce em meio de cultivo contendo melão de cana-de-açúcar (RAKICKA et al., 2015); *Lipomyces starkeyi*, *Cryptococcus curvatus* e *Papiliotrema laurentii* assimilam xilose, principal constituinte do hidrolisado obtido de biomassas lignocelulósicas (JUANSILFERO et al., 2018); *Rhodospiridium toruloides* assimila glicerol (co-produto da produção de biodiesel) (SAINI et al., 2020). *Papiliotrema laurentii* assimila também o açúcar lactose presente em soro de leite e soro de ricota, subprodutos da indústria de laticínios gerados durante a fabricação de queijos e ricota, respectivamente (CAROTA et al., 2017).

Outro aspecto vantajoso da utilização de óleo de leveduras para a fabricação de biodiesel está relacionado à semelhança do seu perfil de ácidos com o de óleos comestíveis. Assim, as propriedades do biodiesel produzido a partir de óleo de leveduras é similar ao fabricado com a utilização de óleos comestíveis (TANIMURA et al., 2015). Os ácidos graxos predominantes em leveduras são o ácido mirístico (C14:0), o ácido palmítico (C16:0), o ácido palmitoleico (C16:1), o ácido esteárico (C18:0), o ácido oleico (C18:1) e o ácido linoleico (C18:2). As composições ricas em ácido oleico (C18:1) são mais valorizadas porque melhoram as propriedades de qualidade do biodiesel (BEOPOULOS et al., 2009; SITEPU et al., 2014; TANIMURA et al., 2016).

2.3 Fenótipo oleaginoso em leveduras

Existem duas vias para o acúmulo de lipídios, a primeira em condições de excesso de carbono, geralmente sob a forma de açúcares, conhecidos como síntese *de novo* e, a segunda, sob condições de excesso de carbono sob a forma de substratos hidrofóbicos, chamada via de acúmulo *ex novo*. Nas duas vias, o acúmulo de lipídios ocorre em condições nas quais o nitrogênio é limitante (BEOPOULOS et al., 2009). Embora as duas vias possam ser utilizadas para produção de lipídios, a via de síntese *de novo* é a de maior interesse tendo em vista o tipo de substrato comumente utilizado no cultivo de microrganismos oleaginosos.

Sob limitação de nitrogênio, a adenosina monofosfato (AMP) é desaminada em inosina monofosfato (IMP) e amônio (NH_4^+), pela ação da enzima AMP desaminase. Com a diminuição da concentração intracelular de AMP, a isocitrato desidrogenase, enzima responsável pela transformação do isocitrato em α -cetoglutarato, tem sua atividade reduzida, uma vez que é ativada alostericamente por AMP. Assim, o isocitrato acumula no interior da mitocôndria e, como ele encontra-se em equilíbrio com o citrato, este também tem a sua concentração aumentada (BEOPOULOS et al., 2009; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). O citrato é transportado da mitocôndria para o citoplasma via transporte do citrato-malato, onde é clivado pela enzima ATP-citrato liase para formar oxaloacetato e acetil-CoA. A enzima citosólica acetil-CoA carboxilase biotina-dependente (Accase) é responsável pela reação de carboxilação da acetil-CoA a malonil-CoA na primeira etapa da síntese de ácidos graxos (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). A síntese lipídica requer grande quantidade de poder redutor (ADRIO, 2017). O NADPH necessário para a biossíntese de ácidos graxos em leveduras oleaginosas pode ser obtido de diferentes fontes, entre elas a reação catalisada pela glicose 6-P desidrogenase, uma enzima dependente do NADP^+ da fase oxidativa da via das pentoses fosfato. Alguns estudos apontaram que esta via é a principal fonte de NADPH para a síntese de lipídios em *Yarrowia lipolytica* (WASYLENKO; AHN; STEPHANOPOULOS, 2015). Em *Papiliotrema laurentii*, a via das pentoses fosfato parece ser também a principal fonte de NADPH, enquanto a reação catalisada pela enzima málica (ME) também contribui para o suprimento de poder redutor requerido na síntese de ácidos graxos (VIEIRA et al., 2020b). Em *Y. lipolytica*, a enzima málica NADP^+ -dependente está ausente (DULERMO et al., 2015).

2.4 Diversidade de habitat e versatilidade da *Papiliotrema laurentii*

A levedura *P. laurentii*, inicialmente denominada *Cryptococcus laurentii*, foi reclassificada de acordo com análises filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas da região espaçadora transcrita interna (ITS) do rDNA e dos domínios D1 / D2 do 28S rDNA (LIU et al., 2015). *P. laurentii* pertence ao filo Basidiomycota, apresenta forma esférica a oval e possui alto grau de heterogeneidade interespecies (LONDERO et al., 2019; SUGITA et al., 2000). A análise filogenética baseada na sequência ITS indica que *P. laurentii* UFV-1 está mais próxima evolutivamente de espécies Basidiomycota não oleaginosas como *Kwoniella mangroviensis* CBS 8507 e *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* CBS 8710 do que com outras leveduras também oleaginosas (VIEIRA et al., 2020b).

As linhagens de *P. laurentii* são encontradas em diversos ambientes, como águas residuais de indústria de queijos, frutas, solos rizosféricos, caules e flores (CAROTA et al., 2017; DEL V. LEGUINA et al., 2019; LONDERO et al., 2019; PIROZZI et al., 2013; VIEIRA et al., 2020a). Linhagens de *P. laurentii*, como a *P. laurentii* UFMG-HB-48 foram isoladas de madeira e bagaço de cana-de-açúcar em decomposição e apresentaram maior atividade extracelular de xilanase (LARA et al., 2014). A linhagem *P. laurentii* 5307AH isolada do interior de uma aeronave das Forças Aéreas Norte Americana apresentou capacidade de metabolizar poliésteres e poliuretanos de poliéster biodegradáveis, tanto na forma planctônica como sésil em biofilme (HUNG et al., 2019). A levedura *P. laurentii* é capaz de converter diferentes fontes de açúcares tais como D-xilose, L-arabinose, celobiose, lactose, frutose e ramnose em triacilgliceróis (CASTANHA et al., 2014; SITEPU et al., 2014). Essa capacidade de assimilar uma ampla gama de açúcares evidencia o potencial dessa levedura para a produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixo custo que têm em sua constituição os açúcares mencionados acima (AWAD et al., 2020).

Nos últimos anos, estudos sobre a capacidade da levedura *P. laurentii* acumular lipídios vêm aumentando (CAROTA et al., 2017; CASTANHA et al., 2014; GUERZONI et al., 1985; MA et al., 2018; SARKAR et al., 2018; SITEPU et al., 2014; VIEIRA et al., 2020a). O interesse em *P. laurentii* para a produção de triacilglicerol deve-se à aplicabilidade desse óleo microbiano nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosméticos e biocombustíveis como, por exemplo, para a produção de biodiesel.

Recentemente, a linhagem *Papiliotrema laurentii* UFV-1 foi isolada de uma amostra de solo rizosférico do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (Rio de Janeiro, Brasil) e selecionada devido à sua capacidade de acumular lipídios a partir do cultivo em meio contendo glicose e xilose, sob limitação de nitrogênio. O acúmulo de lipídios em *P. laurentii* UFV-1 começa durante a fase de desaceleração do crescimento, atingindo o teor máximo em 48h, o que é desejável para se alcançar uma alta produtividade volumétrica de lipídios em cultivos em batelada. Em condições otimizadas de cultivo na presença de xilose: inóculo inicial (Densidade óptica a 600 nm) = 0,8, pH = 7, agitação de 300 rpm e razão C/N de 100:1, essa levedura alcançou um alto teor de lipídios, isto é, 63% (m/m) (VIEIRA et al., 2020a).

Sob limitação de nitrogênio, a síntese de proteínas e ácidos nucleicos em *P. laurentii* UFV-1 é reduzida e o fluxo de carbono é direcionado para a síntese lipídica (VIEIRA et al., 2020a). O conteúdo máximo de lipídios alcançado por *P. laurentii* UFV-1 foi no período de 48 h de cultivo, entretanto, após 72h foi observada a diminuição desse conteúdo, provavelmente relacionada ao esgotamento das fontes de carbono e de nitrogênio. Sob esta condição de escassez nutricional, a degradação lipídica nessa levedura pode ter ocorrido por meio da β -oxidação visto que a expressão de genes envolvidos com esta via aumentou (KOHLWEIN, 2010).

A enzima ATP citrato-liase (ACL), característica de leveduras oleaginosas, é uma enzima-chave para a lipogênese. Ela tem como função catalítica a conversão do citrato citosólico em acetil-CoA e oxaloacetato. Em *P. laurentii* UFV-1, a expressão do gene que codifica a enzima ACL manteve-se inalterada ao longo de todo o cultivo (VIEIRA et al., 2020b). Diferentemente, em *Y. lipolytica* cultivada em meio contendo glicose como única fonte de carbono e energia, a expressão do gene *ACL1* apresenta-se mais elevada durante a fase de crescimento exponencial e diminui na fase de desaceleração do crescimento, quando se inicia o acúmulo de lipídios (FABISZEWSKA et al., 2019). Ao contrário do que ocorre em *P. laurentii* e *Y. lipolytica*, a expressão do gene *ACL1* em *Rhodotorula toruloides* é maior durante o acúmulo de lipídios (24 e 96 h) (ZHU et al., 2012). A acetil-CoA carboxilase (Accase) desempenha um papel importante no metabolismo dos lipídios, porque catalisa a primeira etapa limitante da síntese de ácidos graxos. A expressão do gene *ACC1*, que codifica a enzima Accase, em *P. laurentii* UFV-1 apresentou-se menor às 24 h de cultivo do que nas primeiras 6 h. Além disso, em *P. laurentii* UFV-1, o poder

reductor (NADPH) requerido para a biossíntese de ácidos graxos parece ser gerado principalmente a partir da via das Pentoses Fosfato (PPP), contudo, no período de acumulação de lipídios, há um aumento da expressão do gene que codifica a enzima málica, indicando que o NADPH, formado na reação catalisada por esta enzima, contribui para a formação de poder reductor (VIEIRA et al., 2020b). Além disso, a degradação das purinas nessa levedura é possivelmente associada com a reciclagem de nitrogênio levando à liberação de amônia.

2.5 Fatores que afetam o acúmulo de lipídios

Geralmente, a condição de limitação de nitrogênio é utilizada para estudar o acúmulo de lipídios em microrganismos oleaginosos. Durante a fase de crescimento o fluxo de carbono é distribuído para a síntese de carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. O nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, portanto, é requerido para o crescimento celular. Sob limitação de nitrogênio, a síntese de proteínas e ácidos nucleicos é reduzida rapidamente e a taxa de crescimento diminui. Com isso, o fluxo de carbono é direcionado para a síntese lipídica (BEOPOULOS et al., 2009). Sendo assim, o acúmulo de lipídios em leveduras é favorecido pelo aumento da razão carbono-nitrogênio (C/N) (GALAFASSI et al., 2012; SITEPU et al., 2014) sendo necessária uma relação C/N inicial superior a 20:1 para desencadear o processo de acumulação de lipídios (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2010).

Outro fator importante é a aeração, ou seja, a disponibilidade de oxigênio, a qual exerce grande influência em cultivos microbianos submersos. Um adequado dimensionamento da transferência de oxigênio é essencial em processos fermentativos que empregam microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos (SCHMIDT, 2005).

Uma maior disponibilidade de oxigênio durante o cultivo de duas diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, proporcionou uma maior produção de lipídios, acarretando também em um aumento da proporção de ácidos graxos insaturados em relação ao total de óleos produzidos (ZARA et al., 2008). Estes autores destacaram que o nível de oxigênio dissolvido influenciou a expressão de genes que codificam enzimas da biossíntese de lipídios, afetando o perfil de ácidos graxos da levedura.

O pH é um fator importante que afeta o crescimento microbiano e a formação de bioprodutos de interesse industrial. Dias et al. (2015), utilizaram duas estratégias de cultivo em batelada alimentada controlando dois valores de pH (4 e 5) para avaliar a produção de biomassa, lipídios e carotenóides por *R. toruloides* NCYC 921. Na primeira estratégia, pH 4, a produção de biomassa e carotenóides, bem como a produtividade lipídica foram 128,26 g; 0,18 mg.g⁻¹ e 0,31 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Porém, para o pH 5,0 foi observado uma lenta diminuição no crescimento quando comparado ao pH 4,0. A biomassa encontrada foi menor no pH 5,0 (127 g.L⁻¹), porém a produção de carotenóides foi maior (0,29 mg/g) no pH 5,0 quando comparada com o pH 4,0. Isso indica que o pH ótimo para o crescimento de *R. toruloides* NCYC 921 e para a produção de carotenóides são diferentes (DIAS et al., 2015).

