

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**PRODUÇÃO DE SINGLE CELL PROTEIN (SCP) POR LEVEDURAS
UTILIZANDO O GLICEROL BRUTO COMO FONTE DE CARBONO**

JUCILENE PINTO DA SILVA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
AGOSTO- 2018**

PRODUÇÃO DE SINGLE CELL PROTEIN (SCP) POR LEVEDURAS UTILIZANDO O GLICEROL BRUTO COMO FONTE DE CARBONO

JUCILENE PINTO DA SILVA

Bióloga

Universidade do Estado da Bahia, 2016

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr^a. Marcia Luciana Cazetta

Co-orientador: Dr Gervásio Paulo da Silva

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

AGOSTO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S586p

Silva, Jucilene Pinto da.

Produção de Single Cell Protein (SCP) por leveduras utilizando glicerol bruto como fonte de carbono / Jucilene Pinto da Silva._ Cruz das Almas, BA, 2018.
50f.; il.

Orientadora: Marcia Luciana Cazetta.

Coorientador: Gervásio Paulo da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.

1.Proteínas – Leveduras (Fungos). 2.Biodisel – Biomassa – Fermentação. 3.Glicerina – Avaliação.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 577.2

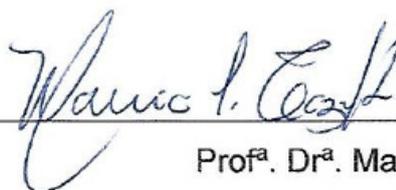
Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.

Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Samento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).

Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
Jucilene Pinto da Silva



Prof^ª. Dr^ª. Marcia Luciana Cazetta
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
(Orientadora)



Prof^ª. Marília Lordêlo Cardoso Silva
Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)



Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida
Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em _____.”

DEDICO

*Meus pais,
Maria e José*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, amparo e proteção.

Aos meus pais Maria Helena Pinto da Silva e José Daniel da Silva, pelo amor, carinho e apoio. Vocês são meu porto seguro!

A toda minha família pelo incentivo.

Meus sinceros agradecimentos à professora Dr^a. Marcia Luciana Cazetta pela orientação recebida, apoio, paciência durante a minha estada no Laboratório de Bioquímica e pela confiança depositada.

Ao professor Dr. Gervásio Paulo da Silva pela orientação recebida, apoio e pelas contribuições dadas para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. André Dias de Azevedo Neto pelo auxílio das análises de determinação de proteína.

A turma de mestrado 2016.2.

Ao meu namorado Gilberto pelo carinho, paciência e companheirismo.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica, em especial, as minhas amigas Adriele e Taís.

As meninas “da República 263” pelo carinho e cuidado, especialmente Rafinha e Tâmara.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Biotecnologia de microrganismos da Universidade do Estado da Bahia Campus – VII pela realização das análises em HPLC.

"Judo Posso Naquele que me fortalece"

(Filipenses, 4:13)

RESUMO

DA SILVA, Jucilene Pinto. Produção de Single Cell protein (SCP) por leveduras utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono.

O glicerol bruto, gerado na proporção de 10% (v/v) durante a produção de biodiesel, pode ser utilizado por microrganismos para sua bioconversão em diversos produtos industriais, como biomassa ou Single Cell Protein (SCP). Este trabalho teve como objetivos avaliar a produção de SCP por leveduras utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono, selecionar a levedura mais promissora e otimizar a produção de biomassa e de SCP. As leveduras utilizadas neste estudo foram *Aureobasidium pullulans* EBJ31, *Candida (Metschnikowia) pseudointermedia* CAC01, *Rhodotorula mucilaginosa* CCC31, *Wickerhamomyces anomalus* CCC32 e *Trichosporon asahii* EPB13. *W. anomalus* CCC32 foi a cepa mais promissora para a produção de SCP e foi selecionada para os estudos de otimização da produção de biomassa e de proteína bruta por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Foi utilizado uma matriz de planejamento fatorial do tipo DCCR 2³ e as variáveis estudadas foram glicerol bruto, NaNO₃ e ureia. Após a otimização, a produção máxima de biomassa foi cerca de 20 g/L e a concentração de proteína bruta foi de 33% em 84 h, utilizando 25 g/L de glicerol bruto, 3,5 g/L de NaNO₃ e 6,5 g/L de ureia, a 30 °C e 150 rpm. Os resultados indicaram que o glicerol bruto pode ser utilizado como substrato para produção de SCP por leveduras, sendo uma alternativa para agregar valor a esse resíduo. *W. anomalus* CCC32 apresentou características favoráveis para produção de SCP como crescimento rápido, alta produção de biomassa com alto teor de proteína bruta.

Palavras-chave: Biodiesel, resíduo agroindustrial, fungos, fermentação

ABSTRACT

DA SILVA, Jucilene Pinto. Production of single cell protein (SCP) by yeast using crude glycerol as carbon source.

Crude glycerol, generated at the rate of 10% (v/v) during biodiesel production, can be used by microorganisms for their bioconversion in several industrial products, such as biomass or Single Cell Protein (SCP). The objective of this work was to evaluate the production of yeast SCP using crude glycerol as a carbon source, and select the most promising yeast and optimize the production of biomass and crude protein. The yeasts used in this study were *Aureobasidium pullulans* EBJ31, *Candida (Metschnikowia) pseudointermedia* CAC01, *Rhodotorula mucilaginosa* CCC31, *Wickerhamomyces anomalus* CCC32 and *Trichosporon asahii* EPB13. *W. anomalus* CCC32 was the most promising strain for SCP production and was selected for the optimization studies of biomass and crude protein production by Rotational Central Compound Design (DCCR). A factorial planning matrix of type DCCR 2³ was used and the studied variables were crude glycerol, NaNO₃ and urea. After optimization, the maximum biomass production was about 20 g/L and the crude protein concentration was 33% at 84 h, using crude glycerol 25 g/L, NaNO₃ 3.5 g/L and 6.5 g/L urea, at 30 ° C and 150 rpm. The results indicated that the crude glycerol can be used as a substrate for the production of SCP by yeasts, being an alternative to add value to this residue. *W. anomalus* CCC32 presented favorable characteristics for SCP production as fast growth, high biomass production with high crude protein content.

Keywords: Biodiesel, agroindustrial residue, fungi, fermentation

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Estrutura química do glicerol.....12

CAPÍTULO 2

Produção de Single Cell Protein (SCP) por *Wickerhamomyces anomalus* CCC32 a partir de glicerol bruto.....20

Figura 1: Fermentação do glicerol bruto por *W. anomalus* CCC32 (A), *A. pullulans* EBJ31 (B), *C. (Metschnikowia) pseudointermedia* CAC01 (C), *R. mucilaginosa* CCC31 (D) e *T. asahii* EPB13 (E) a 30°C, 150 rpm durante 96 h.....28

Figura 2: Produção de biomassa (g/L) e de proteína bruta (%) por *W. anomalus* CCC32 em diferentes concentrações de glicerol bruto a 150 rpm, 30°C, durante 24 h.....33

Figura 3: Time course da produção de biomassa (g/L) e de proteína bruta (%) por *W. anomalus* CCC32 a 25 g/L de glicerol bruto, 3,5 g/L de NaNO₃, 6,5 g/L de ureia, a 30 °C, 150 rpm durante 120 horas.....34

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1:

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Composição nutricional dos principais grupos de microrganismos utilizados para produção de SCP em (% peso seco)4

Tabela 2: Composição média de aminoácidos essenciais (AE) (%) de SCP de diferentes grupos de microrganismos.....5

Tabela 3: Microrganismos e substratos utilizados para produção de SCP.....7

CAPÍTULO 2

Produção de Single Cell Protein (SCP) por *Wickerhamomyces anomalus* CCC32 a partir de glicerol bruto.....20

Tabela 1: Biomassa (g/L) e teor de proteína (%) por *W. anomalus* CCC32 após 24 de fermentação utilizando diferentes fontes de nitrogênio.....29

Tabela 2: Matriz do delineamento contendo valores codificados, valores reais (em parênteses), e os resultados obtidos para produção de biomassa e proteína bruta..... 31

Tabela 3: Efeitos estimados para produção de biomassa e proteína bruta por *W. anomalus* CCC32.....32

Tabela 4: ANOVA para o modelo de regressão obtido pela superfície de resposta.....33

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	
GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
1 SINGLE CELL PROTEIN (SCP)	4
1.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE SCP.....	6
1.2 PRODUÇÃO DE SINGLE CELL PROTEIN (SCP).....	9
2 GLICEROL BRUTO	12
2.1 FERMENTAÇÃO MICROBIANA DO GLICEROL.....	13
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 2	21
1. Introdução	22
2. Material e Métodos	24
2.1 <i>Microrganismos e substrato</i>	24
2.2 <i>Seleção das leveduras para produção de biomassa e proteína bruta a partir do glicerol bruto</i>	24
2.3 <i>Efeito de fontes de nitrogênio para produção de biomassa e de proteína bruta</i>	25
2.4 <i>Métodos analíticos</i>	25
2.5 <i>Otimização da produção de biomassa e proteína bruta utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)</i>	26
3. Resultados e Discussão	27
3.1 <i>Seleção das leveduras para produção de biomassa e proteína bruta a partir do glicerol bruto</i>	27
3.2 <i>Fontes de nitrogênio para produção de SCP por W. anomalus CCC32</i>	29
3.3 <i>Otimização da produção de biomassa e proteína bruta utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)</i>	30
Considerações finais	35
Referências	36

INTRODUÇÃO GERAL

O termo Single Cell Protein (SCP) foi criado em 1966 para introduzir a ideia de utilizar a biomassa de microrganismos como fonte de proteínas para a alimentação humana e animal. A ideia foi concebida devido ao rápido crescimento da população e o aumento da demanda por alimentos (RAJOKA et al., 2004). Ainda de acordo com a teoria de Thomas Robert Malthus “a população humana aumenta em uma progressão geométrica, enquanto que a oferta de alimentos cresce a uma taxa aritmética”, sendo assim, é criada uma grande lacuna entre a demanda e a oferta alimentos, tornando-se necessário a busca de alternativas para o suprimento de proteína (ANAPUMA, RAVINDRA, 2000).

Dessa forma, a produção de Single Cell Protein pode ser uma alternativa de fonte de proteínas não convencionais para alimentação humana e animal, uma vez que a biomassa microbiana é rica em proteínas com percentagem elevada de aminoácidos essenciais, vitaminas e outros nutrientes podendo substituir fontes de proteínas como farelo de soja e farinha de peixe (MOLK et al., 2002). A SCP apresenta vantagens em relação às proteínas animais e vegetais, pois o seu crescimento não é sazonal, não depende de clima, a produção é rápida, uma vez que o crescimento dos microrganismos é acelerado, e não requer extensa área para seu cultivo (RAJOKA et al., 2004).

Uma variedade de microrganismos como bactérias, fungos, incluindo as leveduras, e algas, são utilizados para produzir SCP. Geralmente as leveduras possuem maior aceitabilidade uma vez que já são utilizadas para produção de alimentos comuns como pão e cerveja (GARCÍA-GARYBAI et al., 2014). As leveduras possuem características que favorecem a sua utilização na produção de SCP como crescimento rápido, capacidade de floculação, o que facilita a recuperação das células durante o cultivo e geralmente crescem em pH ácido que dificulta contaminação por bactérias (GAO et al., 2007; SHENG et al., 2007).