A densidade inicial do inóculo está relacionada ao tempo de consumo da fonte de carbono e à produtividade do bioproduto de interesse. A maior densidade inicial do inóculo favorece o aumento da taxa de captação da fonte carbono e energia, o que contribui para a redução do tempo para atingir a produção máxima de lipídios (JUANSILFERO et al., 2018).

2.6 Soro de ricota

De acordo com as projeções realizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil produziu, em média nos últimos cinco anos, 780 mil toneladas de queijo, com geração no ano de 2019 de cerca de 571,5 mil toneladas de soro de leite. No Brasil, ao contrário do que ocorre em outros países, cerca de 50 % do soro produzido na fabricação de queijos não é aproveitado, sendo descartado sem tratamento ou utilizado para alimentação animal (GAJO et al., 2016). Industrialmente, o soro de queijo tem sido utilizado na produção de bebidas lácteas, concentrados proteicos ou ricota. A produção estimada de ricota para o ano de 2020 foi de 11,3 toneladas, com potencial de geração de 110,0 mil toneladas de soro de ricota (MAPA, 2020).

O soro de ricota resulta num efluente, o qual representa 95% do volume do soro de queijo utilizado para a elaboração da ricota. O soro de ricota é constituído por proteínas (0,15 % - 0,22 %), lactose (4,8 % - 5,0 %), sais (1,0 % - 1,3 %), gordura (0,20 %) e ácidos orgânicos (0,22 % - 0,25 %), apresentando grande

potencial poluidor devido à alta carga orgânica, com Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 80.000 mg.L⁻¹ e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de 50.000 mg.L⁻¹ (SANSONETTI et al., 2010). Portanto, o descarte de soro de ricota como efluente sem tratamento prévio leva à redução do oxigênio disponível para animais e plantas aquáticas, ocasionando danos ao ecossistema local (GAJO et al., 2016).

A composição físico-química do soro de ricota possibilita a sua utilização como ingrediente para o desenvolvimento de novos produtos, sendo uma solução viável para a diminuição do impacto ambiental e redução dos custos de tratamento dos efluentes de indústrias de laticínios (ZOTTA et al., 2020). Atualmente, o soro de ricota é destinado ao consumo suíno ou simplesmente descartado no ambiente (MAPA, 2020). Porém, a sociedade tem pressionado uma maior atuação dos órgãos ambientais para diminuir a poluição ocasionada pelo descarte desse resíduo nos rios (GAJO et al., 2016).

Apesar dos efluentes de laticínios apresentarem elevada biodegradabilidade, o tratamento biológico desses efluentes não é simples devido à elevada carga orgânica, altas variações nos fluxos e composições químicas das águas residuárias dos processos produtivos dos laticínios (ERGU et al., 2001). O alto custo de implantação e instalação de tratamentos biológicos para o soro de leite e soro de ricota destaca a importância de se encontrar alternativas viáveis para o seu aproveitamento (CAROTA et al., 2017; DAS et al., 2016; PIROZZI et al., 2013). Alguns estudos propõem o aproveitamento do soro de queijo para a produção do bioetanol por meio da fermentação com a levedura *Kluyveromyces marxianus* (BITELLO et al., 2012; DAS et al., 2016; SANSONETTI et al., 2009, 2010; SARACENO et al., 2011). Atualmente, poucos estudos propõem o aproveitamento do soro de ricota para a produção de lipídios por meio da fermentação por leveduras oleaginosas (CAROTA et al., 2017; PIROZZI et al., 2013). Um estudo com a levedura *P. laurentii* UCD 68-280 cultivada em soro de ricota foi capaz de produzir 5,06 g L⁻¹ de lipídios, alcançando um teor de lipídios de 70% (m/m) quando cultivada em biorreatores (CAROTA et al., 2017).

2.7 Metabolismo de lactose em leveduras

A lactose, principal componente do soro de ricota, é um dissacarídeo formado pela ligação β -1,4 entre os monossacarídeos glicose e galactose. A lactose pode ser

metabolizada por algumas espécies de leveduras que possuem a enzima β -galactosidase (ZOTTA et al., 2020). Em *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis*, o transporte desse dissacarídeo acontece pela proteína transportadora permease (Lac12p), codificada pelo gene *LAC12* induzido tanto por lactose como por galactose (PAIVA et al., 2019). A permease Lac12p é uma proteína de membrana integral e funciona por meio de um mecanismo de simporte de prótons. O sistema simporte transporta uma molécula em conjunto com outra substância, normalmente um próton (H^+) (SILVEIRA et al., 2019). Essa enzima transporta a lactose do meio para o citosol, onde este açúcar é hidrolisado na reação catalisada pela β -galactosidase, codificada pelo gene *LAC4*. Os genes *LAC12* e *LAC4* são específicos para o metabolismo da lactose e são co-regulados pelo mesmo promotor bidirecional (RUBIO-TEXEIRA, 2005). A glicose é metabolizada pela via glicolítica e a galactose pela via Leloir formando o intermediário glicose-6-fosfato. A primeira reação da via Leloir é catalisada pela galactocinase, Gal1p, na qual a galactose é fosforilada, gerando galactose-1-fosfato. Em seguida, a enzima uridino difosfoglicose-4 epimerase (Gal10p) catalisa a reação na qual ocorre a permuta da galactose com o grupo UDP-glicose, originando a UDP-galactose. A molécula UDP-galactose após mudanças estereoquímicas gera um novo UDP-glicose. Logo após essa mudança, a enzima galactose-1 fosfato uridiltransferase (Gal7p), utiliza a glicose liberada na segunda reação para transformar a galactose-1-fosfato em glicose-1-fosfato. Essa molécula, intermediária da via Leloir, é catabolizada pela enzima fosfoglicomutase (Gal5p) em glicose-6-fosfato (DINIZ, 2009).

3 HIPÓTESE

A produção de lipídios por *Papiliotrema laurentii* UFV-1 em soro de ricota é influenciada pelos níveis, combinados ou não entre si, dos seguintes fatores: pH, razão volume do soro/volume frasco de Erlenmeyer (VM/F) e biomassa inicial das células.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota como meio de cultivo, em diferentes condições de pH, VM/F e concentração inicial do inóculo.

4.1 Objetivos Específicos

- Determinar a razão carbono:nitrogênio do soro de ricota;
- Identificar os fatores que afetam significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros de produção de lipídios por *Papiliotrema laurentii* UFV-1 em soro de ricota como meio de cultivo;
- Avaliar o perfil de ácidos graxos de *P. laurentii* UFV-1 na melhor condição de produção de lipídios em soro de ricota;
- Predizer as propriedades do biodiesel (índice de iodo, índice de cetano, viscosidade cinemática, densidade e ponto de nuvem) a partir do óleo de *P. laurentii* UFV-1.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Microrganismo e manutenção

A levedura *Papiliotrema laurentii* UFV-1, pertencente à Coleção de Culturas de Leveduras do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da Universidade Federal de Viçosa, foi utilizada neste trabalho. Esta levedura foi isolada de amostra de solo coletada no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (S 22° 27' 33,1", W 43° 01' 40"). A cultura está mantida em meio YP contendo 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Himedia), 20 g.L⁻¹ de peptona bacteriológica (Himedia) com glicerol 50 % (Vetec) e congelada a -80 °C.

5.2 Inóculo

Para produção do inóculo, uma alíquota de 1 mL da cultura estocada a -80 °C foi transferida para 100 mL do meio de cultivo YP contendo 2% de lactose [m/v (YPL)] em frascos Erlenmeyer de 500 mL. As culturas foram incubadas em um incubador rotatório (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, 25D), sob agitação de 250 rpm a 30 °C por aproximadamente 18 horas. Após esse tempo, a cultura foi centrifugada a 3000 × g por 5 minutos a 4 °C. O sedimento de célula foi lavado duas vezes com água peptonada 0,1% (m/v) e transferido para um novo meio de cultivo. O inóculo inicial foi ajustado para os valores de densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) definidos no delineamento experimental.

5.3 Meio de Cultivo

O soro de ricota, empregado como meio de cultivo neste trabalho, foi gentilmente fornecido pelo Laticínio Sérvulo, Senador Firmino, Minas Gerais e encontra-se congelado a -20 °C no Laboratório de Fisiologia dos Microrganismos da Universidade Federal de Viçosa.

5.4 Esterilização do soro de ricota

O soro de ricota (SR) foi descongelado sob refrigeração a 4 °C e, em seguida, aquecido a 65 °C por 7 min em béquer de vidro sob agitação no agitador magnético (modelo 601.0122.60F60, INTLLAB). Posteriormente, o SR foi centrifugado a 10.000 × g por 5 minutos a 20 °C (Sorval RC5C, Marshall Scientific, Hampton, New

Hampshire, USA), e o sobrenadante foi esterilizado em membrana filtrante de 0,22 µm (Merck Milipore Co. GER), com o auxílio de uma bomba de vácuo (modelo 131 tipo 2 VC, Primatec).

5.5 Análises físico-químicas do soro de ricota

As análises físico-químicas foram realizadas no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (DTA-UFV). Para determinar a razão C/N do soro de ricota, o teor de nitrogênio total e a concentração de lactose, mensurada conforme descrito no item 5.10.1, foram empregados no cálculo descrito abaixo (item 5.5.3).

5.5.1 Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado em equipamento digital (Marca Kasvi, Modelo K39-1410A e Eletrodo Modelo K38-1301A).

5.5.2 Determinação de Nitrogênio Total

O teor de nitrogênio % (m/v) total da amostra foi realizado pelo método Kjeldahl (IAL, 2008), utilizando-se o fator de correção 6,38 para determinação de seu conteúdo proteico.

5.5.3 Determinação do cálculo de C/N

A razão carbono:nitrogênio foi calculada com base na equação 1.

$$C/N = ((\% \text{ lactose} \times \text{MM do C}) / \text{MM lactose}) / N, \text{ (Eq. 1)}$$

onde:

C/N: razão carbono/nitrogênio

% lactose = 4,6%

MM carbono (lactose) = (12x12) = 144

MM lactose = 342,3

N: Nitrogênio Total

5.6 Condições de cultivo da levedura *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota

Para avaliar o acúmulo lipídico, a levedura *P. laurentii* UFV-1 foi cultivada em soro de ricota estéril, com pH tamponado pela adição de ácido cítrico e fosfato de sódio (pH 5, 6 e 7), em frascos Erlenmeyer de 500 mL. Em cada frasco foram adicionados diferentes volumes de soro de ricota (50 mL; 100 mL e 150 mL), conforme a Tabela 3. As culturas foram incubadas em um agitador orbital (New

Brunswick, Edison, Nova Jersey, USA) a 30 °C, sob agitação de 250 rpm. O soro de ricota, previamente filtrado e esterilizado, foi tamponado em pH 5, 6 ou 7, pela adição direta de sais de fosfato de sódio e ácido cítrico, com base no método de Clark (1920), ajustado conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Massa de ácido cítrico e fosfato de sódio adicionados em 20 mL de soro de ricota para tamponamento nos valores de pH desejados.

pH desejado	Na ₂ HPO ₄ (mg)	Ác.Cítrico (mg)
7,0	448,04	88,89
5,0	388,94	132,72
6,0	439,68	95,09

5.7 Crescimento da levedura *Papiliotrema laurentii* UFV-1

A densidade celular foi medida em espectrofotômetro (BECKMAN DU series 600, Indianapolis, USA) a 600 nm (DO₆₀₀). A biomassa celular (g.L⁻¹) foi obtida mediante determinação da DO₆₀₀, em cada um dos tempos (0, 12, 24, 36 e 48 h) de cultivo e comparada com a curva padrão DO₆₀₀ x Massa Seca (g), previamente obtida. Para determinar a relação DO₆₀₀ x Massa Seca (g), amostras da levedura cultivada na fase exponencial de crescimento foram coletadas e centrifugadas a 3000 × g, por 5 min, a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuscitado em 6 mL de água destilada estéril. Após agitação, 1 mL da suspensão foi transferido, em quadruplicata, para cadinhos secos, previamente lavados e pesados. Em seguida, o material foi seco em estufa a 105 °C, até peso constante, para determinação da massa seca. Do material restante ressuscitado, 1 mL foi utilizado para produzir as diluições (10⁻¹, 10⁻², 2x10⁻², 3x10⁻², 4x10⁻², 5x10⁻² e 6x10⁻²) as quais foram utilizadas para determinação da DO₆₀₀. Em seguida, foi construída uma curva de calibração correlacionando a DO₆₀₀ com a massa seca em cada caso.