A produção de SCP a partir de resíduos agroindustriais torna o processo economicamente viável pois reduz os custos de produção e ajuda no processo

de reciclagem de resíduos (SISMAN et al., 2012). Dentre os substratos que podem ser empregados para produção de SCP, o glicerol bruto, resíduo das usinas de biodiesel, pode ser utilizado para produção de biomassa com alto teor de proteína bruta. O glicerol bruto é gerado durante a produção do biodiesel, na proporção 10:1, ou seja, para cada 10 litros de biodiesel produzido, aproximadamente 1 litro de glicerol é liberado. O excesso de glicerol bruto no mercado representa um problema para as usinas de biodiesel pois, devido ao alto teor de impurezas como sais, álcool residual (etanol ou metanol) suas aplicações na indústria química e farmacêutica são limitadas. Além disso, para o seu descarte no meio ambiente é necessário tratamento adequado, gerando custos adicionais a cadeia produtiva de biodiesel.

Assim, a utilização do glicerol bruto como substrato para a produção de SCP dará destino correto a esse resíduo e agregará valor à cadeia produtora de biodiesel. A SCP produzida pode ser destinada para formulação de rações animais como componente nutritivo ou utilizada como aditivo alimentar para consumo humano. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a produção de Single Cell Protein (SCP) por leveduras utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono, selecionar a levedura mais promissora e otimizar a produção de biomassa e de proteína bruta.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1 SINGLE CELL PROTEIN (SCP)

A biomassa microbiana ou Single Cell Protein (SCP) refere-se à matéria seca proveniente do crescimento de microrganismos como leveduras, bactérias, fungos filamentosos e algas a partir de diferentes fontes de carbono e que pode ser utilizada como componente nutritivo para alimentação humana e animal (ANAPUMA; RAVINDRA, 2000; SISMAN et al., 2012). Segundo Molk et al. (2002), a biomassa microbiana é rica em proteínas com percentagem elevada de aminoácidos essenciais, vitaminas e outros nutrientes (Tabela 1 e Tabela 2). Apresenta vantagens em relação às proteínas animais e vegetais, pois o seu crescimento não é sazonal, não depende de clima, a produção é rápida, uma vez que o crescimento dos microrganismos é acelerado, e não requer extensa área para seu cultivo. Com isso, a produção de proteína microbiana tem se tornado uma fonte alimentar alternativa devido ao rápido crescimento da população e ao aumento da demanda por alimentos (RAJOKA et al., 2004).

Tabela 1: Composição nutricional dos principais grupos de microrganismos utilizados para produção de SCP em (% peso seco).

Composição	Bactéria	Alga	Levedura	Fungo filamentoso
Proteína	50-65	40-60	45-55	30-45
Lipídeos	1-3	7-20	2-6	2-8
Cinzas	3-7	8-10	5-10	9-14
Ácidos nucleicos	8-12	3-8	6-12	7-10

Fonte: MILLER; LITISKY (1976)

Tabela 2: Composição média de aminoácidos essenciais (AE) (%) de SCP de diferentes grupos de microrganismos.

SCP	Composição média de AE (%)											
	Arg	Cyt	His	Iso	Leu	Lys	Met	Phen	Thr	Tryp	Tyr	Val
Bacteria												
<i>Pseudomonas/Methylophilus ssp.</i>	3,67	0,41	1,50	3,34	5,43	4,30	1,75	3,07	3,29	0,80	2,70	4,16
Fungo filamentoso												
<i>Aspergillus oryzae</i>	1,91	0,34	0,82	1,54	2,55	1,95	0,49	1,20	1,57	0,49	2,14	1,87
<i>Rhodotorula pilimanae</i>	3,53	0,11	1,25	2,01	3,32	4,11	1,19	1,60	2,52	0,15	1,27	2,53
Levedura												
<i>S. cerevisiae</i>	2,14	0,60	1,14	2,22	3,25	3,31	0,83	1,95	2,32	0,62	1,51	2,48
<i>Torula utilis</i>	2,62	0,60	1,36	2,28	3,51	3,77	0,79	2,93	2,62	0,51	2,00	2,93
<i>Candida sp.</i>	2,10	0,57	1,02	2,50	3,92	3,30	1,02	2,10	2,67	0,68	1,88	2,79
Cultura mista de fungos												
<i>Geotrichum candidum, Hansenula anomala, e Candida crusei</i>	2,24	0,56	1,04	2,33	3,63	3,27	0,53	3,15	2,39	-	1,91	2,81
Alga												
<i>Spirulina maxima</i>	3,93	0,24	1,09	3,63	4,84	2,79	0,85	3,02	2,79	0,85	2,42	3,93

Fonte: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB468E/AB468E05.htm>

O termo Single Cell Protein foi criado em 1966 por Carrol Wilson para introduzir a ideia de utilizar a biomassa microbiana como alimento, entretanto a produção de proteína microbiana já havia sido empregada pela primeira vez durante a Primeira Guerra Mundial na Alemanha em virtude da escassez de alimentos convencionais. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi cultivada em melaço de cana-de-açúcar para o consumo humano e cerca de 60% da importação de alimentos foi reduzida no país. Além disso, durante a Segunda Guerra Mundial, o sulfito, resíduo da fabricação de papel, foi utilizado como substrato para produção de biomassa por *Candida utilis* (conhecida

anteriormente como *Torula* ou *Torulopsis utilis*) (GARCÍA–GARYBAL et al., 2014).

1.1 Microrganismos utilizados para produção de SCP

A ideia da utilização de microrganismos como componente nutritivo pode ser rejeitada por algumas pessoas, entretanto, os microrganismos são amplamente empregados na biotecnologia de alimentos para produção de queijos, produtos lácteos fermentados, soja fermentada (NALAGE et al., 2016), dentre muitos outros. Uma variedade de microrganismos como bactérias, fungos, incluindo as leveduras, e algas, são utilizados para produzir SCP e algumas espécies estão apresentadas na Tabela 3. Microalgas como *Spirulina* e *Chlorella* e algas marrons possuem teor de proteína em torno de 40%, ácidos graxos, carotenoides, vitaminas, sais minerais (ZHENMING et al., 2006; GOUVEIA et al., 2008), e teor de ácidos nucléicos, relativamente baixo, entre 3-8% (NASSERI et al., 2011). As microalgas são utilizadas na alimentação animal principalmente na aquicultura (moluscos, camarões, peixes) e na alimentação humana como suplementos, disponíveis em comprimidos, capsulas, aditivos alimentares, entre outros (ZHENMING et al., 2006; GOUVEIA et al., 2008).

Embora as proteínas provenientes de algas sejam de alta qualidade e comparáveis às proteínas vegetais (GHASEMI; RASOUL-AMINI; MOROWVAT, 2011), é considerada pouco atrativa quando comparada com a SCP de leveduras e de bactérias (RASOUL-AMINI et al., 2009) uma vez que apresentam parede celular rígida, que corresponde a cerca de 10 % do seu peso seco celular, o que dificulta a sua digestão. Além disso, a produção geralmente ocorre ao ar livre o que favorece contaminações por bactérias e protozoários e depende de condições climáticas favoráveis para o seu cultivo (CHI et al., 2006; HARUN et al., 2010).

Tabela 3: Microrganismos e substratos utilizados para produção de SCP.

Microrganismos	Substrato	Conteúdo proteico (%)	Referência
Algas			
<i>Spirulina platensis</i>	Vinhaça de beterraba	53-57	Coca et al. (2015)
Fungos filamentosos			
<i>Aspergillus flavus</i>	Farelo de Arroz	10	Valentino et al. (2016)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Soro de queijo	34	Sisman et al. (2013)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de Arroz	11	Valentino et al. (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de processamento de fécula de batata	38	Liu et al. (2013), (2014)
<i>Fusarium venenatum</i>	Glicose (Produto: Quorn™)	44	Wiebe (2002)
Bactérias			
<i>Bacillus licheniformis</i>	Resíduos de processamento de fécula de batata	38	Liu et al. (2014)
<i>B. pumilis</i>	Resíduos de processamento de fécula de batata	46	Liu et al. (2013)
<i>Corynebacterium amoniagenes</i>	Glucose e frutose	61	Wang et al. (2013)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Resíduos de folha de borracha de látex	55-65	Kornochalert et al. (2014)
Leveduras			
<i>Candida crusei</i>	Soro de leite	48	Yadav et al. (2014)
<i>Candida tropicalis</i>	Melaço de soja	56	Gao et al. (2012)
<i>Candida utilis</i>	Cama de frango	29	Zhao et al. (2010)
<i>Chrysonilia sitophilía</i>	Lignina	39	Rodriguez et al. (1997)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Hidrolisado hemicelulósico de grãos da cervejaria	32	Duarte et al. (2008)

<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Soro de Queijo	43	Yadav et al. (2014), (2016)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Polpa de laranja, melão, grão de cervejaria	24	Aggelopoulos et al. (2014)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Inulina, glicerol bruto	48–54	Cui et al. (2011), Juszczuk (2013)

Fonte: Adaptado Ritala et al. (2017)

As bactérias geralmente apresentam maiores teores de proteínas bruta quando comparado com outros microrganismos empregados para produção de SCP como mostrado na Tabela 1. Entretanto, o uso de SCP bacteriana é limitado devido aos elevados teores de ácidos nucleicos em relação aos fungos e leveduras (ZHENMING et al., 2006; WANG et al., 2009). A ingestão de proteína microbiana contendo elevados teores de ácidos nucleicos pode ocasionar o desenvolvimento de doenças, como gota ou pedra nos rins em seres humanos, devido ao acúmulo de ácido úrico no corpo proveniente da degradação de purinas (YADAV et al., 2016). Entretanto, para os mamíferos, exceto monogástricos, reptéis e moluscos, o consumo de proteína microbiana com alto teor de ácidos nucleicos não representa problema, pois possuem as enzimas uricase ou urease que são capazes de degradar o ácido úrico em ureia ou amônia (NAJAFPOUR, 2007). A remoção ou redução de ácidos nucleicos para níveis aceitáveis (entre 1-11%) pode ser feita por tratamentos químicos (por exemplo, com cloreto de sódio, hidróxido de amônio e hidróxido de sódio) e enzimáticos (ribonuclease e desoxirribonuclease). O processo também pode aumentar a qualidade e a digestibilidade de SCP após a destruição da parede celular (ANUPAMA, RAVINDRA, 2000).

As características nutricionais da SCP fúngica são consideradas comparáveis com bactérias e leveduras, tendo como principal desvantagem de produção o crescimento lento dos fungos filamentosos (NIGAM; SINGH, 2014). Entretanto, diversos fungos filamentosos são estudados para produção de SCP, como apresentado na Tabela 3. A biomassa de fungos contém em torno de 30 a 50% de proteína bruta, teor de ácidos nucleicos de 1 a 10%, além de vitaminas do complexo B (NASSERI et al., 2011). O fungo filamento *Fusarium venenatum* é o microrganismo mais conhecido para a produção de SCP, sendo

comercializado como o produto Quorn™ ou micoproteína, uma fonte de proteína aprovada para alimentação humana (GILANI et al., 2003). A Micoproteína está disponível no mercado desde 1985 no Reino Unido, Europa e Estados Unidos, apresenta características semelhantes a carne como formato e consistência e valor nutricional semelhante a soja (NIGAM; SINGH, 2014).

Algumas leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus aureus* e espécies dos gêneros *Hansenula*, *Pichia* e *Torulopsis* podem ser utilizadas para produção de biomassa microbiana (ZHENMING et al., 2006; Gao et al., 2007). *Candida utilis* é amplamente utilizada como suplemento nutricional em rações para animais e *S. cerevisiae* é a única espécie de levedura totalmente aceitável para o consumo humano (BEKATOROU; PSARIANOS; KOUTINAS, 2006). Geralmente as leveduras possuem maior aceitabilidade para produção de SCP porque já são utilizadas para produção de alimentos comuns como pão e cerveja (GARCÍA-GARYBAI et al., 2014). Sua biomassa possui elevados teores de proteína, que pode substituir a farinha de peixe, além de ser fonte de vitaminas do complexo B, aminoácidos essenciais como lisina metionina, e leucina, minerais e outros componentes que podem estimular a resistência a doenças quando utilizadas em ração para animais marinhos (ZHENMING et al., 2006). Aproximadamente 50 a 52% do peso seco celular consiste em proteínas, 30 a 37% de carboidratos, 4–7% de lipídios, 6–8% de ácidos nucleicos e 7–8% de minerais (NASSERI et al., 2011). As leveduras possuem características que favorecem a sua utilização na produção de SCP como crescimento rápido, células grandes, capacidade de floculação, o que facilita a recuperação durante o cultivo, e geralmente crescem em pH ácido que dificulta contaminação por bactérias (GAO et al., 2007; SHENG et al., 2007) e taxa de digestão de proteínas geralmente superior a 80% (ANAPUMA; RAVINDRA, 2000).

1.2 Produção de Single Cell Protein (SCP)

A produção de SCP a partir de resíduos agroindustriais torna o processo economicamente viável pois reduz os custos de produção e ajuda no processo de reciclagem de resíduos (ANAPUMA; RAVINDRA, 2000). Com isso, diversos

substratos vêm sendo utilizados para produção de biomassa com alto teor de proteínas. Como observado nos trabalhos de Gao, Li, Liu (2012), que avaliaram as condições ótimas para maximizar a produção de proteína microbiana por *Candida tropicalis* CGMCC a partir de melão de soja. Sob condições ótimas, utilizaram 70 g/L de melão de soja, 0,2 g/L de extrato de levedura, e 0,03 g/L de CaCl_2 , pH 5,5, 30 °C, 200 rpm, sendo obtidas 10,83 g/L de biomassa seca e 6,11 g/L de proteínas totais após 30 horas de fermentação. Sun et al. (2012) isolaram a levedura *Wickerhamomyces anomalus* HN1-2 e cultivaram a cepa em fermentador de 5L contendo 30 g/L de glicose, 40 g/L de soja hidrolisada em pH 4,0, obtendo a produção de 7,3 g/L de biomassa e teor de proteína bruta de 56 g/100g. A biomassa de *W. anomalus* HN1-2 continha aminoácidos essenciais, como lisina (7,8%), metionina (1,8%) e leucina (9,0%). Gao et al. (2007) obtiveram a levedura marinha *Cryptococcus aureus* G7 e avaliaram o efeito das concentrações de extrato de alcachofra de Jerusalém suplementado com diferentes fontes de nitrogênio para a produção de proteína bruta. Os autores verificaram que utilizando 60 g/L de extrato de alcachofra de Jerusalém e 40 g/L de hidrolisado de farelo de soja, em pH 5,0, a 28 °C e 170 rpm, obteve-se 53,0 g de proteína bruta/100 g de peso seco celular. Após análises do perfil nutricional da biomassa, constataram aminoácidos como lisina (2,6%), metionina (3,1%) e leucina (9,1%), que são descritos por estimular o crescimento em peixes marinhos. Verificaram também 2,1 mg/100 g de peso seco celular de vitamina C e baixo teor de ácidos nucleicos (2,1%).

A cultura mista de microrganismos também é empregada para converter resíduos agroindustriais em biomassa com alto teor de proteínas (PAUL et al., 2002). Yadav et al. (2014) avaliaram a produção de SCP por meio da fermentação de soro de leite empregando cultura mista de *Kluyveromyces marxianus* e *Candida krusei*. Utilizando uma concentração 17,5 g/L de lactose, 40 °C e pH 3,5 para evitar contaminação por bactérias, obtiveram 47,4 % de proteínas com produtividade de 0,38 g/L/h. Ahmed; Ahamad; Hashmi (2010) avaliaram diferentes concentrações de palha de milho como fonte de carbono (0% a 8% p/v) na produção de proteína bruta pela cultura mista *Arachniotus* sp., e *Candida utilis* e constataram que a produção de proteína bruta atingiu máxima produção utilizando 6% (p/v) de palha de milho e relação de Nitrogênio: Carbono (C:N) 30:1. Empregando as condições otimizadas e

variando apenas a aeração em fermentações em reatores de 75 L, a biomassa obtida continha aproximadamente 23,51% de proteína bruta com perfil de 16 aminoácidos. Hashem et al. (2014) relataram que o pH levemente ácido (4,0-6,0) e temperatura a 25°C foram as condições ótimas para a produção de biomassa pelas leveduras *Hanseniaspora uvarum* KKUY-0084 e *Zygosaccharomyces rouxii* KKUY-0157. Além disso, a adição de diferentes concentrações de Mg ou Mn induziu a produção de biomassa das duas cepas, evidenciando a importância de metais para melhorar o crescimento das leveduras. Geralmente, a adição de elementos como potássio, manganês, zinco, ferro são importantes para o crescimento de muitos microrganismos (NASSERI et al. 2011), uma vez que são cofatores de coenzimas importantes no metabolismo celular.

Li et al. (2009) empregaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar as condições de cultivo para o crescimento de *Candida utilis* em águas residuais de bambu hidrolisado. Os autores verificaram que o pH inicial, o tempo de fermentação e a concentração de extrato de levedura foram os principais fatores que influenciaram na produção de biomassa por *C. utilis*. Após a otimização, a biomassa de *C. utilis* foi aumentada de 8,48 para 14,82 g/L. Rajoka et al. (2004) observaram que a biomassa formada por *C. utilis* utilizando farelo de arroz como substrato, continha 27,8% de proteína bruta, 0,27 % de RNA e mais de 16 aminoácidos, sendo que a quantidade de sete aminoácidos essenciais são comparáveis com o padrão de referência da FAO (1957).

Zhao, Zhang, Zhang (2010) estudaram a produção de SCP pelas cepas *C. utilis* 1769, *C. tropicalis* 1253, *S. cerevisiae* 1027 e *S. cerevisiae* 1335 a partir de pó de capsicum gerado da extração de capsantina da China. As cepas do gênero *Candida* produziram mais proteína bruta que as do gênero *Saccharomyces*. *C. tropicalis* 1253 foi a levedura que apresentou maior produção de biomassa (14 g/L com 48% de proteína bruta). Além disso, os autores observaram que a biomassa produzida por *C. utilis* 1769 continha todos os aminoácidos essenciais que podem ser utilizados em rações para alimentação animal. De acordo com Pires et al. (2016), a biomassa formada pelas cepas CCMA 0137 e CCMA 0188 de *S. cerevisiae* utilizando vinhaça como substrato apresentou 53,31% de proteína, 2,3% de ácidos nucleicos e

todos aminoácidos essenciais, exceto metionina e cisteína. Além disso, verificaram que a biomassa possuía dez aminoácidos não essenciais, sendo que a prolina foi o mais abundante (32,07%). De acordo com as características nutricionais a biomassa pode ser utilizada como fonte de proteína, principalmente para alimentação de peixes.

2 GLICEROL BRUTO

O glicerol bruto ou glicerina é gerado a partir da produção de biodiesel numa proporção de 10 % (v/v) e é uma mistura constituída por glicerol e impurezas como, metanol ou etanol, sabão, ácidos graxos livres e triglicerídeos (LUO, et al., 2016). Sua composição pode variar de acordo com o processo de produção do biodiesel, matéria prima e catalisador utilizado (RODRIGUES, et al., 2016). É um líquido viscoso e apresenta cor variando de amarelo-claro a castanho-escuro (CIRIMINNA et al., 2014). O glicerol, ou 1,2,3-propanotriol, é um poliálcool cuja fórmula estrutural está apresentada na Figura 1.

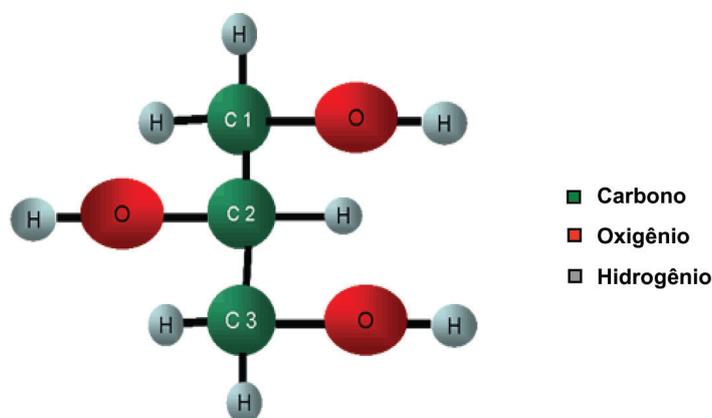


Figura 1: Estrutura química do glicerol (ARRUDA et al., 2007).

O glicerol bruto geralmente é refinado a glicerol puro, que possui diversas aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (WANG et al., 2001; CHATZIFRAGKOU et al., 2011). Entretanto, o processo de purificação apresenta alto custo, pois requer elevado consumo de energia tornando este processo inviável para pequenos e médios produtores de biodiesel (UPRETY et al., 2016). Por outro lado, o excesso de glicerol bruto no

mercado representa um problema para as indústrias, pois não pode ser descartado no meio ambiente sem tratamento adequado devido ao seu efeito poluente. Além disso, devido ao alto teor de impurezas, como sais e metanol possui aplicações limitadas na indústria química e farmacêutica (CHATZIFRAGKOU et al., 2010; METSOVITI et al., 2012). Assim, o desenvolvimento de processos de baixo custo para converter o glicerol em produtos industriais pode ser uma alternativa para a valorização biotecnológica deste resíduo, além de agregar valor à produção de biodiesel (DHARMADI; MURAKA; GONZALES, 2006; YANG; HANNA; SUN, 2012).

2.1 Fermentação microbiana do glicerol

Para da Silva et al. (2015), a assimilação do glicerol pelos microrganismos envolve o transporte passivo e transporte ativo através da membrana plasmática. Em bactérias, o glicerol é transportado através da difusão facilitada, enquanto que para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*, ocorre por difusão simples. No entanto, *C. utilis* apresenta permeabilidade para o glicerol cerca de 10^5 vezes maior que *S. cerevisiae* (DILLS et al., 1980; GANCEDO; GANCEDO; SOLS, 1968). Segundo Neves; Lages; Lucas (2004) mecanismos de transporte ativo, do tipo simporte glicerol/ H^+ e simporte glicerol/ Na^+ dependentes de ATP, também podem ser descritos em várias espécies de leveduras.

O glicerol pode ser metabolizado por leveduras através de duas rotas: via dihidroxiacetona ou a via glicerol-3-fosfato (AMARAL et al., 2009). A primeira é catalisada pelas enzimas glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.6) e dihidroxiacetona cinase (EC 2.7.1.29), e a segunda via envolve as enzimas glicerol cinase (EC 2.7.1.30), codificada pelo gene *gut1*, e glicerol 3-fosfato desidrogenase (EC 1.1.5.3) mitocondrial dependente de FAD codificada por *gut2* (WANG et al., 2001; RIVALDI et al., 2012). Em *S. cerevisiae*, o glicerol é fosforilado pela glicerol cinase (EC 2.7.1.29), formando glicerol-3-fosfato, que pode ser usado tanto como um precursor para a biossíntese de lipídios como para a conversão em dihidroxiacetona fosfato, que é uma molécula intermediária que pode ser transformada em gliceraldeído-3- fosfato pela triose fosfato isomerase no centro da rota metabólica, ou pode servir como substrato

para a síntese de outros metabólitos (GRAUSLUND; LOPES; RONNOW, 1999; AMARAL et al., 2009).