5.8 Delineamento experimental

Para determinar as importâncias relativas dos efeitos do pH, da biomassa inicial (DO₆₀₀) e da razão Volume do meio/Volume do frasco (VM/F) sobre o teor lipídico % (m/v) de *P. laurentii* UFV-1, foi realizado um experimento fatorial 2³ + 1

constituído de 11 ensaios correspondentes às combinações entre os níveis codificados -1 e +1 e com três repetições do ponto central (0), instalado sob o delineamento inteiramente casualizado (DIC) (Tabela 3).

Tabela 3. Níveis das variáveis independentes de acordo com o delineamento composto central rotacional.

Variável Independente	Variável Codificada		
	-1	0	+1
Aeração	0,1	0,2	0,3
pH	5,0	6,0	7,0
Biomassa inicial (DO ₆₀₀)	0,2	0,6	1,0

Durante a fase de escolha do melhor modelo, os efeitos não significativos foram retirados, um de cada vez, começando pelas interações duplas, de acordo com o teste t de Student a 5 % de significância. Para fatores do mesmo tipo, foi retirado, primeiro, o efeito não significativo com o maior p-valor. E com base no modelo ajustado, foi estimado o coeficiente de determinação e testada a falta de ajuste pelo teste F da análise de variância, também a 5 % de significância.

Desse modo, o ajuste do modelo com base nos níveis codificados dos três fatores estudados foi representado pelo modelo de primeira ordem. Entretanto, nos resultados, as variáveis respostas (teor de lipídios, biomassa, produção de lipídios, produtividade volumétrica de lipídios, consumo de lactose, rendimento de lipídios por substrato e rendimento de lipídios por massa celular) estão representadas nas equações com valores reais dos resultados, representado, de forma geral, por (equação 2):

$$y = \beta_0 + \beta_1 \text{DO}_{600} + \beta_2 \text{pH} + \beta_3 \text{VM/F} + \beta_4 \text{DO}_{600} \times \text{pH} + \beta_5 \text{DO}_{600} \times \text{VM/F} + \beta_6 \text{pH} \times \text{VM/F} + \varepsilon \text{ (Eq. 2), em que:}$$

y é valor observado do teor de lipídios % (m/m), da biomassa, produção de lipídios, produtividade volumétrica de lipídios, consumo de lactose, rendimento celular, rendimento de lipídios por substrato e rendimento de lipídios por massa de *P. laurentii* UFV-1;

β_0 é a constante da regressão;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6$ são os coeficientes de regressão;

a, b e c são os níveis codificados (-1, 0 e 1) da biomassa inicial (DO_{600}) (0,2; 0,6 e 1,0), do pH (5; 6 e 7) e da VM/F (0,1; 0,2 e 0,3) respectivamente; e $\varepsilon \sim N(0; \sigma^2)$.

5.9 Parâmetros Fermentativos

Os parâmetros de produção de lipídios foram calculados conforme as equações 3, 4, 5 e 6:

- Rendimento celular ($Y_{x/s}$) = (massa celular final – massa celular inicial em $g.L^{-1}$)/(concentração inicial de lactose – concentração final de lactose em $g.L^{-1}$) (Eq. 3).
- Rendimento de lipídios por substrato ($Y_{p/s}$) = (concentração final de lipídios – concentração inicial de lipídios $g.L^{-1}$)/(concentração inicial de lactose – concentração final de lactose em $g.L^{-1}$) (Eq. 4).
- Rendimento de lipídios por massa celular ($Y_{p/x}$) = (concentração final de lipídios – concentração inicial de lipídios $g.L^{-1}$)/(massa celular final – massa celular inicial em $g.L^{-1}$) (Eq. 5).
- Produtividade Volumétrica de lipídios (Q_p) = (concentração final de lipídios – concentração inicial de lipídios $g.L^{-1}$)/período em horas (Eq. 6).

5.10 Procedimentos analíticos

5.10.1 Consumo de lactose

A concentração de lactose foi mensurada por Cromatografia Líquido de Alta Eficiência (HPLC). O sobrenadante da cultura foi filtrado em membrana filtrante de $0.45 \mu m \times 0,13 mm$ ($0.45 \mu m \times 0,13 mm$, Merck Milipore Co. GER), antes de ser injetado no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) (CTO-20A, Shimadzu, Japão). O conteúdo de lactose presente no soro de ricota foi determinado por injeção de $10 \mu L$ de amostra em coluna de troca iônica Aminex HPX-87H ($300 \times 7.8 mm$, $9 \mu m$, Bio-Rad, Munich, Germany) com $5 mM H_2SO_4$ como eluente a $0.6 mL min^{-1}$, a $60^\circ C$, com detecção por índice de refração (RID-20A, Shimadzu, Japan). A quantificação deste açúcar foi realizada mediante calibração e verificação com padrões externos.

5.10.2 Extração e quantificação de lipídios

Após 48 h de cultivo, as células foram sedimentadas por centrifugação a $5000 \times g$, por 20 min, e liofilizadas durante 24 h. Cerca de 50 mg do sedimento celular foi utilizado para a extração e quantificação do teor de lipídios. A extração dos lipídios foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959), utilizando metanol e clorofórmio (2:1) como solventes orgânicos. Na última etapa do procedimento foi utilizada solução salina [NaCl 1% (m/v)] para melhorar a separação entre as fases aquosa e orgânica, a qual contém a fração lipídica. O teor de lipídios (TL) foi obtido conforme Equação 7:

$$TL(\%) = 100 \frac{P_f - P_i}{m} \quad (Eq. 7),$$

sendo P_f o peso final do ependorff contendo o lipídio extraído após evaporação do solvente a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, até peso constante, P_i o peso do ependorff vazio e m a biomassa utilizada.

5.10.3 Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos foi analisado por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, GC-FID 6890N, Agilent Technologies 7890A[®]. As amostras de *P. laurentii* UFV-1 foram sedimentadas por centrifugação a $12.000 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min, e o sedimento foi liofilizado. Os ácidos graxos nas células da levedura liofilizadas (4-5 mg de massa seca) foram saponificados, metilados, extraídos e identificados utilizando o sistema de identificação microbiana MIDI (Sherlock 6.0 microbial identification system) na Microbial ID, Inc. (Newark, DE).

5.10.4 Predição das propriedades do Biodiesel

Os valores dos parâmetros do biodiesel foram calculados com equações empíricas baseadas nos dados relativos à composição e ao teor de ácidos graxos individuais na biomassa de *P. laurentii* UFV-1. O valor do Índice de Iodo (IV) foi calculado a partir da Equação 8:

$$IV = \sum_i^n \left(254 \frac{Nw}{Mi} \right) \quad (Eq. 8),$$

onde N é o número de dupla ligação na molécula de ácido graxo, w_i (adimensional) é o conteúdo do ácido graxo individual na soma dos ácidos graxos totais, e M_i a massa molecular do ácido graxo (g/mol).

A viscosidade cinemática, n (mm²/s), foi determinada de acordo com a Equação 9:

$$n = \exp \exp \left(\sum_i^n w_i \ln(n_i) \right) \quad (\text{Eq. 9}),$$

onde $\ln(n_i) = -12.503 + 2.496 \ln(M_i) - 0.178N$.

O índice cetano (CN) foi calculado conforme Equação 10:

$$CN = \sum_i^n w_i \phi_i \quad (\text{Eq. 10}),$$

onde n é o número de cetano do FAME individual. O ϕ_i foi calculado a partir da fórmula $\phi_i = -7.8 + 0.302M_i - 20N$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Determinação da razão C/N do soro de ricota

As concentrações de lactose, nitrogênio e proteínas foram determinadas no intuito de estimar a razão C/N do soro de ricota (Tabela 4). Esta razão é um parâmetro importante que influencia o acúmulo de lipídios por leveduras oleaginosas (GALAFASSI et al., 2012; SITEPU et al., 2014). Em microrganismos oleaginosos, a razão C/N inicial superior a 20 é requerida para o favorecimento da síntese *de novo* de lipídios (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

Tabela 4. Concentrações de lactose, nitrogênio e proteínas do soro de ricota.

Componente	Concentração (%)
Lactose	4,60
Nitrogênio	0,023
Proteínas	0,15
C/N	84:1

O soro de ricota apresentou um teor de nitrogênio total de 0,023 %, o que equivale a 0,15 % de proteínas. Este teor de proteína é similar aos teores relatados em outros trabalhos, os quais variam de 0,15 % a 0,25 % (CAROTA et al., 2017; PIROZZI et al., 2013).

A lactose é a principal fonte de carbono e energia do soro de ricota. Neste estudo, a concentração de lactose no soro de ricota foi de 4,6 % (m/v). Embora existam outras fontes de carbono no soro de ricota, tais como ácidos orgânicos e proteínas, a concentração das mesmas é baixa quando comparada à concentração de lactose. Sendo assim, apenas a concentração de lactose foi considerada para o cálculo da razão C/N, resultando numa razão de 84:1. Esta alta razão C/N evidencia o potencial do soro de ricota como meio de cultivo para a produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1. Em outro trabalho, utilizando xilose como única fonte de carbono e energia, uma alta razão C/N de 100:1 favoreceu o acúmulo de lipídios por *P. laurentii* UFV-1, atingindo um teor de lipídios de 63 % (m/m) sob condições otimizadas de cultivo (VIEIRA et al., 2020a).

6.2 Avaliação do crescimento e produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota

Para avaliar a capacidade de crescimento e produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota, a levedura foi cultivada nas seguintes condições: temperatura de 30 °C, pH inicial igual a 6,0, agitação de 200 rpm e DO inicial igual a 0,2. A linhagem *P. laurentii* UFV-1 apresentou maior crescimento em soro de ricota do que outras linhagens cultivadas em soro de ricota ou soro de queijo, como pode ser evidenciado na Tabela 5. A velocidade específica de crescimento apresentada por *P. laurentii* UFV-1 foi de 0,44 h⁻¹, superior à apresentada por *Cryptococcus laurentii* A UCD 68-201 cultivada em soro de ricota (0,02 h⁻¹) (CAROTA et al., 2017). Cabe destacar que *Cryptococcus laurentii* foi reclassificada recentemente como *Papiliotrema laurentii* (LIU et al., 2015). A biomassa obtida por *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota foi de 7,6 g.L⁻¹, superior à alcançada por *C. laurentii* A UCD 68-201 (5,6 g.L⁻¹), também cultivada em soro de ricota (CAROTA et al., 2017).

Os parâmetros de produção de lipídios apresentados por *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota indicam que a levedura apresentou o fenótipo oleaginoso quando cultivada neste meio de fermentação. O teor de lipídios obtido em 48 h de cultivo foi de 35,01 % (m/m). Esse valor foi superior ao teor de lipídios de 27,79 % (m/m) obtido por *C. laurentii* 11 em soro de queijo (CASTANHA et al., 2014). A produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 cultivada em soro de ricota foi de 2,66 g.L⁻¹, superior à produção lipídios obtida por *C. laurentii* 11 (1,27 g.L⁻¹) (CASTANHA et al., 2014). Contudo, a produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 foi mais baixa do que a obtida por *C. laurentii* A UCD 68-201 (5,06 g.L⁻¹).

A produtividade volumétrica de lipídios alcançada por *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota foi de 0,0554 g.L⁻¹.h⁻¹, superior à obtida por *C. laurentii* 11 (0,0053 g.L⁻¹.h⁻¹) cultivada em soro de queijo (CASTANHA et al., 2014), porém, menor do que a alcançada por *C. laurentii* A UCD 68-201 (0,0703 g.L⁻¹.h⁻¹) em soro de ricota com a razão C/N 55:1 (CAROTA et al., 2017).