Baseado nas diferentes rotas metabólicas, o glicerol bruto vem sendo empregado para produção de diversos compostos com valor agregado. Como, por exemplo, os ácidos orgânicos, que podem ser utilizados em indústrias de alimentos e farmacêuticas (LEVISON; KURTZMAN; KUO, 2007; DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; CHATZIFRAGKOU et al., 2011), butanol, 1,3-propanodiol (DE SOUZA et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2016; YANG et al., 2017), lipídeos microbianos para produção sustentável de biodiesel (LIANG et al., 2010; SAENGE et al., 2011; HUANG et al., 2013), etanol (LIU; JENSEN; WORKMAN, 2012; ADNAN et al., 2014; THAPA et al., 2015), biomassa microbiana (TACCARI et al., 2012; JUSZCZYK et al., 2013), entre diversos outros (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Uma opção para a utilização do glicerol é sua fermentação para produção de biomassa microbiana com alto teor de proteínas que pode ser destinada para formulação de rações animais. De acordo com Juszczuk et al. (2013), a biomassa formada pela cepa *Yarrowia lipolytica* a partir de glicerol como fonte de carbono, apresenta elevada quantidade de proteína bruta (42-45%) e aminoácidos que podem ser utilizados na alimentação animal como componente nutritivo em ração. Dessa forma, é interessante estudar o potencial do glicerol bruto para a produção de biomassa com alto teor de proteínas, buscando aplicações para o glicerol bruto.

REFERÊNCIAS

AGGELOPOULOS, T. et al. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. **Food Chemistry**, v. 145, p. 710–716, 2014.

ADNAN, N. et al. Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. **Renewable Energy**, v. 66, p. 625-633, 2014.

AHMED, S.; AHMAD, F.; HASHMI, A. S. Production of microbial biomass protein by sequential culture fermentation of *Arachniotus* sp., and *Candida utilis*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, p. 1225-1234, 2010.

AMARAL, P. F. F. et al. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.

ANAPUMA; RAVINDRA. Value-added food: Single Cell Protein. **Bioresource Technology**, v. 18, p. 459-479, 2000.

ARRUDA, P. V. et al. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v.1, p. 57-62, 2007.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A.A. Production of food grade yeasts, **Food Technology Biotechnology**, v.44, p. 407-415, 2006.

CIRIMINNA, R. et al. Understanding the glycerol market. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 1432-1439, 2014.

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, p. 1097-1108, 2011.

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, p. 76-84, 2010.

COCA, M. et al. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2014.

CUI, W. et al. Direct conversion of inulin into single cell protein by the engineered *Yarrowia lipolytica* carrying inulinase gene. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1442–1448, 2011.

DA SILVA, G. P.; de Lima, C.; Contiero. Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. **Catalysis Today**, v.257, p. 259-266, 2015.

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

DE SOUZA, E. A. et al. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3- propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1. **Renewable Energy**, v. 72, p. 253-257, 2014.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, p. 821-826, 2006.

DILLS, S. S. et al. Carbohydrate Transport in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 44, p. 385-418, 1980.

DUARTE, L. C. et al. Yeast biomass production in brewery's spent grains hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 148, p.119-129, 2008.

FAO. The Nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - A training manual 2. Nutrient sources and composition. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB468E/AB468E00.htm#TOC>. Acesso em: 06 Ago. 2018.

FAO. Ad hoc Expert 'Committee, Energy and Protein requirements': **World Health Publishing**. p. 35-36, 1957.

GANCEDO, C.; GANCEDO, J.M.; SOLS, A. et al. Isolation and characterization of mutants from *Schyzosaccharomyces pombe* defective in glycerol catabolism. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, v. 159, p. 171-174, 1986.

GAO, L. et al. Single-cell protein production from *Jerusalem artichoke* extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 77, p. 825-832, 2007.

GAO, Y.; LI, D.; LIU, Y. Production of single cell protein from soy molasses using *Candida tropicalis*. **Annals Microbiology**, v. 62, p. 1165-1172, 2012.

GARCIA-GARIBAY, M. Yeasts and bacteria. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 3, p. 431-438, 2014.

GHASEMI, Y.; RASOUL-AMINI, S.; MOROWVAT, M.H. Algae for the production of SCP. **Bioprocess Sciences and Technology**. 1 ed. Irã: Min-Tze Liong, 2011. cap. 7, 163-183.

GILANI, G.S.; LEE, N. PROTEIN | Sources of food-grade protein. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2 ed. 2003. Canada: Academic Press, 2003, 4873-4879.

GOUVEIA, L. et al. "Microalgae in novel food products". **Food Chemistry Research Developments**. 1 ed. New York: Nova Science Publishers, 75–111, 2008.

GRAUSLUND, M.; LOPES, J. M.; RONNOW, B. Expression of GUT, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source dependent fashion. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 4391-4398, 1999.

HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 1037-1047, 2010.

HASHEM, M. et al. Production of single-cell protein from wasted date fruits by *Hanseniaspora uvarum* KKUY-0084 and *Zygosaccharomyces rouxii* KKUY-0157. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 1505-1511, 2014.

HUANG, C. et al. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 129-139, 2013.

JUSZCZYK, P. et al. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 124-131, 2013.

KORNOCHALERT, N. et al. Use of *Rhodopseudomonas palustris* P1 stimulated growth by fermented pineapple extract to treat latex rubber sheet wastewater to obtain single cell protein. **Annals Microbiology**, v. 64, p. 1021-1032, 2014.

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

LIANG, C.Y. et al. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7581-7586, 2010.

LI, M. et al. Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 101-107, 2009.

LIU, B. et al. Production of single-cell protein with two-step fermentation for treatment of potato starch processing waste. **Cellulose**, v. 21, p. 3637-3645. 2014.

LIU, B. et al. Towards industrially feasible treatment of potato starch processing waste by mixed cultures. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 171, p. 1001-1010, 2013.

LIU, X.; JENSEN; PR.; WORKMAN, M. Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 579-586, 2012.

LUO, X. et al. Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 144-154, 2016.

METSOVITI, M. et al. Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel derived raw glycerol into 1,3 propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, p. 57-68, 2012.

MILLER, B.M.; LITSKY, W. **Single Cell Protein in Industrial Microbiology**. 1 ed. New York: McGraw-Hill Book, 1976.

MOLCK, A. et al. Immunotoxicity of nucleic acid reduced BioProtein - a bacterial derived single cell protein - in Wistar rats. **Toxicology**, v. 174, p. 183-200, 2002.

NAJAFPOUR, G. Single-Cell Protein. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 1 ed. 2007. cap. 14, 332-341.

NALAGE, D.N. et al. Single cell proteins. **Encyclopedia of Food and Health**, v. 1, p. 790-794, 2016.

NASSERI, A.T. et al. Single Cell Protein: Production and Process. **American Journal of Food and Technology**, v.6, p. 103-116, 2011.

NEVES, L.; LAGES, F.; LUCAS, C. New insights on glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBES Letters**, v. 565, p. 160-162, 2004.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Mycelial Fungi. **Single Cell Protein**. v.3, p. 2034-2044, 2014.

PAUL, D. et al. Nutritional profile of food yeast *Kluyveromyces fragilis* biomass grown on whey. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 97, p. 209-218, 2002.

PIRES, J.F. et al. Mixed yeasts inocula for simultaneous production of SCP and treatment of vinasse to reduce soil and fresh water pollution. **Journal of Environmental Management**, v. 182, p. 455-463, 2016.

RAJOKA, M. I. et al. Production of single cell protein from rice polishings using *Candida utilis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 297-301, 2004.

RASOUL-AMINI, S. et al. PCR amplification of 18S rRNA, Single cell protein production and fatty acid evaluation of some naturally isolated microalgae. **Food Chemistry**, v. 116 p. 129-136, 2009.

RITALA, A. et al. Single Cell Protein-State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001- 2016. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 1-18, 2016.

RIVALDI, J. D. et al. Biotechnological utilization of biodiesel-derived glycerol for the production of ribonucleotides and microbial biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 2054-2067, 2012.

RODRIGUES, C. V. et al. Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, p. 14641-14651, 2016.

RODRIGUEZ, A. et al. 1,3-Propanediol production from glycerol with a novel biocatalyst *Shimwellia blattae* ATCC 33430: Operational conditions and kinetics in batch cultivations. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 830-837, 2016.

RODRIGUEZ, J. et al. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysondia sitophila*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 62, p. 233-242, 1997.

SAENGE, C. et al. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 210-218, 2011.

SHENG, J. et al. Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 805-811, 2007.

SISMAN, G. et al. Single-cell protein as an alternative food for zebrafish, *Danio rerio*: a toxicological assessment. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, p. 792-799, 2012.

SUN, H.Y. et al. Simultaneous production of single cell protein and killer toxin by *Wickerhamomyces anomalus* HN1-2 isolated from mangrove ecosystem. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2512-56, 2012.

TACCARI, M. et al. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresouce Techonology**, v. 110, p. 488-495, 2012.

THAPA, L.P. et al. Improved bioethanol production from metabolic engineering of *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 2051-2060, 2015.

UPRETY, B. K., et al. Biodiesel production using heterogeneous catalysts including wood ash and the importance of enhancing byproduct glycerol purity. **Energy Conversion and Management**, v. 112, p. 191-199, 2016.

VALENTINO, M. J. G.; GANADO, L. S.; UNDAN, J. R. Single cell protein potential of endophytic fungi associated with bamboo using rice bran as substrate. **Advances in Applied Science Research**, v. 7, p. 68-72, 2016.

WANG, F. et al. Genetic Modification of the Marine-Derived Yeast *Yarrowia lipolytica* with High-Protein Content Using a GPI-Anchor-Fusion Expression System. **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 1297-1303, 2009.

WANG, Z. et al. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201-223, 2001.

WANG, J. P. et al. Amino acid digestibility of single cell protein from *Corynebacterium ammoniacum* genes in growing pigs. **Animal Feed Science Technology**, v. 180, p. 111-114, 2013.

WIEBE, M. G. Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 421-427, 2002.

YADAV, J. S. S. et al. Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 119-127, 2014.

YANG, F.; HANNA, M. A; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1-10, 2012.

YADAV, S. et al. Food-grade single-cell protein production, characterization and ultrafiltration recovery of residual fermented whey proteins from whey. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, p. 156-165, 2016.

YANG, X. et al. Repeated batch production of 1,3-propanediol from biodiesel derived waste glycerol by *Klebsiella pneumoniae*, **Chemical Engineering Journal**, v. 314, p. 660-669, 2017.

ZHAO, G.; ZHANG, W.; ZHANG, G. Production of single cell protein using waste capsicum powder produced during capsanthin extraction. **Applied Microbiology**, v. 50, p. 187-191, 2010.