Tabela 5. Parâmetros de crescimento e de produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1, *C. laurentii* 11 e *C. laurentii* A UCD 68-201

Leveduras oleaginosas	Meio de Cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Teor Lipídico (%)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Lipídios (g.L ⁻¹)	Produtividade Volumétrica (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Referência
<i>P. laurentii</i> UFV-1	Soro de ricota	0,44	35,01	7,6	2,66	0,0554	Este trabalho
<i>C. laurentii</i> 11	Soro de queijo	nr	27,79	4,57	1,27	0,0053	Castanha (2014)
<i>C. laurentii</i> A UCD 68-201	Soro de ricota	0,02	nr	5,6	5,06	0,0703	Carota (2017)

*nr=não reportado

6.3 Acúmulo de lipídios em *P. laurentii* UFV-1 cultivada em soro de ricota

Visto que a linhagem de *P. laurentii* UFV-1 apresentou o fenótipo oleaginoso quando cultivada em soro de ricota, mesmo sob condições não otimizadas, avaliou-se neste estudo o efeito de três fatores sobre a produção de lipídios no intuito de aumentar a sua produção a partir desse meio de fermentação. Foram conduzidos 11 ensaios em diferentes níveis dos fatores de pH, razão do volume do meio/volume do frasco Erlenmeyer (VM/F) e concentração de biomassa inicial, representada pela Densidade Óptica (DO_{600}). Estes fatores independentes foram selecionados com base em estudos anteriores que mostraram a sua relevância para acumulação de lipídios em leveduras oleaginosas (JIRU et al., 2017; LI; DU; LIU, 2008; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011; VIEIRA et al., 2020a). A temperatura não foi utilizada como um fator independente baseado em experimentos anteriores que mostraram que em temperaturas superiores a 30 °C a formação de biomassa é reduzida, dificultando a ascensão para as regiões máximas de otimização (VIEIRA et al., 2020a). A metodologia de superfície de resposta (RSM) foi adotada para avaliar o efeito dos diferentes fatores em estudo sobre o teor lipídico (%) (Tabela 6).

A análise de variância (ANOVA) do modelo linear ($\alpha = 0,05$) para o teor lipídico (%) apresentou $R^2 = 0,88$ e p-valor = 0,0390, indicando que este modelo representa adequadamente a variação observada no conjunto de dados. O modelo linear obtido é mostrado na Equação 11:

$$\text{Teor de lipídios (\%)} = 30,66 + 1,20 (\text{Biomassa inicial } (DO_{600})) + 0,08 (\text{pH}) - 8,07 (\text{VM/F}) - 3,67 (\text{Biomassa inicial } (DO_{600}) \times \text{pH}) - 2,38 (\text{Biomassa inicial } (DO_{600}) \times \text{VM/F}) - 1,79 (\text{pH} \times \text{VM/F})$$

$$R^2 = 0,88, (\text{Eq. 11})$$

Entretanto, os fatores com interações (Biomassa inicial (DO_{600}) x pH; Biomassa inicial (DO_{600}) x VM/F; pH x VM/F) e os fatores lineares (Biomassa inicial (DO_{600}) e pH) exibiram coeficientes lineares não significativos ($p > 0,05$). Nota-se pela ANOVA, que o pH e a biomassa inicial (DO_{600}) não afetaram ($p < 0,05$) o acúmulo de lipídios (%) por *P. laurentii* UFV-1 cultivada em soro de ricota. A análise de regressão (Tabela 7) do modelo mostrou que apenas o coeficiente relativo ao fator VM/F causou ($p < 0,05$) influência no teor lipídico (%). Esse resultado indica

que o fator VM/F relacionado à aeração é o fator mais importante para o acúmulo de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 cultivada em soro de ricota dentre as diferentes condições de cultivos avaliadas.

Tabela 6. Análise de Variância dos dados experimentais com intervalo de confiança (IC) de 95 %.

Fonte	GL	SQ	QM	F	Valor-P
(Linear)	(3)	(533,074)	-	-	-
Biomassa inicial (DO ₆₀₀)	1	11,544	11,544	0,50	0,5201
pH	1	0,047	0,047	0,00	0,9663
Vol.soro/Vol.frasco (VM/F)	1	521,484	521,484	22,44	0,0092*
(Interação com 2 Fatores)	(3)	(178,542)	-	-	-
Biomassa (DO ₆₀₀) x pH	1	107,678	107,678	4,63	0,0984
Biomassa (DO ₆₀₀) x VM/F	1	45,268	45,268	1,95	0,2351
pH x VM/F	1	25,597	25,597	1,10	0,3532
Resíduo da Regressão	4	92,939	23,235		
Falta de ajuste	2	66,126	33,063	2,47	0,2883
Resíduo puro	2	26,813	13,406		
Total	10	804,555			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio. *significativo pelo teste F ($p < 0,05$)

Após a análise dos resultados, os termos estatisticamente não significativos da Equação 11 foram eliminados para simplificar o modelo, e uma nova análise de variância e de regressão foi realizada. O modelo resultante (Equação 12), dependente apenas da razão VM/F (aeração) apresentou $R^2 = 0,67$, foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Tabela 7. Análise de regressão do teor de lipídios.

Fonte	GL	SQ	QM	F	p-valor
VM/F	1	521,48	521,48	16,58*	0,0030
Resíduo da Regressão	9	283,07	31,45		
Falta de ajuste	7	256,26	36,61	2,73	0,2940
Resíduo puro	2	26,81	13,41		
Total	10	804,55			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio.
*significativo ($p < 0,05$). Elaborado pelo autor.

Também não foi observada falta de ajuste ($p > 0,05$) para o modelo linear simplificado, confirmando que o fator VM/F (aeração) é o principal fator que afeta a produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota nas condições estudadas.

Teor de lipídios (%) = $46,81 - 80,7 \times (VM/F)$, (Eq. 12).

$$R^2 = 0,67$$

O valor negativo do coeficiente linear VM/F (aeração) indica que quanto menor a razão VM/F, maior será a disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo e, portanto, maior o teor de lipídios (%). O efeito dos fatores pH, biomassa inicial e aeração sobre a produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 foi analisado conforme as condições experimentais e seus principais níveis. De modo geral, os resultados sugerem que maiores acúmulos de lipídios podem ser alcançados diminuindo-se a razão VM/F, ou seja, proporcionando maiores níveis de oxigênio dissolvido ao meio de cultivo. Portanto, a aeração do meio tem efeito positivo sobre o teor de lipídios (%) por *P. laurentii* UFV-1.

6.4 Produção de biomassa

Os efeitos da biomassa inicial (DO_{600}), razão VM/F e pH foram avaliados por meio de ferramentas estatísticas utilizando-se a metodologia de superfície de resposta sobre a produção de biomassa ($g.L^{-1}$).

Para verificar a qualidade do ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto para a explicação da variação observada na resposta biomassa celular ($g.L^{-1}$) foram realizadas as análises de variância dos efeitos e do modelo matemático.

Na análise de variância dos efeitos, a razão VM/F foi o principal efeito que influenciou a produção de biomassa ($g.L^{-1}$). Na análise de variância do modelo matemático proposto para explicar a variação da resposta biomassa ($g.L^{-1}$) (Equação 13) foi obtido um coeficiente de determinação de 0,85 demonstrando assim um bom ajuste do modelo aos dados.

Biomassa ($g.L^{-1}$) = $31,60 - 34,81 \times VM/F$ (Eq. 13)

$$R^2 = 0,79$$

A análise de variância do modelo para produção de biomassa celular foi adequada para descrever o comportamento observado, visto que o modelo foi significativo, e não apresentou falta de ajuste significativa. Baseado no resultado de análise de variância para a resposta que descreve a biomassa celular (g.L^{-1}) em função da biomassa inicial, da razão VM/VF e pH, o modelo matemático pode ser apresentado na forma da equação 13.

A menor razão VM/F (50/500) foi o efeito principal que influenciou na produção da biomassa celular num período de 48 horas de cultivo. A menor razão VM/F representa uma condição de maior aeração, isto é, o meio de cultivo apresenta maior disponibilidade de oxigênio, fato que aumentou a concentração da biomassa celular (g.L^{-1}). Nestas condições de cultivo, com agitação de 250 rpm e razão VM/F 50/500, pH 5 e biomassa inicial (DO_{600}) igual a 1,0 foi estimada uma produção de biomassa celular de $20,14 \text{ g.L}^{-1}$. Condições de maior disponibilidade de oxigênio tendem a favorecer o crescimento celular, uma vez que o metabolismo oxidativo proporciona um maior rendimento energético.

6.5 Produção de lipídios

Para a produção de lipídios, a análise de variância demonstrou que o termo linear da variável razão VM/F foi o efeito que alterou a produção de lipídios ($p < 0,05$) a um nível de 95% de confiança. Verificou-se ainda que os termos de interação Biomassa inicial (DO_{600}) x VM/F, Biomassa inicial (DO_{600}) x pH, pH x VM/F e termos lineares Biomassa inicial (DO_{600}) e pH, não apresentaram efeitos significativos dentro da faixa de variação observada neste estudo.

Na análise de regressão do modelo matemático proposto obteve-se um coeficiente de determinação de 0,76, sendo o modelo estatisticamente significativo e não apresentando falta de ajuste a um nível de significância de $p < 0,05$. Sendo assim, o modelo é considerado adequado para descrever o comportamento observado pela variável resposta.

Com base no resultado de análise de variância, o modelo de resposta que descreve a produção de lipídios pode ser representado pela equação 14.

$$\text{Produção de lipídios (g.L}^{-1}\text{)} = 9,568 - 22,25 \text{ VM/F (Eq. 14)}$$

$$R^2 = 0,76$$

A partir da equação matemática é possível relacionar a produção de lipídios (g.L^{-1}) acumulados durante 48 horas de cultivo em função da razão VM/F. Analisando a Eq. 14 foi possível verificar que quanto menor for o valor da razão VM/F maior será o seu efeito sobre a produção de lipídios. A concentração máxima de lipídios ($9,3 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida no Tratamento 4, isto é, biomassa inicial (DO_{600}) 1,0, pH igual 5, agitação de 250 rpm e razão VM/F (50/500). O tratamento no qual se obteve a menor concentração de lipídios ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$) foi o Tratamento 8, conduzido sob agitação de 250 rpm, pH inicial igual a 7, biomassa inicial (DO_{600}) igual 1 e razão VM/F de 150/500. Estes dados indicam que uma maior aeração do meio de cultivo favorece a produção de lipídios por *P. laurentii* UFV-1. O gráfico que correlaciona a concentração de lipídios (g.L^{-1}) em função da concentração de biomassa celular (g.L^{-1}) é apresentado na Figura 4.

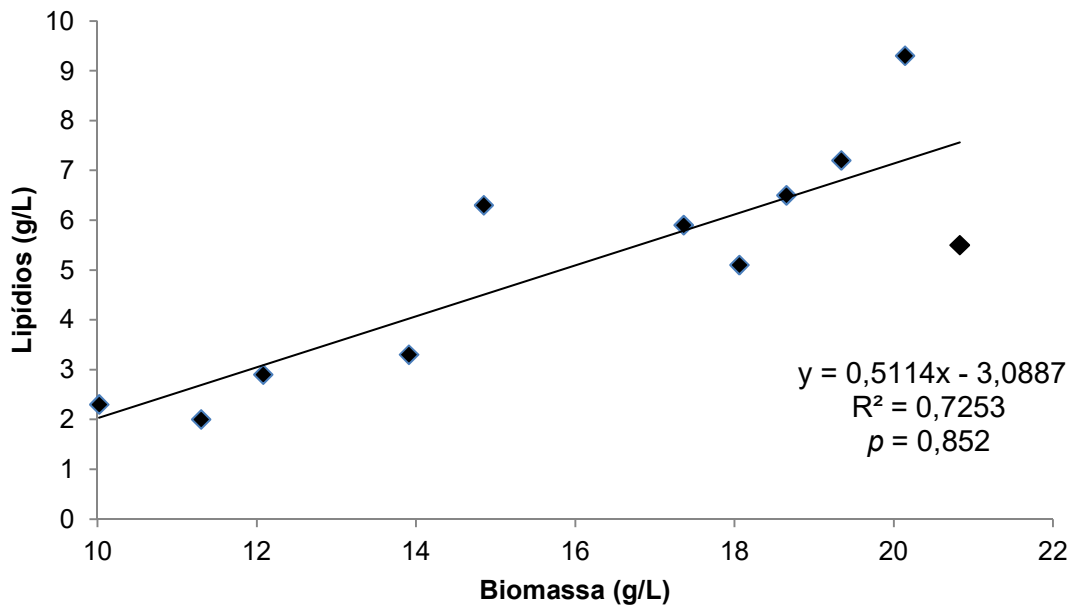


Figura 4. Correlação da concentração de lipídios (g.L^{-1}) em função da biomassa (g.L^{-1}) no cultivo de *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota, com três níveis (+1, 0, -1) das variáveis dependentes pH (5,6 e 7), biomassa inicial (0,2, 0,6 e 1,0) e razão VM/F (50/500, 100/500 e 150/500).