ZHENMING, Z. et al. Marine Yeasts and their applications in mariculture. **Journal of Ocean University of China**, v. 5, p. 251-256, 2006.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE SINGLE CELL PROTEIN (SCP) POR *Wickerhamomyces anomalus* CCC32 A PARTIR DE GLICEROL BRUTO

PRODUÇÃO DE SINGLE CELL PROTEIN (SCP) POR *Wickerhamomyces anomalus* CCC32 A PARTIR DE GLICEROL BRUTO

Jucilene Pinto da Silva¹, Gervásio Paulo da Silva², Márcia Luciana Cazetta³

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas; ²Universidade Estadual do Estado da Bahia; ³Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas (CETEC)-UFRB

Resumo:

Este trabalho teve como objetivos avaliar a produção de Single Cell Protein (SCP) por leveduras utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono, selecionar a levedura mais promissora e otimizar a produção de biomassa e de proteína bruta. As leveduras avaliadas neste estudo foram *Aureobasidium pullulans* EBJ31, *Candida (Metschnikowia) pseudointermedia* CAC01, *Rhodotorula mucilaginosa* CCC31, *Wickerhamomyces anomalus* CCC32 e *Trichosporon asahii* EPB13. *W. anomalus* CCC32 foi a cepa mais promissora para produção de SCP. A otimização da produção de biomassa e de proteína bruta foi realizada por meio da metodologia experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Após a otimização, a produção máxima de biomassa foi cerca de 20 g/L e a concentração de proteína bruta foi de 33% em 84 h, utilizando 25 g/L glicerol bruto, 3,5 g/L de NaNO₃ e 6,5 g/L de ureia, a 30 °C e 150 rpm. Dessa forma, o glicerol bruto mostrou-se como uma opção de substrato para produção de SCP por leveduras, sendo uma alternativa para agregar valor a esse resíduo. *W. anomalus* CCC32 apresentou características favoráveis para produção de SCP como crescimento rápido, alta produção de biomassa com alto teor de proteína bruta.

Palavras-chave: Biodiesel, resíduo agroindustrial, fungos, fermentação

1. Introdução

Single Cell Protein (SCP) refere-se às células secas de microrganismos como leveduras, fungos filamentosos, algas e bactérias que podem ser utilizados como fonte de proteína para alimentação humana e animal (Sisman et al., 2012; Najafpour, 2015). SCP possui muitas aplicações nas indústrias de alimentos por conter alto teor de proteína, alta porcentagem de aminoácidos essenciais, vitaminas e outros nutrientes como sais minerais (Anapuma and Ravindra, 2000; Gao, et al., 2007; Wang et al., 2009). Dessa forma, pode substituir fontes de proteínas convencionais como farelo de soja e farinha de peixe (Anapuma and Ravindra, 2000), tendo uma promissora aplicação

biotecnológica, tornando-se ainda mais vantajosa quando sua produção está associada à utilização de resíduos agroindustriais como substrato (Ponsano et al., 2003).

Algumas leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus aureus* e algumas espécies dos gêneros *Hansenula*, *Pichia* e *Torulopsis* podem ser utilizadas para produção de SCP. Sua biomassa possui elevados teores de proteína, além de ser fonte de vitaminas do complexo B, minerais e outros componentes descritos por estimular a resistência a doenças quando utilizadas em ração para animais marinhos (Zhenming et al., 2006). *S. cerevisiae* além de possuir alto teor de proteína bruta, apresenta perfil de aminoácidos semelhantes àqueles descritos na farinha de peixe podendo ser empregada na aquicultura (Vidakovic et al., 2015). Segundo Juszczak et al. (2013) a biomassa formada pela cepa *Yarrowia lipolytica* S6 produzida a partir de glicerol bruto como fonte de carbono, apresentou elevada quantidade de proteína bruta (42-45%) e aminoácidos como lisina, treonina e fenilalanina que podem ser utilizados na alimentação animal como componente nutritivo em ração.

A produção de SCP a partir de resíduos agroindustriais torna o processo economicamente atrativo, pois reduz os custos de produção e ajuda no processo de reciclagem de resíduos (Anapuma e Ravindra, 2000; Sisman et al., 2012). Geralmente, diversos substratos são utilizados para produção de SCP como melaço de cana-de-açúcar, soro de leite, vinhaça de beterraba, glicerol bruto, entre outros (Ritala et al., 2017). O glicerol bruto, subproduto gerado a partir da produção de biodiesel numa proporção de 10% (v/v), consiste em glicerol, sais (como potássio) e álcool residual (metanol ou etanol) (da Silva et al., 2015). O glicerol bruto pode ser refinado obtendo-se o glicerol puro, que é amplamente utilizado nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Galanakis, 2012; Uprety et al., 2016). Porém, o processo de refino requer elevado consumo de energia e apresenta alto custo, tornando esse processo inviável para pequenos e médios produtores de biodiesel (Uprety et al., 2016). Por outro lado, o seu descarte requer tratamento adequado, pois pode causar impactos ambientais, gerando custos adicionais à cadeia produtiva de biodiesel (Luo et al., 2016). Sendo assim, o desenvolvimento de processos para converter o glicerol bruto de baixo custo em produtos industriais é desejado, pois pode ser uma alternativa para a valorização biotecnológica deste resíduo, além de agregar valor à produção de biodiesel (Yang et al., 2012).

O glicerol bruto possui vantagens, como menor custo e grandes quantidades disponíveis, podendo ser utilizado em substituição a carboidratos tradicionais como sacarose, glicose e amido para obtenção de produtos de valor agregado como biomassa microbiana com alto teor de proteína bruta (Papanikolaou et al., 2008; Quin et al., 2017). Sendo assim, os objetivos desse trabalho foram avaliar a produção de Single Cell Protein (SCP) por leveduras utilizando o glicerol bruto como fonte de carbono, selecionar a levedura mais promissora e otimizar a produção de biomassa e de proteína bruta.

2. Material e Métodos

2.1 *Microrganismos e substrato*

As leveduras *Candida (Metschnikowia) pseudointermedia* CAC01, *Rhodotorula mucilaginosa* CCC31, *Wickerhamomyces anomalus* CCC32, *Aureobasidium pullulans* EBJ31 e *Trichosporon asahii* EPB13 foram obtidas da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos da Universidade do Estado da Bahia – Campus Senhor do Bonfim, Brasil. As cepas foram mantidas em glicerol P.A 40% (p/v) a -18 °C para preservação. O glicerol bruto utilizado nos experimentos era composto por 81% de glicerol (p/v) e foi obtido de uma usina de biodiesel localizada na cidade de Candeias, Bahia, Brasil.

2.2 *Seleção das leveduras para produção de biomassa e proteína bruta a partir do glicerol bruto*

A seleção das leveduras para produção de biomassa e de proteína bruta foi realizada com o meio de cultura Extrato de Malte (YM) modificado, contendo (g/L): extrato de levedura (3,0), extrato de malte (3,0), peptona (5,0) e glicerol bruto (20,0). O inóculo foi preparado cultivando-se cada cepa em 50 mL de meio, com agitação de 150 rpm, 30 °C, durante 24 h. Em seguida, 10% do inóculo foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio, em pH 5,0, ajustado com HCl 2 M. Os frascos foram incubados em shaker a 30 °C e 150 rpm por 96 h, sendo retiradas amostras a cada 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados

obtidos foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância pelo software R studio 3.3.4.

2.3 Efeito de fontes de nitrogênio para produção de biomassa e de proteína bruta

Diferentes fontes de nitrogênio foram avaliadas para a produção de biomassa e de proteína bruta pela levedura selecionada. Foi utilizado o meio com a seguinte composição (g/L): K_2HPO_4 (1,0), NaCl (1,0), $MgSO_4$ (0,2), glicerol bruto (20,0) e diferentes fontes de nitrogênio a 10 g/L: (extrato de levedura, milhocina, peptona, nitrato de sódio ($NaNO_3$), sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) e ureia). As fermentações foram realizadas em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio. Os frascos foram incubados em shaker a 150 rpm, a 30°C, por 24 h. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Scott-Knott a de 5% de significância pelo software R studio 3.3.4.

2.4 Métodos analíticos

Após o cultivo, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g/ 20 min e a biomassa foi utilizada para determinar o crescimento celular e o teor de proteína bruta, e o sobrenadante foi congelado para posterior análise de glicerol por HPLC. O crescimento celular foi determinado utilizando curva padrão relacionando a massa seca x densidade óptica (600 nm). Para determinar a concentração de proteína bruta, a biomassa foi lavada com água destilada e seca a 65 °C até obtenção de peso constante. Em seguida, 0,1 g da biomassa seca foi digerida em bloco digestor com uma mistura de 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 3,0 mL de peróxido de hidrogênio a 30 % (v/v), a 350 °C por 1,5 h. O teor proteico total da biomassa foi determinado pelo método fenol-hipoclorito, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (Weatherburn, 1967; Felker, 1977). Glicerol residual e etanol foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (HPLC Dionex modelo Ultimate 3000, Alemanha) equipado com detector RI e coluna Rezex ROA H⁺ (300 x 7,8 mm). A temperatura do forno foi mantida em 80 °C e fase móvel de H_2SO_4 0,005 M com fluxo de 0,6 mL/min.

2.5 Otimização da produção de biomassa e proteína bruta utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A otimização da produção de biomassa e de proteína bruta foi realizada empregando-se a Metodologia de Superfície de Resposta. A produção de biomassa (g/L) e a concentração de proteína bruta (%) foram as variáveis dependentes, e a concentração de glicerol bruto, NaNO₃ e ureia foram as variáveis independentes. Uma matriz de planejamento fatorial completo 2³ foi construída por meio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), resultando em 17 ensaios (Rodrigues e Iemma, 2009). Dois níveis foram selecionados, sendo um superior (+1) e um inferior (-1), além de dois pontos axiais (+1,68 e -1,68) e um ponto central (0) que foi realizado em triplicata. Este modelo é representado por uma regressão polinomial de segunda ordem, Equação (1):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

onde: y é a resposta predita da produção de biomassa e/ou produção de proteína bruta; X_1 , X_2 e X_3 são as formas codificadas (glicerol, NaNO₃ e ureia, respectivamente); b_0 refere-se ao ponto de interseção; b_1 , b_2 e b_3 são coeficientes lineares; b_{12} coeficiente de interação dupla; b_{11} , b_{22} e b_{33} são coeficientes quadráticos. Os valores dos níveis estudados foram calculados através da Equação (2):

$$X_n = (X - X_0) / X_{+1} - X_{-1}$$

Onde: X_n é o valor codificado; X é o valor real da variável independente; X_0 o valor real do ponto central; X_{+1} é o valor do nível superior; X_{-1} é o valor do nível inferior.

O inóculo utilizado nos ensaios do planejamento experimental foi preparado em frascos de Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio composto por (g/L): K₂HPO₄ (1,0), NaCl (1,0), MgSO₄ (0,2), extrato de levedura (1,0), NaNO₃ (5,0), ureia (5,0) e glicerol bruto (20,0), incubados em shaker a 150 rpm, a 30°C, por 24 h. Os ensaios fermentativos foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de composição descrita acima e inóculo a 10% (v/v), incubados em shaker nas mesmas condições utilizadas para o inóculo. A concentração de glicerol

bruto, de NaNO_3 e de ureia foram ajustados de acordo com cada ensaio do planejamento experimental (Tabela 2).

Os resultados apresentados pelo modelo experimental aplicado foram avaliados através do programa Statistica versão 7.1.

3. Resultados e Discussão

3.1 Seleção das leveduras para produção de biomassa e proteína bruta a partir do glicerol bruto

A cinética da fermentação do glicerol bruto pelas leveduras avaliadas durante 96 horas está apresentada na Fig. 1. Todas as leveduras, exceto *T. asahii* EPB13, utilizaram o glicerol bruto como fonte de carbono para produção de biomassa e proteína bruta. *W. anomalus* CCC32 consumiu todo substrato em aproximadamente 48 h, sendo que nas primeiras 24 h o glicerol foi utilizado para produção de biomassa, de proteína bruta e de etanol (2,82 g/L). Enquanto que *A. pullulans* EBJ31, *C. pseudointermedia* CAC01 e *R. mucilaginosa* CCC31 consumiram o glicerol após 72 h.