O coeficiente de correlação linear de Pearson ($p = 0,85$) mostrou alta correlação entre as duas respostas estudadas, resultado esperado visto que a concentração de lipídios é intracelular, portanto, quanto maior a biomassa celular maior será a concentração de lipídios.

6.6 Consumo de lactose

Para verificar a qualidade do ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto para a explicação da variação observada na resposta consumo de lactose foram realizadas as análises de variância dos efeitos e do modelo matemático. Na análise de variância dos efeitos, o termo linear VM/F foi considerado o único que apresentou influência sobre o consumo de lactose ($p < 0,05$). Os termos da interação biomassa inicial (DO_{600}) x pH, biomassa inicial (DO_{600}) x VM/F e pH x VM/F e os efeitos lineares das variáveis biomassa inicial (DO_{600}) e pH não apresentaram influência no consumo de lactose ($p < 0,05$) para um nível de confiança de 95%. Na análise de variância do modelo matemático proposto para explicar a variação da resposta consumo de lactose (Equação 15) foi obtido um coeficiente de determinação de 0,78 demonstrando assim um bom ajuste do modelo aos dados.

O modelo apresentado na equação 15 é baseado no resultado de análise de variância que descreve o consumo do substrato em função da razão VM/F.

Consumo de Lactose (%) = $100,1 - 135,5 \text{ VM/F}$ (Eq. 15)

$R^2 = 0,78$

Utilizando a Equação 15 foi possível representar o comportamento do consumo de lactose em função da razão VM/F para o tempo de 48 horas de cultivo. A menor razão VM/F (maior condição de aeração) influenciou positivamente no consumo do substrato. Nestas condições de cultivo, 250 rpm, pH 5, biomassa inicial (DO_{600}) com razão VM/F 50/500 foi estimada uma concentração de cerca de 0,50 g.L⁻¹ de lactose residual, ou seja, um consumo de cerca de 98,9% do substrato em 48 horas de cultivo.

6.7 Rendimento de lipídios por substrato

Para o rendimento de lipídios por substrato consumido, a análise de variância na qual houve efeito significativo, foi encontrado o coeficiente de determinação de 0,86, demonstrando que a variável estudada VM/F teve influência ($p < 0,05$) sobre o rendimento de lipídios por substrato.

Verificou-se ainda que os termos de interação biomassa inicial (DO_{600}) x VM/F, biomassa inicial (DO_{600}) x pH, pH x VM/F, bem como os termos lineares, biomassa inicial (DO_{600}) e pH não apresentaram efeitos sobre o rendimento dentro da faixa de variação observada neste estudo ($p < 0,05$).

Com base no resultado de análise de variância, o modelo de resposta que descreve o rendimento de lipídios por substrato é representado pela equação 16.

$$Y_{P/S} = 0,2262 - 0,4012 \text{ VM/F (Eq. 16)}$$

$$R^2 = 0,86$$

A partir da equação matemática é possível relacionar o rendimento de lipídios por substrato (g.g^{-1}) durante 48 horas de cultivo em função da razão VM/F. Analisando a Eq. 16 foi possível verificar que quanto menor for o valor da razão VM/F maior será o seu efeito sobre o rendimento. O rendimento de lipídios por substrato mais elevado ($0,206 \text{ g.g}^{-1}$) foi obtido no Tratamento 4, ou seja, (biomassa inicial (DO_{600}) igual a 1,0; pH igual a 5, agitação de 250 rpm e razão VM/F 50/500 sendo de em 48 h de cultivo. O ensaio no qual se obteve os menor valor de $Y_{P/S}$ ($0,099 \text{ g.g}^{-1}$) foi o Tratamento 8, com agitação de 250 rpm, pH inicial igual a 7, biomassa inicial (DO_{600}) igual a 1 e razão VM/F de 150/500 (menor aeração). Estes dados apontam para uma influência positiva da maior disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo no rendimento de lipídios por substrato.

6.8 Rendimento de lipídios por massa celular

Para o rendimento de lipídios por massa celular $Y_{(P/X)}$, a análise de variância indicou que o efeito linear da razão VM/F teve influência sobre a variável resposta. Para a análise de variância do modelo foi obtido um coeficiente de determinação de 0,89, sendo o modelo estatisticamente significativo e não havendo falta de ajuste. Portanto, o modelo é considerado adequado para descrever o comportamento observado pela variável resposta. Verificou-se ainda que os termos de interação biomassa inicial (DO_{600}) x VM/F, biomassa inicial (DO_{600}) x pH, pH x VM/F, bem como os termos lineares, biomassa inicial (DO_{600}) e pH não apresentaram efeitos sobre $Y_{(P/X)}$ dentro da faixa de variação observada neste estudo ($p < 0,05$).

Com base no resultado de análise de variância para a resposta de rendimento de lipídios por massa celular $Y_{(P/X)}$, o modelo matemático é representado pela equação 17:

$$Y_{(P/X)} = 0,4666 - 0,798 \text{ VM/F (Eq. 17)}$$

$$R^2 = 0,89$$

A partir da equação matemática é possível relacionar o rendimento de lipídios por massa celular (g.g^{-1}) durante 48 horas de cultivo em função da razão VM/F.

Analisando a Eq. 17 foi possível verificar que quanto menor for o valor da razão VM/F maior será o seu efeito sobre o rendimento de lipídios por massa celular. O rendimento de lipídios por massa celular mais elevado ($0,462 \text{ g.g}^{-1}$) foi obtido no Tratamento 4, ou seja, (biomassa inicial (DO_{600}) igual a 1,0; pH igual a 5, agitação de 250 rpm e razão VM/F 50/500 num período de 48 h de cultivo. O ensaio no qual se obteve os menor valor de $Y_{P/X}$ ($0,177 \text{ g.g}^{-1}$) foi o Tratamento 8, com agitação de 250 rpm, pH inicial igual a 7, biomassa inicial (DO_{600}) igual a 1 e razão VM/F de 150/500 (menor aeração). Estes dados apontam para uma influência positiva da maior disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo no rendimento de lipídios por massa celular.

6.9 Produtividade volumétrica de lipídios

Para a produtividade volumétrica de lipídios (Q_P), a análise de variância indicou que o efeito linear da razão VM/F teve influência sobre este parâmetro de produção. Para a análise de variância do modelo foi obtido um coeficiente de determinação de 0,78, sendo o modelo estatisticamente significativo e não havendo falta de ajuste. Portanto, o modelo é considerado adequado para descrever o comportamento observado pela variável resposta. Verificou-se ainda que os termos de interação biomassa inicial (DO_{600}) x VM/F, biomassa inicial (DO_{600}) x pH, pH x VM/F, bem como os termos lineares, biomassa inicial (DO_{600}) e pH não apresentaram efeitos sobre Q_P dentro da faixa de variação observada neste estudo ($p < 0,05$).

Com base no resultado de análise de variância do modelo para a resposta produtividade de lipídios (Q_P), foi proposto o modelo matemático representado na equação 18.

Produtividade volumétrica de lipídios ($Q_P = \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) = $0,1995 - 0,4650 \text{ VM/F}$ (Eq. 18)
 $R^2 = 0,78$.

De acordo com a Tabela 9, a Q_P ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) apresentou uma variação de 0,042 a 0,193 ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). A máxima produtividade, ou seja, 0,193 ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi obtida na condição de menor razão VM/F (50/500), 250 rpm, pH 5 e biomassa inicial (DO_{600}) 1,0. De forma semelhante ao observado para o teor de lipídios e produção de lipídios, a Q_P foi favorecida em condições de maior disponibilidade de oxigênio. Não foi possível realizar ensaios com maiores agitações devido à capacidade de

agitação do incubador rotatório. Desta forma, trabalhos futuros devem focar em processos fermentativos que podem proporcionar maiores níveis de oxigenação, além de permitirem a quantificação de níveis de oxigênio. Quanto ao pH e biomassa inicial (DO_{600}) este trabalho sugere a possibilidade de estudar outros níveis de forma ascendente para maior crescimento celular e produção de lipídios.

De forma geral, observou-se neste trabalho que os maiores valores do teor de lipídios, produção de lipídios e produtividade volumétrica de lipídios foram 46,03%, 9,3 $g.L^{-1}$ e 0,193 ($g.L^{-1}.h^{-1}$), respectivamente. Estes valores foram obtidos no cultivo realizado na menor razão VM/F e com o maior valor de biomassa inicial (Tratamento 4). Neste trabalho, observou-se que na razão VM/F de 50/500, cerca de 99 % da lactose, foi consumida pela *P. laurentii* UFV-1 em 48 h de fermentação. Foi nessa condição, que também se observou a maior formação de biomassa (20,4 $g.L^{-1}$) e maior rendimento de lipídios por massa celular 0,462 ($g.g^{-1}$). Por outro lado, no tratamento com a maior razão VM/F (150/500), isto é, menor aeração, o consumo de lactose foi de apenas 48,58 % após 48 h de fermentação. Nesse caso, também se obteve a menor produção de lipídios (2,0 $g.L^{-1}$) e formação de biomassa (11,30 $g.L^{-1}$), destacando o impacto positivo da aeração sobre a produção de biomassa e lipídios por *P. laurentii* – UFV 1.

Tabela 8. Teor de lipídios, consumo de lactose, biomassa, concentração de lipídios e produtividade volumétrica de lipídios obtidos no cultivo de *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota em função da biomassa inicial, pH e razão volume do meio/volume do frasco (VM/F).

Tratamentos	Biomassa inicial (DO ₆₀₀)	pH	VM/F*	Teor Lipídico (%)	Consumo de Lactose (%)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Título lipídico (g.L ⁻¹)
1	0,2	5	50/500	26,38	74,30	20,83	5,5
2	0,2	5	150/500	23,72	53,46	12,08	2,9
3	0,2	7	50/500	42,60	65,49	14,85	6,3
4	1	5	50/500	46,03	98,88	20,14	9,3
5	0,2	7	150/500	22,48	48,20	10,02	2,3
6	1	5	150/500	23,55	68,76	13,91	3,3
7	1	7	50/500	37,27	88,72	19,34	7,2
8	1	7	150/500	17,94	48,58	11,30	2,0
9	0,6	6	100/500	34,12	82,80	17,36	5,9
10	0,6	6	100/500	28,24	84,66	18,06	5,1
11	0,6	6	100/500	34,96	88,78	18,65	6,5

*A aeração é definida pela razão entre o volume do meio e o volume frasco de Erlenmeyer utilizado no experimento.

De fato, maiores valores de aeração têm sido reportados para aumentar a produção de lipídios. O resultado obtido por este trabalho está de acordo com o observado para a levedura *Rhodotorula kratochvilovae* SY89 (JIRU, 2017) cultivada em condições otimizadas. Estes autores investigaram diferentes razões de volume do meio/volume do frasco Erlenmeyer (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5). As culturas foram mantidas a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 144 h. Neste estudo, os melhores resultados quanto à biomassa produzida ($15,22 \pm 0,34 \text{ g.L}^{-1}$), produção de lipídios ($6,47 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1}$) e teor de lipídios ($42,51 \pm 1,43 \%$) foram obtidos quando a razão entre o volume do meio e o volume do frasco foi de 0,2 (50/250). Foi observado por Jiru et al., (2017) uma diminuição da biomassa, produção de lipídios e teor de lipídios quando o volume do meio aumentou em relação ao volume do frasco de Erlenmeyer. Estes resultados indicam que a produção de lipídios e formação de biomassa estão associadas com a disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio de fermentação.

Bento et al. (2019) também estudaram a influência da aeração na produção de lipídios e formação de biomassa por *Rhodotorula glutinis* em meio de cultivo utilizando glicerol como fonte de carbono. O experimento foi conduzido em incubadores rotatórios sob diferentes condições de aeração (2,5 a 5,0; razão vol.frasco/vol.meio) (BENTO et al., 2019). A produção de lipídios e formação de biomassa, $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $39,4 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, foram maiores em condições de maior aeração. Por outro lado, houve limitação de crescimento e produção de lipídios na menor condição de aeração avaliada, o que é consistente com os resultados obtidos no presente estudo com *P. laurentii* UFV-1 cultivada em soro de ricota.

Na Tabela 9 são apresentados parâmetros fermentativos: rendimento de massa celular ($Y_{X/S}$), rendimento de lipídios por substrato ($Y_{P/S}$), rendimento de lipídios por massa celular ($Y_{P/X}$) e produtividade volumétrica lipídica (Q_P). Esses parâmetros foram avaliados, estatisticamente, quanto a influência dos efeitos (pH, VM/F e biomassa inicial (DO_{600})) e seus níveis (+1, 0, -1).

Tabela 9. A produtividade volumétrica de lipídios e os parâmetros fermentativos obtidos no cultivo de *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota em função da biomassa inicial, pH e razão volume do meio/volume do frasco (VM/F).

Tratamentos	Biomassa inicial (DO ₆₀₀)	pH	VM/F*	Y x/s (g.g ⁻¹)	Yp/s (g.g ⁻¹)	Y p/x (g.g ⁻¹)	Produtividade Volumétrica Lipídica (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	0,2	5	50/500	0,615	0,162	0,264	0,114
2	0,2	5	150/500	0,489	0,117	0,240	0,060
3	0,2	7	50/500	0,489	0,207	0,424	0,132
4	1	5	50/500	0,447	0,206	0,462	0,193
5	0,2	7	150/500	0,482	0,111	0,230	0,047
6	1	5	150/500	0,441	0,105	0,237	0,068
7	1	7	50/500	0,479	0,178	0,372	0,150
8	1	7	150/500	0,560	0,099	0,177	0,042
9	0,6	6	100/500	0,432	0,147	0,340	0,123
10	0,6	6	100/500	0,439	0,124	0,282	0,106
11	0,6	6	100/500	0,431	0,150	0,349	0,136

*A aeração é definida pela razão entre o volume do meio e o volume frasco de Erlenmeyer utilizado no experimento

Os resultados obtidos neste estudo apontam para a necessidade de, em estudos futuros, estabelecer estratégias que favoreçam a aeração do meio de cultivo em biorreatores visando a maximização do acúmulo de lipídios por *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota.

Deve-se salientar que houve uma correspondência entre os valores obtidos experimentalmente e os valores preditos que estão dentro do intervalo de predição do modelo a 95% de confiança (Tabela 10). Portanto, o modelo é adequado para estudar a relação entre o teor de lipídios (% m/m) com os fatores pH, VM/F e biomassa inicial do inóculo (DO_{600}).

Tabela 10. Valor predito *versus* valor observado para o modelo de regressão linear do teor de lipídios produzido por *P. laurentii* UFV1 em soro de ricota.

Teor de Lipídios (%)	Intervalo de Predição (95%)	
Observado	Min.	Máx.
47,76	24,75	52,73

6.10 Perfil de ácidos graxos de *P. laurentii* UFV-1 e as propriedades do biodiesel

O perfil de ácidos graxos de *P. laurentii* UFV-1 foi avaliado para investigar se estes são apropriados para a produção de biodiesel. A qualidade do biodiesel está relacionada com a abundância dos ácidos graxos palmítico (C16:0), oleico (C18:1) esteárico (C18:0), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) (KNOTHE, 2009). Portanto, o perfil de ácidos graxos de *P. laurentii* UFV-1 foi analisado na condição de crescimento que favoreceu a obtenção do maior teor lipídico. Esta condição corresponde ao Tratamento 4 (temperatura 30 °C, 250 rpm, pH 5, biomassa inicial 1,0 e VM/F 50/500).

Neste trabalho, os ácidos graxos mais abundantes foram o palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) (Tabela 11). Estes são também os ácidos graxos mais abundantes encontrados nos óleos vegetais utilizados para a produção de biodiesel, como a canola, óleo de girassol, soja e palma (AGEITOS et al., 2011; RAMOS et al., 2009).

Tabela 11. Comparações de ácidos graxos entre *P. laurentii* UFV-1, outras leveduras e óleos de vegetais.

Fonte	Ácidos graxos (%)							Outros	Fonte de carbono	Referência
	12:0 Ácido Láurico	14:0 Ácido Mirístico	16:0 Ácido Palmítico	18:0 Ácido Esteárico	16:1 Ácido Palmitoleico	18:1 Ácido Oleico	18:2 Ácido Linoleico			
<i>P. laurentii</i> UFV-1 (Tratamento 4)	0,18±0,31	1,13±0,30	31,20±0,18	5,49±0,27	0,21±0,30	48,3±1,58	13,39±1,25	nd	Lactose	Este trabalho
<i>C. laurentii</i> UCD 68-201	nr	nr	18,53±1,24	5,45±0,28	0,30±0,05	47,16±0,97	23,47±1,01	nr	Lactose	Carota et al., 2017
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	0,2	1,3	22,8	16,4	0,5	26,7	21,9	10,3 **	Xilose	Tanimura et al., 2016
<i>Y. lipolytica</i>	nr	nr	11	1	6	28	51	nr	Glicose	Beopoulos et al., 2009
Soja	nr	<0,5	7-11	2-6	nr	19-34	43-56	23***	-	Ramos et al., 2009
Palma	nr	0,5-2	32-45	2-7	nr	38-52	5-11	nr	-	Ramos et al., 2009

O perfil de ácidos graxos de *P. laurentii* UFV-1 mostra a predominância de ácidos graxos saturados e monoinsaturados C16 (31,41%) e C18 (67,18%), semelhante ao perfil encontrado em outras leveduras e plantas oleaginosas, tais como a soja e palma. As concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), como os ácidos linolênico (C18:3), eicosadienóico (C20:2) e araquidônico (20:4), foram negligenciáveis ou mesmo ausentes. Concentrações baixas de ácidos graxos poliinsaturados são desejáveis do ponto de vista da estabilidade de oxidação do biodiesel (AROUS et al., 2017). Além do mais, essa característica é desejável porque o Número de Cetano, indicador da velocidade de combustão do combustível, aumenta à medida que as duplas ligações insaturadas diminuem (KNOTHE, 2009).

As características do biodiesel (Tabela 12) foram calculadas a partir do perfil de ácidos graxos, de acordo com as equações matemáticas descritas por Sergeeva et al. (2017). As propriedades do biodiesel a partir da composição dos ácidos graxos de *P. laurentii* UFV-1 mostrou que a Viscosidade Cinemática, Densidade e o Alto Valor de Aquecimento (HHV) foram semelhantes às propriedades preditas para os óleos de *P. laurentii* AM 113 (WANG; LIU; LIANG, 2018), *R. toruloides* (SERGEEVA et al., 2017), e *Cryptococcus musci* JCM 24512 (TANIMURA et al., 2015), bem como com óleo de *Jatropha* (RAMOS et al., 2009). Entretanto, *P. laurentii* UFV-1 apresentou o Índice de lodo foi menor que o observado por aqueles autores. Já o Número de Cetano foi semelhante aos preditos a partir do perfil de ácidos graxos de *C. musci* JCM 24512 (TANIMURA et al., 2015) e de óleo da *Jatropha* (RAMOS et al., 2009).

As propriedades do biodiesel preditas a partir do perfil de ácidos graxos de *P. laurentii* UFV-1, isto é, o Valor de lodo (67,92), Número de Cetano (59,63), Ponto de Nuvem (9,94 °C), Maior Valor de Aquecimento (39,42 MJ.kg⁻¹), Viscosidade Cinemática (3,91 mm².s⁻¹) e Densidade (0,87 g.(cm³)⁻¹) foram adequadas para satisfazer a qualidade do biodiesel seguindo as normas da Europa (norma EN 14214), EUA (norma ASTM D 6751) e Brasil (RANP 45).

Tabela 12. Comparações das propriedades do biodiesel que pode ser produzido com óleo de *P. laurentii* UFV-1 e pinhão manso considerando as normas de biodiesel dos EUA (USA-ASTM), União Européia (EU-EN) e do Brasil (Brazil-RANP).

Fonte	Índice de Iodo	Número de Cetanos	Maior Valor de Aquecimento (MJ.kg ⁻¹)	Viscosidade Cinemática (mm ² .s ⁻¹)	Ponto de Nuvem (°C)	Densidade (g.(cm ³) ⁻¹)	Referência
<i>P. laurentii</i> UFV-1	67,92	59,63	39,42	3,91	9,94	0,87	Este trabalho
<i>P. laurentii</i> AM 113	81,39	65,63	40,18	4,62	7,49	0,87	Wang et al., (2018)
<i>R. toruloides</i>	74,13	62,19	39,14	3,43	-	0,86	Sergeeva et al., (2017)
<i>C. musci</i> JCM 24512	75,33	57,26	40,02	4,67	8,75	0,87	Tanimura et al., (2015)
<i>Jatropha</i>	98,02	55,23	40,55	4,48	4,67	nr	Ramos et al., (2009)
Brazil-RANP 45/2014	-	min 42	-	3,0-6,0		0,85-0,90	
USA-ASTM D6751-07b	max 120	min 47	-	1,9-6,0		0,86-0,91	
EU-EN 14214/2012	max 120	min 51	min 35*	3,5-5,0		0,86-0,90	

*EU-EN 14214/2003

7 CONCLUSÕES

O soro de ricota apresenta uma razão C/N que favorece o acúmulo de lipídios e o crescimento celular por *P. laurentii* UFV-1.

O fator mais importante para produção de lipídios e produtividade volumétrica lipídica por *P. laurentii* UFV-1 foi a razão VM/F (aeração).

Na caracterização do perfil de ácidos graxos, os lipídios produzidos apresentam maiores concentrações de ácidos graxos com dezesseis e dezoito carbonos (saturados e monoinsaturados), os quais possuem boa estabilidade oxidativa para produção de biodiesel.

Os indicadores de qualidade de biodiesel, obtidos a partir do perfil de ácidos graxos de *P. laurentii* UFV-1, atendem aos requisitos das normas da Europa (norma EN 14214), EUA (norma ASTM D 6751) e Brasil (RANP 45).

REFERÊNCIAS

ADRIO, José L. Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 114, n. 9, p. 1915–1920, 2017. ISSN: 10970290. DOI: 10.1002/bit.26337.

AGEITOS, Jose Manuel; VALLEJO, Juan Andres; VEIGA-CRESPO, Patricia; VILLA, Tomas G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 1219–1227, 2011. ISSN: 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-011-3200-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3200-z>.

AMI, Diletta; POSTERI, Riccardo; MEREGHETTI, Paolo; PORRO, Danilo; DOGLIA, Silvia Maria; BRANDUARDI, Paola. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–14, 2014. ISSN: 17546834. DOI: 10.1186/1754-6834-7-12.

ANP. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS**, [S. l.], p. 268, 2020. ISBN: 19835884. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>.

AROUS, Fatma; ATITALLAH, Imen Ben; NASRI, Moncef; MECHICHI, Tahar. A sustainable use of low-cost raw substrates for biodiesel production by the oleaginous yeast *Wickerhamomyces anomalus*. **3 Biotech**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 1–10, 2017. ISSN: 2190-5738. DOI: 10.1007/s13205-017-0903-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.012>.

AWAD, Dania; BOHNEN, Frank; MEHLMER, Norbert; BRUECK, Thomas. Multi-factorial-guided media optimization for enhanced biomass and lipid formation by the oleaginous yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosus*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 7, n. MAR, 2019. ISSN: 22964185. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00054.

AWAD, Dania; YOUNES, Samer; GLEMSE, Matthias; M. WAGNER, Franz; SCHENK, Gerhard; MEHLMER, Norbert; BRUECK, Thomas. Towards high-throughput optimization of microbial lipid production: from strain development to process monitoring. **Sustainable Energy & Fuels**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. 5958–5969, 2020. ISSN: 2398-4902. DOI: 10.1039/D0SE00540A. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0SE00540A>.

BATI, N.; HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. Biomodification of fats and oils: Trials with *Candida lipolytica*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [S. l.], v. 61, n. 11, p. 1743–1746, 1984. ISSN: 0003021X. DOI: 10.1007/BF02582139.

BENTO, Tatiane F. S. R.; VIANA, Vitor F. M.; CARNEIRO, Livia M.; SILVA, João Paulo A. Influence of Agitation and Aeration on Single Cell Oil Production by *Rhodotorula glutinis*; from Glycerol. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, [S. l.], v. 09, n. 02, p. 29–43, 2019. ISSN: 2165-400X. DOI: 10.4236/jsbs.2019.92003.

BEOPOULOS, Athanasios; CESCUT, Julien; HADDOUCHE, Ramdane; URIBELARREA, Jean Louis; MOLINA-JOUVE, Carole; NICAUD, Jean Marc. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, [S. l.], v. 48, n. 6, p. 375–387, 2009. ISSN: 01637827. DOI: 10.1016/j.plipres.2009.08.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782709000423>.