W. anomalus CCC32 foi a levedura que atingiu maior produção de biomassa, cerca de 21,5 g/L; já o crescimento celular de *A. pullulans* EBJ31, *C. pseudointermedia* CAC01 e *R. mucilaginosa* CCC31 foi mais lento, provavelmente devido ao consumo mais lento do glicerol. *T. asahii* EPB13 não consumiu o glicerol e foi a cepa que apresentou menor produção de biomassa (5,24 g/L), sugerindo que seu crescimento ocorreu a partir dos outros nutrientes do meio de cultivo.

Em relação à produção de proteína bruta, para todas as cepas, a produção máxima ocorreu em 24 h e não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre *A. pullulans* EBJ31, *C. (Metschnikowia) pseudointermedia* CAC01 e *W. anomalus* CCC32. No entanto, em 24 h *W. anomalus* CCC32 produziu aproximadamente o dobro de biomassa (12,97 g/L) diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das demais cepas, o que resulta em um rendimento maior de produção de proteína ($Y_{p/s}$ 0,05 g/g). Enquanto o $Y_{p/s}$ para *A. pullulans* EBJ31 e para as demais leveduras foi 0,02 g/g e 0,01 g/g, respectivamente.

Considerando que *W. anomalus* CCC32 apresentou rápido crescimento em meio contendo glicerol bruto, melhores resultados para a produção de biomassa, consumo de glicerol e melhor rendimento na produção de proteína, essa cepa foi selecionada para os testes de otimização da produção de biomassa e de proteína bruta.

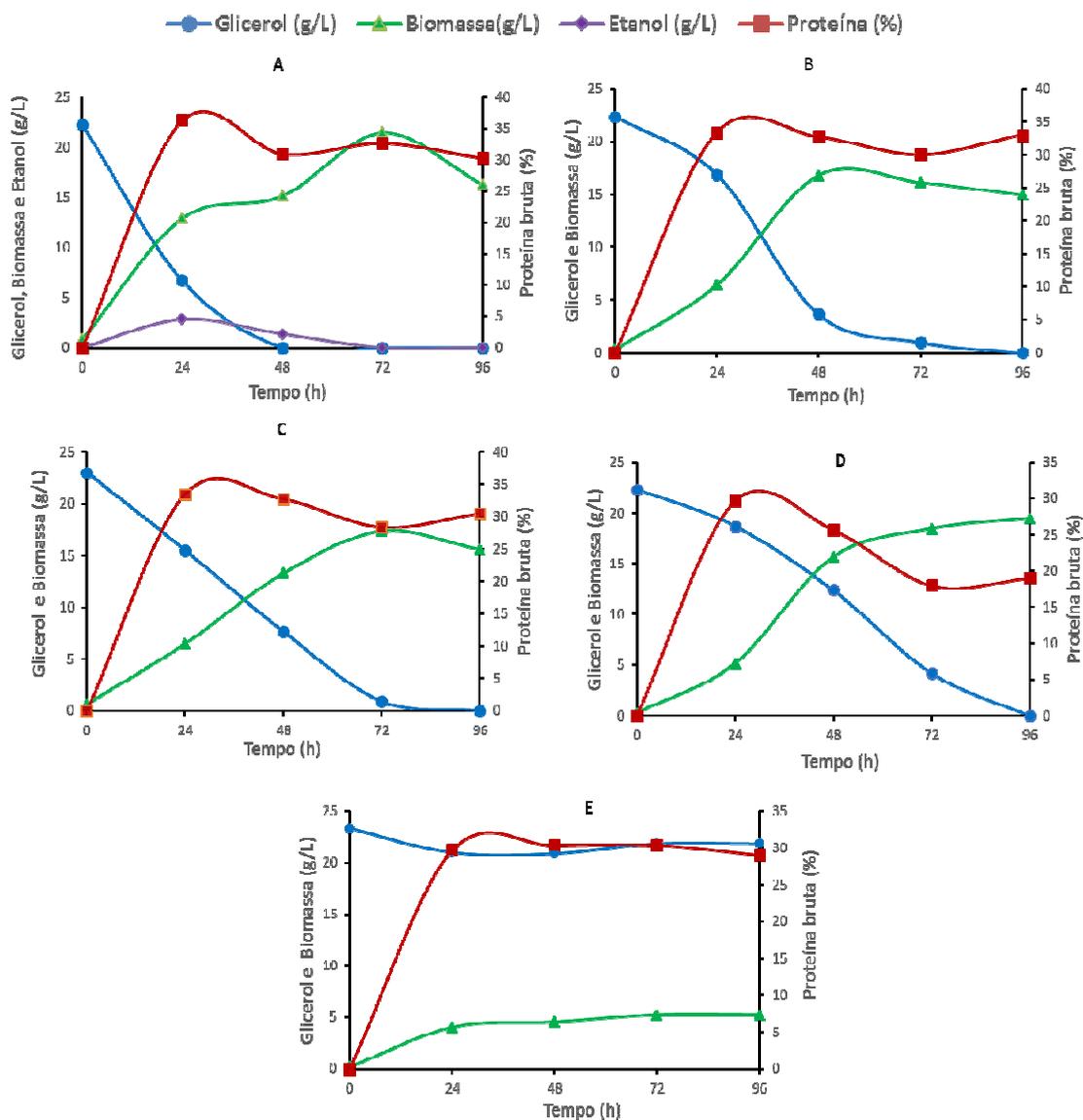


Fig. 1- Fermentação do glicerol bruto por *W. anomalous* CCC32 (A), *A. pullulans* EBJ31 (B), *(Metschnikowia) pseudointermedia* CAC01 (C), *R. mucilaginosa* CCC31 (D) e *T. asahii* EPB13 (E) a 30°C, 150 rpm durante 96 h.

W. anomalous (anteriormente *Hansenula anomala* e *Pichia anomala*) possui diversas aplicações com interesse biotecnológico e industrial. Essa levedura tem sido empregada no controle biológico de frutas (Olstorpe et al., 2010; Oro et al., 2014) certificada pela European Food Safety Authority (EFSA) (Cappelli et al., 2014), na produção de biocombustíveis (Walker, 2011), polihidroxialcanoatos, também conhecidos como plástico biodegradável (Ojha e Das, 2018), biossurfactantes (Souza et al., 2018), compostos aromáticos e sensoriais que melhoram o sabor de alimentos como

cacau e chocolate (Koné et al., 2016), cerveja (Basso et al., 2016), alimentos orientais (Zha et al., 2018), entre outros. Além disso, essa levedura é classificada no nível de biossegurança 1, o que a torna segura para as mais diversas aplicações industriais (Sundg e Melin, 2010).

3.2 Fontes de nitrogênio para produção de SCP por *W. anomalous* CCC32

Li et al. (2017) afirmaram que diversas fontes de nitrogênio, como amônia, ureia, peptona, extrato de levedura, milhocina, entre outros, podem aumentar o crescimento celular de leveduras, porém, nem todas as fontes contribuem de forma semelhante. Portanto, o efeito de diferentes fontes de nitrogênio foi avaliado para produção de SCP por *W. anomalous* CCC32 e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se que o extrato de levedura levou à maior produção de biomassa (11,65 g/L) e concentração de proteína bruta (37,33%), diferindo estatisticamente das outras fontes de nitrogênio ($p < 0,05$). O extrato de levedura contém vitaminas, minerais e aminoácidos que favorecem o crescimento celular (Li et al., 2011). No entanto, o nitrato de sódio também favoreceu a produção de biomassa (10,37 g/L), não diferindo estatisticamente da peptona ($p > 0,05$). Por outro lado, a ureia favoreceu a produção de proteína bruta, que atingiu 32,5%, produzindo 4,54 g/L de biomassa.

Tabela 1- Biomassa (g/L) e teor de proteína (%) por *W. anomalous* CCC32 após 24 de fermentação utilizando diferentes fontes de nitrogênio.

Fonte de nitrogênio	Biomassa (g/L)	Proteína bruta (%)
Extrato de levedura	11,65 *a	37,33 a
Nitrato de sódio	10,37 b	22,67 e
Peptona	10,18 b	29,67 c
Milhocina	6,75 c	13,33 f
Sulfato de amônio	6,13 d	26,67 d
Ureia	4,54 e	32,50 b

*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

Embora a maior produção de SCP por *W. anomalus* CCC32 tenha sido com o extrato de levedura, a produção com o nitrato de sódio e a ureia também apresentou bons resultados. Enquanto que o nitrato de sódio favoreceu a produção de biomassa, a ureia favoreceu a produção de proteína bruta por *W. anomalus* CCC32. Assim, devido ao alto custo comercial do extrato de levedura (e da peptona) que pode elevar o custo de produção de SCP, combinações entre o nitrato de sódio e ureia foram utilizadas como fonte de nitrogênio nos ensaios fermentativos.

Ahmed, Hahmad e Hashimi (2010) e Ali et al. (2009) também relataram que a ureia favoreceu a produção de proteína bruta em leveduras. Gao et al. (2007) e Gao et al. (2012), avaliando diferentes fontes de nitrogênio para produção de SCP, verificaram que o extrato de levedura e a peptona também foram as melhores fontes de nitrogênio para a produção de SCP por diferentes leveduras. Entretanto, Gao et al. (2007) substituíram o extrato de levedura por hidrolisado de farelo de soja como fonte de nitrogênio nos experimentos de otimização por *Cryptococcus aureus* G7a. Para os autores a utilização de extrato de levedura e de peptona em larga escala aumenta muito o custo de produção de SCP devido ao alto valor comercial desses meios e o uso de substratos de baixo custo é um dos aspectos mais importantes para produção de SCP.

3.3 Otimização da produção de biomassa e proteína bruta utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Os resultados obtidos no DCCR 2³ mostraram a influência das variáveis para produção de biomassa e de proteína bruta por *W. anomalus* CCC32 após 24 h de fermentação (Tabela 2). Pode-se observar que maior produção de biomassa foi obtida no ensaio 7 (9,74 g/L) e maior concentração de proteína bruta nos ensaios 1, 5, 8 (30%).

De acordo com as análises estatísticas, o glicerol bruto e a ureia apresentaram influência significativa, em seus termos lineares, para produção de biomassa ($p < 0,05$). Entretanto, somente o glicerol bruto apresentou influência significativa na produção de proteína bruta, em seu termo quadrático (Tabela 3). O glicerol geralmente é transportado pela membrana celular por difusão passiva em altas concentrações e em baixas concentrações, por difusão facilitada (Sun et al., 2008). O efeito significativo do glicerol em baixas concentrações pode ser explicado devido à pouca quantidade de substrato disponível para reações enzimáticas (da Silva et al., 2015). E em concentrações elevadas, ocorre o aumento da pressão osmótica no meio e, conseqüentemente, redução no crescimento celular (Bzducha-Worobel et al., 2015).

Ainda, por se tratar da utilização de glicerol bruto neste estudo, a presença de contaminantes pode influenciar negativamente nos resultados nas maiores concentrações, sendo observada a redução da produção de biomassa por *W. anomalus* CCC32 quando a concentração de glicerol bruto ficou acima de 28 g/L. Kurcz et al. (2018) também relataram influência significativa da concentração de glicerol na produção de biomassa e de proteína bruta por *C. utilis* e verificaram que a máxima produção de SCP foi obtida empregando 5% (p/v) de glicerol em meio contendo água de batata como fonte de nitrogênio e minerais. Dos Santos et al. (2012) observaram que a concentração de glicerol bruto teve efeito significativo somente para produção de biomassa por *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423, porém não teve efeito significativo para produção de proteína bruta.

Tabela 2- Matriz do delineamento contendo valores codificados, valores reais (em parênteses), e os resultados obtidos para produção de biomassa e proteína bruta.

Ensaio	Glicerol (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	Ureia (g/L)	Biomassa (g/L)	Proteína (%)
1	-1 (28)	-1 (3,5)	-1 (3,5)	8,6	30
2	+1 (52)	-1 (3,5)	-1 (3,5)	8,08	26
3	-1 (28)	+1 (6,5)	-1 (3,5)	8,17	28
4	+1 (52)	+1 (6,5)	-1 (3,5)	7,7	28
5	-1 (28)	-1 (3,5)	+1 (6,5)	9,34	30
6	+ (52)	-1 (3,5)	+1 (6,5)	8,47	23
7	-1 (28)	+1 (6,5)	+1 (6,5)	9,74	26
8	+1 (52)	+1 (6,5)	+1 (6,5)	8,77	30
9	-1,68 (20)	0 (5)	0 (5)	8,88	29
10	+1,68 (60)	0 (5)	0 (5)	8,00	27
11	0 (40)	-1,68 (2,5)	0 (5)	7,69	26
12	0 (40)	+1,68 (7,5)	0 (5)	9,20	22
13	0 (40)	0 (5)	-1,68 (2,5)	7,90	25
14	0 (40)	0 (5)	+1,68 (7,5)	8,57	21
15	0 (40)	0 (5)	0 (5)	8,77	24
16	0 (40)	0 (5)	0 (5)	8,54	25
17	0 (40)	0 (5)	0 (5)	8,54	23

Tabela 3- Coeficientes de regressão para produção de biomassa e proteína bruta por *W. anomalus* CCC32.

Fatores	Coeficientes de regressão		Erro padrão		t(7)		p-valor	
	Biomassa	Proteína	Biomassa	Proteína	Biomassa	Proteína	Biomassa	Proteína
Média	8,60	23,83	0,24	1,37	35,75	17,37	0,000000	0,000001
Glicerol (L)	-0,32	-0,76	0,11	0,64	-2,79	-1,17	0,026783	0,277173
Glicerol (Q)	-0,01	1,98	0,12	0,70	-0,06	2,80	0,957175	0,026591
NaNO ₃ (L)	0,18	-0,27	0,11	0,64	1,57	-0,42	0,159364	0,684452
NaNO ₃ (Q)	-0,005	0,57	0,12	0,70	-0,04	0,80	0,968106	0,448302
Ureia (L)	0,36	-0,71	0,11	0,64	3,17	-1,1	0,015630	0,305302
Ureia (Q)	-0,07	0,21	0,12	0,70	-0,63	0,30	0,543472	0,769702
Glicerol x NaNO ₃	-0,006	1,87	0,15	0,84	-0,04	2,22	0,967411	0,061125
Glicerol x Ureia	-0,106	0,12	0,15	0,84	-0,71	0,14	0,495000	0,886096
NaNO ₃ x Ureia	0,19	0,37	0,15	0,84	1,27	0,44	0,41787	0,669302

A partir da análise de variância, o valor de F calculado para a produção de biomassa foi de 2,6, sendo inferior ao F tabelado (3,68), embora o R² tenha sido de 0,77. Assim como para biomassa, o valor de F calculado para a produção de proteína bruta (1,79) foi inferior ao F tabelado (3,68) e o R² igual a 0,7. Sendo assim, foram realizados novos ensaios variando as concentrações de glicerol (20, 22,5, 25, 27,5 e 30 g/L), fixando-se as concentrações de NaNO₃ (3,5 g/L) e ureia (6,5 g/L) para confirmação dos valores de produção de biomassa e de proteína bruta. Na Fig. 2 está apresentada a produção de biomassa e de proteína bruta empregando as diferentes concentrações de glicerol. A produção média de proteína bruta foi em torno de 33% para as diferentes concentrações de glicerol bruto, não diferindo estatisticamente entre si (p>0,05). Também não houve diferença estatística (p>0,05) para a produção de biomassa, embora maior produção de biomassa (9,34 g/L) tenha sido atingida utilizando 25 g/L de glicerol bruto. Portanto, esses resultados confirmam que o glicerol bruto não afeta significativamente a produção de proteína, e nem influencia na produção de biomassa por *W. anomalus* CCC32.

Tabela 4- ANOVA para o modelo de regressão obtido pela superfície de resposta.

Fatores	SQ		GL		QM		F	
	Biomassa	Proteína	Biomassa	Proteína	Biomassa	Proteína	Biomassa	Proteína
Regressão	4,01	91,29	9	9	0,44	10,14	2,6	1,79
Resíduos	1,21	39,65	7	7	0,17	5,66		
Total	5,22	130,94	16	16				

F tabelado: 3,68

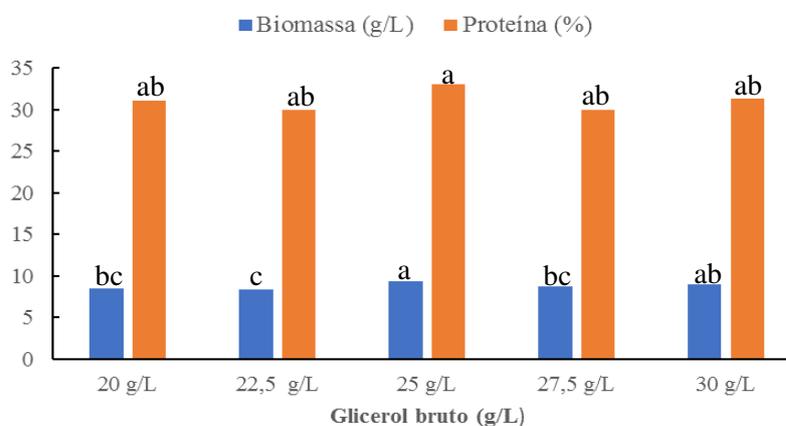


Fig. 2- Produção de biomassa (g/L) e de proteína bruta (%) por *W. anomalous* CCC32 em diferentes concentrações de glicerol bruto a 150 rpm, 30°C, durante 24 h. (Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância).

A cinética da fermentação foi avaliada ao longo do tempo nas condições otimizadas (25 g/L de glicerol bruto, 3,5 g/L de NaNO₃, 6,5 g/L de ureia, a 30 °C, 150 rpm) durante 120 h. Durante o cultivo houve pouca variação do pH, que se manteve constante em torno de 6,0, o que evidencia a baixa produção de ácidos orgânicos por esta cepa e indica que grande parte do carbono disponível foi utilizada para produção de SCP ocorrendo poucos desvios do metabolismo celular para produtos não desejados no processo. A máxima produção de biomassa foi de cerca de 20 g/L, alcançada com 84 h de fermentação durante o estágio exponencial do crescimento, e a máxima produção de proteína bruta foi cerca de 33% com o rendimento $Y_{x/p}$ de 0,1 g/g e produtividade Y_p de 0,018 g/L/h (Fig. 3).

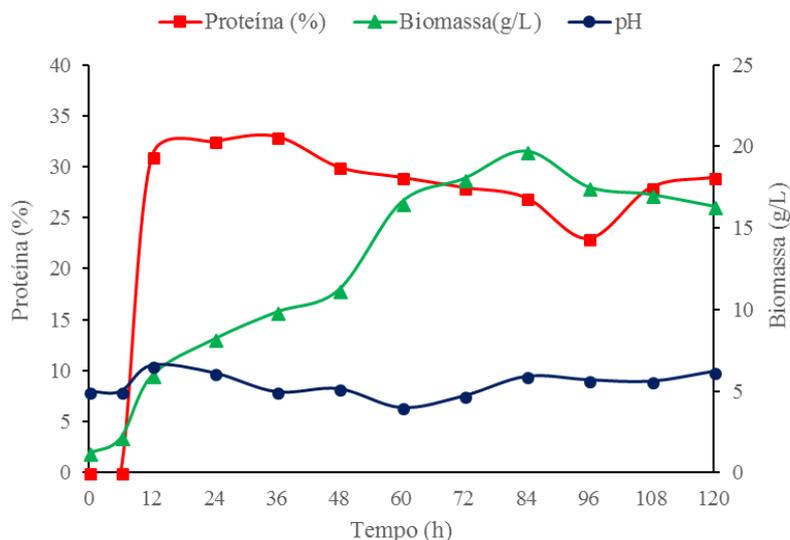


Fig. 3- Cinética da produção de biomassa (g/L) e de proteína bruta (%) por *W. anomalous* CCC32 a 25 g/L de glicerol bruto, 3,5 g/L de NaNO_3 , 6,5 g/L de ureia, a 30 °C, 150 rpm durante 120 horas.

Dados na literatura também demonstraram elevada produção de biomassa por leveduras a partir do glicerol bruto, porém, empregando fontes orgânicas de nitrogênio. Taccari et al. (2012) utilizando extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L) e condições ótimas de concentração de glicerol bruto (60 g/L ou 38 g/L), constataram que a produção de biomassa por *Y. lipolytica* DiSVA C 12.1, *Metschnikowia* sp. DiSVA 50, *Debaryomyces* sp. DiSVA 45/9, *R. mucilaginosa* DiSVA C 7.1, foi de 25,7 g/L, 22 g/L, 19,8 g/L, 20,5 g/L, respectivamente. Galvagno et al. (2011) relataram que a cepa mutante de *Y. lipolytica* Y-1095 produziu 17,84 g/L de biomassa em meio contendo 13 g/L de glicerol bruto e 10 g/L de peptona após 48 h de incubação. Portanto, os resultados desse presente estudo evidenciam que fontes de nitrogênio inorgânico como NaNO_3 e ureia podem ser utilizadas em meio contendo glicerol bruto para produção de biomassa comparável àquelas obtidas utilizando elevadas concentrações extrato de levedura e peptona que são meios de alto custo.

Uprety et al. (2017) também relataram máxima produção de biomassa por *Rhodospiridium toruloides* ATCC10788 (21,16 g/L) em meio mineral contendo 42,8 g/L de glicerol bruto após 168 h. Duarte et al. (2013) verificaram que *Candida* sp. LEB-M3 produziu 19,7 g/L de biomassa utilizando 40 g/L de glicerol bruto em 192 h. Embora as produções de biomassa tenham sido semelhantes com a observada com *W. anomalous* CCC32 (20 g/L de biomassa), a máxima produção foi atingida em 84 de

fermentação, ou seja, metade do tempo relatado pelos autores demonstrando o crescimento rápido dessa cepa em meio mineral contendo glicerol bruto.

Em relação à produção de proteína bruta, os resultados foram semelhantes aos observados por Kurcz et al. (2018) que mostraram que o teor de proteína bruta por *C. utilis* foi de 36,7% em meio contendo águas residuais de batata e glicerol a 5% (p/v) após 72 h de cultivo. No entanto, Santos et al. (2013) encontraram menor teor de proteína bruta (18,2%) com *Y. lipolytica* NRRL YB-423 utilizando glicerol bruto e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Por outro lado, Juskzy et al. (2013) realizaram fermentações em biorreatores de 5L contendo 25 g/L de glicerol bruto e condições controladas como taxa de aeração (1 v/v/min) e pH 3,5, e maiores teores de proteínas foram alcançados. Os autores verificaram que em aproximadamente 12 h a produção de proteína por diferentes linhagens de *Y. lipolytica* foi em torno de 42,1 a 46,8%. Provavelmente, a produção inferior de proteína bruta observada com *W. anomalus* CCC32 ocorreu devido às fermentações realizadas em frascos de Erlenmeyer onde taxa de aeração, por exemplo, não são controladas. A limitação de oxigênio para microrganismos aeróbicos reduz a taxa de crescimento, portanto, o fornecimento de aeração constante aumenta o crescimento celular e a taxa de produção de proteínas (Najafpour, 2015). Considerando que as fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer e em shaker, e 20 g/L de biomassa e teor de proteína bruta de 33% foram alcançados, a produção de SCP por *W. anomalus* CCC32 é promissora e pode ser melhorada em fermentações em biorreatores em que outras condições, como por exemplo, taxa de aeração e taxa de oxigênio dissolvido (DO) podem ser controladas.