BHATIA, Shashi Kant; GURAV, Ranjit; CHOI, Tae-Rim; JUNG, Hye-Rim; YANG, Soo-Yeon; SONG, Hun-Suk; KIM, Yun-Gon; YOON, Jeong-Jun; YANG, Yung-Hun. Effect of synthetic and food waste-derived volatile fatty acids on lipid accumulation in *Rhodococcus sp.* YHY01 and the properties of produced biodiesel. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 192, n. March, p. 385–395, 2019. ISSN: 01968904. DOI: 10.1016/j.enconman.2019.03.081. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.03.081>.

BITELLO, Adriana Regina et al. Diferentes Biomoléculas Utilizando a *Kluyveromyces*. [S. l.], n. 2008, p. 209–216, 2012.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 37, n. 8, 1959.

BUIJS, Nicolaas A.; SIEWERS, Verena; NIELSEN, Jens. Advanced biofuel production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Opinion in Chemical Biology**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 480–488, 2013. ISSN: 13675931. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.03.036. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.036>.

CAROTA, Eleonora; CROGNALE, Silvia; D'ANNIBALE, Alessandro; GALLO, Anna Maria; STAZI, Silvia Rita; PETRUCCIOLI, Maurizio. A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 584–585, p. 554–560, 2017. ISSN: 00489697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.068. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.068>.

CASPETA, Luis; NIELSEN, Jens. Economic and environmental impacts of microbial biodiesel. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 31, n. 9, p. 789–793, 2013. ISSN: 1087-0156. DOI: 10.1038/nbt.2683. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nbt.2683>.

CASTANHA, Rodrigo Fernandes; MARIANO, Adriano Pinto; APARECIDA, Lilia; MORAIS, Salgado De; SCRAMIN, Shirlei; TERESA, Regina; MONTEIRO, Rosim. Castanha, R. F., Mariano, A. P., Aparecida, L., Moraes, S. De, Scramin, S., Teresa, R., & Monteiro, R. (2014). Optimization of lipids production by *Cryptococcus laurentii* 11 using cheese whey with molasses, 387, 379–387. Optimization of lipids production b. [S. l.], v. 387, p. 379–387, 2014.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007. ISSN: 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.

DAS, Bipasha; SARKAR, Sreya; MAITI, Shampa; BHATTACHARJEE, Sangita. Studies on production of ethanol from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Materials Today: Proceedings**, [S. l.], v. 3, n. 10, p. 3253–3257, 2016. ISSN: 22147853. DOI: 10.1016/j.matpr.2016.10.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2016.10.006>.

DEL V. LEGUINA, Ana Carolina; BARRIOS, Andrea C.; DEL M. ROSALES SORO, María; LACOSEGLIAZ, Mariano J.; PAJOT, Hipólito F.; DE FIGUEROA, Lucía I. Castellanos; NIETO-PENÁLVER, Carlos G. Copper alters the physiology of tomato rhizospheric isolates of *Papiliotrema laurentii*. **Scientia Horticulturae**, [S. l.], v. 243, n. May 2018, p. 376–384, 2019. ISSN: 03044238. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.08.057. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.057>.

DIAS, Carla; SOUSA, Sofia; CALDEIRA, João; REIS, Alberto; LOPES DA SILVA, Teresa. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 189, p. 309–318, 2015. ISSN: 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.04.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.009>.

DINIZ, Raphael Hermano Santos. METABOLISMO DE LACTOSE EM *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 E *Kluyveromyces lactis* JA6. **Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae.**, [S. l.], 2009.

DUGAR, Deepak; STEPHANOPOULOS, Gregory. Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 12, p. 1074–1078, 2011. ISSN: 1087-0156. DOI: 10.1038/nbt.2055. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nbt.2055>.

DULERMO, Thierry; LAZAR, Zbigniew; DULERMO, Rémi; RAKICKA, Magdalena; HADDOUCHE, Ramedane; NICAUD, Jean Marc. Analysis of ATP-citrate lyase and malic enzyme mutants of *Yarrowia lipolytica* points out the importance of mannitol metabolism in fatty acid synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [S. l.], v. 1851, n. 9, p. 1107–1117, 2015. ISSN: 18792618. DOI: 10.1016/j.bbalip.2015.04.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.04.007>.

ELRAYIES, Ghada Mohammad. Microalgae: Prospects for greener future buildings. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 81, n. May 2017, p. 1175–1191, 2018. ISSN: 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2017.08.032. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032117311747>.

ERGU, T. H.; TEZEL, U.; GU, E.; DEMIRER, G. N. Anaerobic Biotransformation and Methane Generation Potential of. **Waste Management**, [S. l.], v. 21, p. 643–650, 2001. ISBN: 9031221058.

FABISZEWSKA; MISIUKIEWICZ-STĘPIEŃ; PAPLIŃSKA-GORYCA; ZIENIUK; BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK. An Insight into Storage Lipid Synthesis by *Yarrowia*

lipolytica Yeast Relating to Lipid and Sugar Substrates Metabolism. **Biomolecules**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 685, 2019. ISSN: 2218-273X. ISBN: 4822593762. DOI: 10.3390/biom9110685. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/9/11/685>.

GAJO, Fabiula Ferrarez Silva; GAJO, Adriano Alvarenga; SILVA, Roberta Bessa Veloso; FERREIRA, Eric Batista. Diagnóstico da destinação do soro de leite na mesorregião do Campo das Vertentes – Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S. l.], v. 71, n. 1, p. 26–37, 2016. ISSN: 2238-6416. DOI: 10.14295/2238-6416.v70i1.501. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/riict/article/view/501>.

GALAFASSI, Silvia; CUCCHETTI, Daniela; PIZZA, Francesca; FRANZOSI, Giuliana; BIANCHI, Daniele; COMPAGNO, Concetta. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 111, p. 398–403, 2012. ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.004>.

GÁLVEZ-LÓPEZ, Didiana; CHÁVEZ-MELÉNDEZ, Bianca; VÁZQUEZ-OVANDO, Alfredo; ROSAS-QUIJANO, Raymundo. The metabolism and genetic regulation of lipids in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], n. 50, p. 23–31, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.068>.

GONG, Zhiwei; SHEN, Hongwei; ZHOU, Wengting; WANG, Yandan; YANG, Xiaobing; ZHAO, Zongbao K. Efficient conversion of acetate into lipids by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 189, 2015. ISSN: 1754-6834. DOI: 10.1186/s13068-015-0371-3. Disponível em: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/8/1/189>.

GUERZONI, M. E.; LAMBERTINI, P.; LERCKER, G.; MARCHETTI, R. Technological Potential of Some Starch Degrading Yeasts. **Starch □ Stärke**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 52–57, 1985. ISSN: 1521379X. DOI: 10.1002/star.19850370205.

HUANG, Qingshan; JIANG, Fuhua; WANG, Lianzhou; YANG, Chao. Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. **Engineering**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 318–329, 2017. ISSN: 20958099. DOI: 10.1016/J.ENG.2017.03.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>.

HUNG, Chia-Suei; BARLOW, Daniel E.; VARALJAY, Vanessa A.; DRAKE, Carrie A.; CROUCH, Audra L.; RUSSELL, John N.; NADEAU, Lloyd J.; CROOKES-GOODSON, Wendy J.; BIFFINGER, Justin C. The biodegradation of polyester and polyester polyurethane coatings using *Papiliotrema laurentii*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 139, n. February, p. 34–43, 2019. ISSN: 09648305. DOI: 10.1016/j.ibiod.2019.02.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096483051831401X>.

JIRU, Tamene Milkessa; GROENEWALD, Marizeth; POHL, Carolina; STEYN, Laurinda; KIGGUNDU, Nicholas; ABATE, Dawit. Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. **3 Biotech**, [S. l.], v.

7, n. 2, p. 145, 2017. ISSN: 21905738. ISBN: 1320501707697. DOI: 10.1007/s13205-017-0769-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-017-0769-7>.

JUANSSILFERO, Ario B. et al. Effect of inoculum size on single-cell oil production from glucose and xylose using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 125, n. 6, p. 695–702, 2018. ISSN: 13474421. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.020>.

KNOTHE, Gerhard. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. **Energy & Environmental Science**, [S. l.], v. 2, n. 7, p. 759, 2009. ISSN: 1754-5692. DOI: 10.1039/b903941d. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b903941d>.

KOHLWEIN, Sepp D. Obese and anorexic yeasts: Experimental models to understand the metabolic syndrome and lipotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [S. l.], v. 1801, n. 3, p. 222–229, 2010. ISSN: 13881981. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2009.12.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2009.12.016>.

LARA, Carla A.; SANTOS, Renata O.; CADETE, Raquel M.; FERREIRA, Carla; MARQUES, Susana; GÍRIO, Francisco; OLIVEIRA, Evelyn S.; ROSA, Carlos A.; FONSECA, César. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 105, n. 6, p. 1107–1119, 2014. ISSN: 15729699. DOI: 10.1007/s10482-014-0172-x.

LI, Qiang; DU, Wei; LIU, Dehua. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 80, n. 5, p. 749–756, 2008. ISSN: 01757598. DOI: 10.1007/s00253-008-1625-9.

LIU, X. Z. et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 81, p. 85–147, 2015. ISSN: 01660616. DOI: 10.1016/j.simyco.2015.12.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166061615000275>.

LONDERO, Marcos Rech; ZANROSSO, Crisley Dossin; CORSO, Leandro Luis; MICHELIN, Lessandra; SOLDERA, Jonathan. Catheter-related infection due to *Papiliotrema laurentii* in an oncologic patient: Case report and systematic review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 451–461, 2019. ISSN: 16784391. DOI: 10.1016/j.bjid.2019.10.005.

MA, Yingqun; GAO, Zhen; WANG, Qunhui; LIU, Yu. Biodiesels from microbial oils: Opportunity and challenges. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 263, n. May, p. 631–641, 2018. ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.05.028. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.028>.

MAPA. **Sumário Executivo - Complexo Leite**. 2020. Disponível em: <http://antigo.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de>

politica-agricola/sumarios-executivos-de-produtos-agricolas/complexo-leite-pdf/@@download/file/Complexo Leite (PDF).pdf.

MAZA, D. Daniela; VIÑARTA, Silvana C.; SU, Ying; GUILLAMÓN, José Manuel; AYBAR, Manuel J. Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 310, n. January, p. 21–31, 2020. ISSN: 01681656. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2020.01.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.01.012>.

MENG, Xin; YANG, Jianming; XU, Xin; ZHANG, Lei; NIE, Qingjuan; XIAN, Mo. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. [S. l.], v. 34, p. 1–5, 2009. DOI: 10.1016/j.renene.2008.04.014.

MORALES, Marjorie; HÉLIAS, Arnaud; BERNARD, Olivier. Optimal integration of microalgae production with photovoltaic panels: Environmental impacts and energy balance. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–17, 2019. ISSN: 17546834. ISBN: 1306801915. DOI: 10.1186/s13068-019-1579-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1579-4>.

OCHSENREITHER, Katrin; GLÜCK, Claudia; STRESSLER, Timo; FISCHER, Lutz; SYLDATK, Christoph. Production strategies and applications of microbial single cell oils. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. OCT, 2016. ISSN: 1664302X. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01539.

PAIVA, Lílian Cardoso; DINIZ, Raphael Hermano Santos; VIDIGAL, Pedro Marcus Pereira; MENDES, Tiago Antônio de Oliveira; SANTANA, Mateus Ferreira; CERDÁN, María Esperanza; GONZÁLEZ-SISO, María Isabel; SILVEIRA, Wendel Batista Da. Genomic analysis and lactose transporter expression in *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735. **Fungal Biology**, [S. l.], v. 123, n. 9, p. 687–697, 2019. ISSN: 18786146. DOI: 10.1016/j.funbio.2019.06.004.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [S. l.], v. 112, n. 6, p. 639–654, 2010. ISSN: 14387697. DOI: 10.1002/ejlt.200900197.

PAPANIKOLAOU, Seraphim; AGGELIS, George. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [S. l.], v. 113, n. 8, p. 1031–1051, 2011. ISSN: 14387697. DOI: 10.1002/ejlt.201100014.

PIROZZI, Domenico; AUSIELLO, Angelo; ZUCCARO, Gaetano; SANNINO, Filomena; YOUSUF, Abu. Culture of oleaginous yeasts in dairy industry wastewaters to obtain lipids suitable for the production of II-Generation Biodiesel. **International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 162–166, 2013.

RAKICKA, Magdalena; LAZAR, Zbigniew; DULERMO, Thierry; FICKERS, Patrick; NICAUD, Jean Marc. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2015. ISSN: 17546834. DOI:

10.1186/s13068-015-0286-z.

RAMOS, María Jesús; FERNÁNDEZ, Carmen María; CASAS, Abraham; RODRÍGUEZ, Lourdes; PÉREZ, Ángel. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 100, n. 1, p. 261–268, 2009. ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.06.039.

RUBIO-TEXEIRA, M. A comparative analysis of the genetic switch between not-so-distant cousins: versus. **FEMS Yeast Research**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 1115–1128, 2005. ISSN: 15671356. DOI: 10.1016/j.femsyr.2005.05.003. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1016/j.femsyr.2005.05.003>.

SAINI, Rahul; HEGDE, Krishnamoorthy; BRAR, Satinder Kaur; VEZINA, Pierre. Advanced biofuel production and road to commercialization: An insight into bioconversion potential of *Rhodospiridium sp.* **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 132, n. October 2019, p. 105439, 2020. ISSN: 18732909. DOI: 10.1016/j.biombioe.2019.105439. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105439>.

SANSONETTI, Sascha; CURCIO, Stefano; CALABRÒ, Vincenza; IORIO, Gabriele. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 33, n. 12, p. 1687–1692, 2009. ISSN: 09619534. DOI: 10.1016/j.biombioe.2009.09.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.09.002>.

SANSONETTI, Sascha; CURCIO, Stefano; CALABRÒ, Vincenza; IORIO, Gabriele. Optimization of ricotta cheese whey (RCW) fermentation by response surface methodology. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 23, p. 9156–9162, 2010. ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.07.030. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.030>.

SARACENO, A.; SANSONETTI, S.; CALABRÒ, V.; IORIO, G.; CURCIO, S. A comparison between different modeling techniques for the production of bio-ethanol from dairy industrywastes. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 461–469, 2011. ISSN: 03529568.

SARKAR, Soumyadev; CHAKRAVORTY, Somnath; MUKHERJEE, Avishek; BHATTACHARYA, Debanjana; BHATTACHARYA, Semantee; GACHHUI, Ratan. De novo RNA-Seq based transcriptome analysis of *Papiliotrema laurentii* strain RY1 under nitrogen starvation. **Gene**, [S. l.], v. 645, n. August 2017, p. 146–156, 2018. ISSN: 18790038. DOI: 10.1016/j.gene.2017.12.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.014>.

SCHMIDT, F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 425–435, 2005. ISSN: 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-005-0003-0. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-0003-0>.

SERGEEVA, Ya E.; MOSTOVA, E. B.; GORIN, K. V.; KOMOVA, A. V.; KONOVA, I. A.; POJIDAEV, V. M.; GOTOVTSEV, P. M.; VASILOV, R. G.; SINEOKY, S. P. Calculation of Biodiesel Fuel Characteristics Based on the Fatty Acid

Composition of the Lipids of Some Biotechnologically Important Microorganisms. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [S. l.], v. 53, n. 8, p. 807–813, 2017. ISSN: 00036838. DOI: 10.1134/S0003683817080063. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1134/S0003683817080063>.

SILVEIRA, Fernando Augusto; DINIZ, Raphael Hermano S.; SAMPAIO, Geraldo M. S.; BRANDÃO, Rogelio L.; DA SILVEIRA, Wendel B.; CASTRO, Ieso M. Sugar transport systems in *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 112, n. 2, p. 211–223, 2019. ISSN: 15729699. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1007/s10482-018-1143-4.

SITEPU, Irmayuli R.; GARAY, Luis A.; SESTRIC, Ryan; LEVIN, David; BLOCK, David E.; GERMAN, J. Bruce; BOUNDY-MILLS, Kyria L. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 32, n. 7, p. 1336–1360, 2014. ISSN: 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.08.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.08.003>.

SUGITA, Takashi; TAKASHIMA, Masako; IKEDA, Reiko; NAKASE, Takashi; SHINODA, Takako. Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *C. laurentii* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 38, n. 4, p. 1468–1471, 2000. ISSN: 00951137. DOI: 10.1128/jcm.38.4.1468-1471.2000.

TANIMURA, Ayumi et al. *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 4776, 2015. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep04776. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep04776>.

TANIMURA, Ayumi; TAKASHIMA, Masako; SUGITA, Takashi; ENDOH, Rikiya; OHKUMA, Moriya; KISHINO, Shigenobu; OGAWA, Jun; SHIMA, Jun. Lipid production through simultaneous utilization of glucose, xylose, and l-arabinose by *Pseudozyma hubeiensis*: a comparative screening study. **AMB Express**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 58, 2016. ISSN: 2191-0855. DOI: 10.1186/s13568-016-0236-6. Disponível em: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-016-0236-6>.

VIEIRA, Nívea Moreira; SANTOS, Raquel Cristina Vieira; GERMANO, Vanessa Kely de Castro; VENTORIM, Rafaela Zandonade; ALMEIDA, Eduardo Luís Menezes; SILVEIRA, Fernando Augusto; RIBEIRO JÚNIOR, José Ivo; SILVEIRA, Wendel Batista. Isolation of a new *Papiliotrema laurentii* strain that displays capacity to achieve high lipid content from xylose. **3 Biotech**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 382, 2020 a. ISSN: 2190-572X. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1007/s13205-020-02373-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02373-4>.

VIEIRA, Nívea Moreira; ZANDONADE VENTORIM, Rafaela; DE MOURA FERREIRA, Maurício Alexander; BARCELOS DE SOUZA, Gilza; MENEZES DE ALMEIDA, Eduardo Luís; PEREIRA VIDIGAL, Pedro Marcus; NUNES NESI, Adriano; GOMES FIETTO, Luciano; BATISTA DA SILVEIRA, Wendel. Insights into oleaginous phenotype of the yeast *Papiliotrema laurentii*. **Fungal Genetics and Biology**, [S. l.],

v. 144, n. February, p. 103456, 2020 b. ISSN: 10871845. DOI: 10.1016/j.fgb.2020.103456. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103456>.

WANG, Guangyuan; LIU, Lin; LIANG, Wenxing. Single Cell Oil Production from Hydrolysates of Inulin by a Newly Isolated Yeast *Papiliotrema laurentii* AM113 for Biodiesel Making. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 184, n. 1, p. 168–181, 2018. ISSN: 15590291. DOI: 10.1007/s12010-017-2538-9.

WASYLENKO, Thomas M.; AHN, Woo Suk; STEPHANOPOULOS, Gregory. The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering**, [S. l.], v. 30, p. 27–39, 2015. ISSN: 10967184. DOI: 10.1016/j.ymben.2015.02.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2015.02.007>.

ZARA, G.; BARDI, L.; BELVISO, S.; FARRIS, G. A.; ZARA, S.; BUDRONI, M. Correlation between cell lipid content, gene expression and fermentative behaviour of two *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 104, n. 3, p. 906–914, 2008. ISSN: 1364-5072. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03608.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03608.x>.

ZHU, Zhiwei et al. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Nature Communications**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1112, 2012. ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/ncomms2112. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ncomms2112>.

ZOTTA, Teresa; SOLIERI, Lisa; IACUMIN, Lucilla; PICOZZI, Claudia; GULLO, Maria. Valorization of cheese whey using microbial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 104, n. 7, p. 2749–2764, 2020. ISSN: 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-020-10408-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-020-10408-2>.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1. Velocidade específica de crescimento da *P. laurentii* UFV-1 no soro de ricota à 30 °C sob 200 rpm em pH 6.

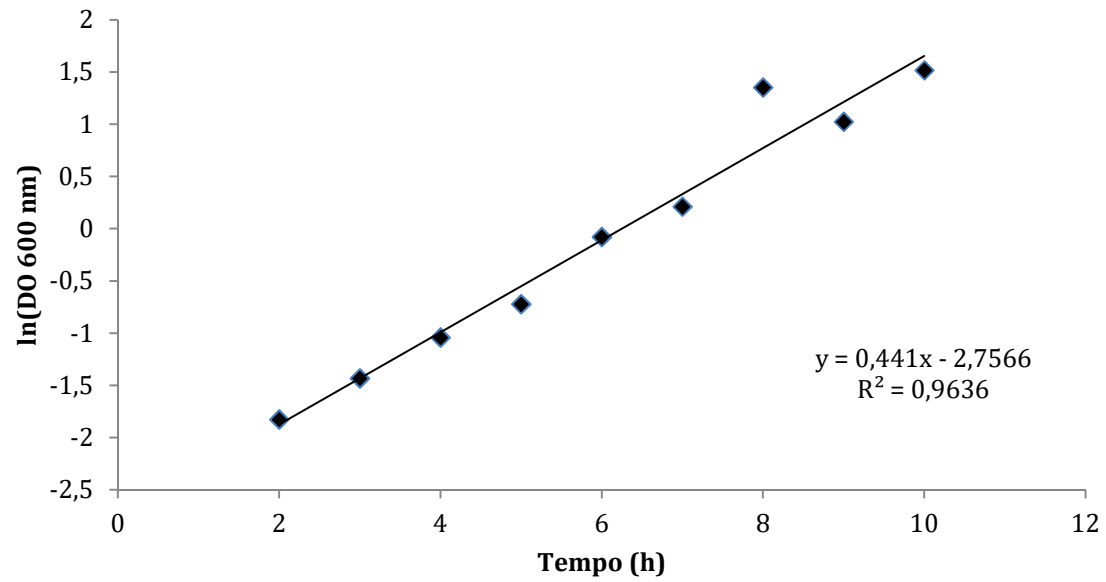


Figura S2. Curva de crescimento da *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota à 30 °C sob 200 rpm em pH 6.

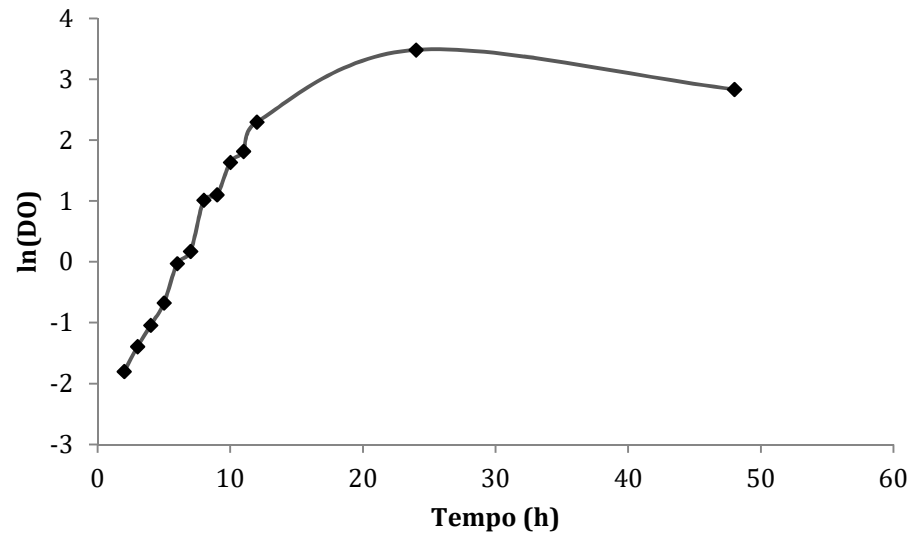


Tabela S1. Análise de Regressão para o teor lipídico (%).

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	30,66	1,45	21,10	0,000	
Biomassa inicial (DO)	1,20	1,70	0,70	0,520	1,00
pH	0,08	1,70	0,04	0,966	1,00
VM/F	-8,07	1,70	-4,74	0,009*	1,00
Interação com 2 Fatores	-3,67	1,70	-2,15	0,098	1,00
Biomassa (DO) * pH	-2,38	1,70	-1,40	0,235	1,00
Biomassa (DO) * VM/F	-1,79	1,70	-1,05	0,353	1,00

Tabela S2. Análise de variância ANOVA do teor lipídico.

Fonte	GL	SQ	QM	F-valor	p-valor
Modelo	1	521,48	521,48	16,58	0,003
Linear	1	521,48	521,48	16,58	0,003
VM/F	1	521,48	521,48	16,58	0,003
Erro	9	283,07	31,45		
Falta de ajuste	7	256,26	36,61	2,73	0,294
Erro puro	2	26,81	13,41		
Total	10	804,55			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio.

Tabela S3. Análise de Regressão do coeficiente linear aeração.

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	30,66	1,69	18,13	0,000	
VM/F	-8,07	1,98	-4,07	0,003	1,00

Figura S3. Curva padrão com a relação entre massa seca celular e densidade óptica do cultivo da *P. laurentii* UFV-1 em soro de ricota.