Considerações finais

Dentre as cepas avaliadas, *W. anomalus* CCC32 apresentou características favoráveis para produção de SCP a partir do glicerol bruto como crescimento rápido, alta produção de biomassa com alto teor de proteína bruta. Além disso, essa cepa apresenta vantagens como, por exemplo, nível de biossegurança 1. A otimização da produção de biomassa e de proteína bruta em meio mineral no lugar de meio complexo mostrou-se promissora para a produção de SCP, o que pode tornar o processo mais atrativo do ponto de vista econômico. A conversão do glicerol bruto em produtos de valor agregado, como SCP, é interessante para a valorização biotecnológica desse subproduto das usinas de biodiesel.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo, a Fundação Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo suporte financeiro e a Universidade do Estado da Bahia.

Referências

- Ahmed, S., Ahmad, F., Hashmi, A. B., 2010. Production of microbial biomass protein by sequential Culture fermentation of *Arachniotus* sp., and *Candida utilis*. Pak J Bot, 42, 1225-1234.
- Ali, S., Ahmed, S. Sheikh, M. A., Hashmi, S. A., Rajoka, M. B., Jamil, A., 2009. Lysine Production by L-homoserine Resistant Mutant of *Brevibacterium flavum*. J Chem Soc Pak, 32, 97-91.
- Anapuma, Ravindra, P., 2000. Value-added food: Single cell protein. Bioresour Technol, 18, 459-479. doi: 10.1016/S0734-9750(00)00045-8.
- Bzducha-Wrobel, A., Błazejak, S., Molenda, M., Reczek, L., 2015. Biosynthesis of β (1,3)/(1,6)-glucans of cell wall of the yeast *Candida utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol. Eur Food Res Technol, 240, 1023–1034. doi:10.1007/s00217-014-2406-6.
- Basso, R. F, Alcarde, A. R., Portugal, C. B., 2016. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations?. Food Res Int, 86, 112-120. doi: 10.1016/j.foodres.2016.06.002.
- Cappelli, A., Ulissi, U., Valzano, M., Damiani, C., Epis, S., Gabrielli, M.G., Conti, S., Polonelli, L., Bandi, C., Favia, G., Ricci, I., 2014. A *Wickerhamomyces anomalus* Killer Strain in the Malaria Vector *Anopheles stephensi*. Plos One. 9, 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0095988.
- da Silva, G. P., de Lima, C., Contiero, 2015. Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. Catal. Today, 257, 259-266. doi: 10.1016/j.cattod.2014.05.016.
- dos Santos, E.O., Michelon, M., Furlong, E. B., de Medeiros Burkert, J. F., Kalil, S. J. Burkert, C.A.V., 2012. Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. Braz J of Microbiol, 1, 432-440. doi: 10.1590/S1517-83822012000200002.
- Duarte, S. H, Ghiselli, G., Maugeri, F., 2013. Influence of culture conditions on lipid production by *Candida* sp. LEB-M3 using glycerol from biodiesel synthesis. Biocatal Agric Biotechnol, 2, 339–343. doi:10.1016/j. bcab.2013.07.00.
- Felker, P., 1977. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. Anal. Chem., 49,

1080-1080. doi: 10.1021/ac50015a053.

- Galanakis, C.M., 2012. Recovery of high components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Sci Technol*, 26, 68-87. doi: 10.1016/j.tifs.2012.03.003.
- Galvagno, M.A., Iannone, L. J., Bianchi, J., Kronberg, F., Rost, E., Carstens, M.R., Cerrutti, P., 2011. Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol. *Rev Argent de Microbiol*, 43, 218-225. doi: 10.1590/S0325-75412011000300010.
- Gao, L., Chi, Z., Sheng, J., Ni, X., & Wang, L., 2007. Single-cell protein production from Jerusalem artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 77, 825-832. doi: 10.1007/s00253-007-1210-7.
- Gao, Y., Li, D., Liu, Y., 2012. Production of single cell protein from soy molasses using *Candida tropicalis*. *Ann Microbiol*, 62, 1165–1172. doi: 10.1007/s13213-011-0356-9.
- Juszczuk, P., Tomaszewska, L., Kita, A., & Rymowicz, W., 2013. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Bioresour Technol*, 137, 124-131. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.010.
- Koné, M. K., Guéhi, S. T., Durand, N., Ban-Koffi, L., Laurent Berthiot, Tachon, A. F., Kouakou B., Renaud B., Didier M., 2016. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Res Int*, 89, 910-917. doi: 10.1016/j.foodres.2016.04.010.
- Kurcz, A., Błazejak, S., Kot, A. M., Bzducha-Wrobel, A., Kieliszek, M., 2018. Application of industrial wastes for the production of microbial Single-Cell Protein by fodder yeast *Candida utilis*. *Waste Biomass Valor*, 9, 57–64. doi: 10.1007/s12649-016-9782-z.
- Li, M., Liao, X., Zhang, D., Du, G., Chen, J., 2011. Yeast Extract Promotes Cell Growth and Induces Production of Polyvinyl Alcohol-Degrading Enzymes. *Enzyme Res*, 2011, 1-8. doi:10.4061/2011/179819.
- Li, Z., Wang, D., Shi, Y.C., 2017. Effects of nitrogen source on ethanol production in very high gravity fermentation of corn starch. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 70, 229-235. doi: 10.1016/j.jtice.2016.10.055.
- Luo, X., Ge, X., Cui, S., & Li, Y., 2016. Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. *Bioresour Technol*, 215,144-154. doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.042.
- Najafpour, G.D., 2015. Single Cell protein, *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Nova York: Elsevier Science. pp. 417-434.
- Ojhaa, N., Das, N., 2018. A Statistical approach to optimize the production of polyhydroxyalkanoates from *Wickerhamomyces anomalus* VIT-NN01 using Response

- Surface Methodology. *Int J of Biol Macromol.* 107, 2157-2170. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.089.
- Olstorpe, M., Borling, J., Schnürer, J., Passoth, V., 2010. *Pichia anomala* yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions. *Anim Feed Sci Technol.* 156, 47-56. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2009.12.008.
- Oro, L., Erica, F., Ciania, M., Romanazzib, G., Comitina, F., 2014. Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. *Postharvest Biol and Technol.* 96, 64-68. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.05.011.
- Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M. Ivan Marc, I., Aggelis, G., 2008. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, 32, 60-71. doi: 10.1016/j.biombioe.2007.06.007.
- Piotr, J., Tomaszewska, L., Kita, A., Rymowicz, W. 2013. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production *Bioresour Technol* 137, 124–131. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.010.
- Ponsano, E.H.G., Lacava, P.M., Pinto, M.F., 2003. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46. doi: 143-147. doi:10.1590/S1516-89132003000200001.
- Qin, L., Liu, L., Zeng, A-P., Wei, D., 2017. From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresour Technol* 245, 1507-1519. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.163.
- Rodrigues, M.I., Iemma, A.F., 2009. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*, second ed., Cárita, Brasil.
- Ritala, A., Häkkinen, S.T., Toivari, M., Wiebe. M. G., 2016. Single Cell Protein-State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001- 2016. *Front Microbiol*, 8, 1-18. doi: 10.3389/fmicb.2017.02009.
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., Bourtoom, T., 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem*, 46, 210-218. doi: 10.1016/j.procbio.2010.08.009.
- Santos, E. O., Michelon, M., Gallas, J.A., Kalil, S. J, Burkert, C. A.J., 2013. Raw glycerol as substrate for the production of yeast biomass. *Int J of Food Eng*, 9, 413-420. doi 10.1515/ijfe-2012-0248.
- Sisman, T., Gur, O., Dogan, N., Ozdal, M., Algur, O.F., Ergon, T., 2012. Single-cell protein as an alternative food for zebrafish, *Danio rerio*: a toxicological assessment. *Toxicol and Ind Health*, 29, 792-799. doi: 10.1177/0748233712442711.

- Souza, K. S. T., Gudina, E. J., Schwan, R. F., Rodrigues, L.R., Dias, D.R., Teixeira, J.A., 2018. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. *J Hazard Mater*, 346, 152-158. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.12.021.
- Sundh, I., Melin, P., 2010. Safety and regulation of yeasts intentionally added to the food or feed chains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99, 113–119. doi: 10.1007/s10482-010-9528-z.
- Sun, Y.Q., Qi, W.T., Teng, H., Xiu, Z.L., Zeng, A.P., 2008. Mathematical modeling of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Concerning enzyme-catalytic reductive pathway and transport of glycerol and 1,3-propanediol across cell membrane. *Biochem Eng J*, 38, 22–32. doi: 10.1016/j.bej.2007.06.002.
- Taccari, M., Canonico, L., Comitini, F., Mannazzu, I., Ciani, M., 2012. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresour Technol*, 110, 488-495. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.109.
- Uprety, B. K., Chaiwong, W., Ewelike C., Rakshit, S. K., 2016. Biodiesel production using heterogeneous catalysts including wood ash and the importance of enhancing byproduct glycerol purity. *Energy Convers Manag*, 112, 191-199. doi: 10.1016/j.enconman.2016.02.032.
- Uprety, B. K., Dalli, S. S., Rakshit, S. K., 2017. Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities. *Energ Convers Manage*, 135, 117–128. doi: 10.1016/j.enconman.2016.12.071.
- Vidakovic, A., Langeland, M., Sundh, H., Sundell, K., Olstorpe, M., Vielma, J., Kiessling, A., Lundh, T., 2015. Evaluation of growth performance and intestinal barrier function in Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) fed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), fungi (*Rhizopus oryzae*) and blue mussel (*Mytilus edulis*). *Aquacult. Nutr.*, 22, 1348-1360. doi: 10.1111/anu.12344.
- Walker, G., 2011. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99, 25-34. doi.org/10.4061/2011/179819
- Wang, F., Yue, L., Wang, L., Li, J., Wang, X., & Chi, Z., 2009. Genetic modification of the marine-derived yeast *Yarrowia lipolytica* with high-protein content using a GPI-anchoring expression system. *Biotechnol prog*, 25, 1297-1303. doi: 10.1002/btpr.235.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, 39, 971-974. doi: 10.1021/ac60252a045.
- Yang, F., Hanna, M. A., Sun, R., 2012. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol for Biofuels*, 5, 2-10. doi: 10.1186/1754-6834-5-13.

Zha, M., Sun, B., Wu, Y., Yin, S., Wang, C., 2018. Improving flavor metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by mixed culture with *Wickerhamomyces anomalus* for Chinese Baijiu making. *J Biosci Bioeng*, 126, 189-195. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.02.010.

Zhenming, C., Zhiqiang, L., Lingmei, G., Fang, G., Chunling, M., Xianghong, M., Haifeng, L., 2006. Marine Yeasts and their applications in mariculture. *J Ocean U China*, 5, 251-256. doi: 10.1007/s11802-006-0010-5.