

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

Douglas dos Santos Ferreira

Otimização da produção de lipídeos por *Rhodotorula glutinis* e aumento de escala em biorreatores de agitação pneumática

**Lorena
2019**

DOUGLAS DOS SANTOS FERREIRA

Otimização da produção de lipídeos por *Rhodotorula glutinis* e aumento de escala em biorreatores de agitação pneumática

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de concentração de desenvolvimento de produtos e processos.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Alves Silva

Versão Corrigida

Lorena
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferreira, Douglas dos Santos

Otimização da produção de lipídeos por *Rhodotorula glutinis* e aumento de escala em biorreatores de agitação pneumática / Douglas dos Santos Ferreira; orientador João Paulo Alves Silva - Versão Corrigida. - Lorena, 2019.

101 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Lipídeos microbianos. 2. Biorreator. 3. Coluna de bolhas. 4. Airlift. 5. *Rhodotorula glutinis*. I. Título. II. Silva, João Paulo Alves, orient.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, e por me dar forças em todos os momentos em que eu precisei.

Agradeço aos meus familiares por todo apoio que tive.

Agradeço ao Professor João Paulo, pela paciência e dedicação, por todo o aprendizado que tive, por me proporcionar toda essa experiência, onde pude crescer tanto pessoalmente quanto profissionalmente.

Agradeço aos meus amigos que caminharam ao meu lado nesses últimos dois anos. E também aos que não puderam estar presentes, mas sei que sempre torceram por mim.

Agradeço aos meus colegas e amigos do laboratório, que trabalharam junto comigo e me ajudaram muito.

Agradeço à FAPESP (processo 2016/06683-0) e à CNPq (processo 455260/2014-1) pelo financiamento cedido ao projeto e a CAPES (O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001) pelo fornecimento da bolsa de pesquisa.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a elaboração desse trabalho

RESUMO

FERREIRA, D. S. **Otimização da produção de lipídeos por *Rhodotorula glutinis* e aumento de escala em biorreatores de agitação pneumática.** 2019. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

O glicerol pode ser aproveitado em processos biotecnológico como substrato, para a obtenção de diversos produtos, dentre eles os óleos microbianos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a obtenção de lipídeos pela levedura *Rhodotorula glutinis* a partir de glicerol. Na etapa inicial deste estudo foram realizados ensaios em frascos agitados de 250 mL, contendo 50 mL de meio, segundo um planejamento experimental 2^4 , com face centrada e repetições no ponto central, no qual foram avaliadas as influências das variáveis concentração de substrato (40 a 200 g/L), da razão carbono/nitrogênio (20:1 a 100:1), pH (5 a 7) e concentração de inóculo (1 a 5 g/L), sobre a produção de lipídeos. Verificou-se nesta etapa que, dentro da região avaliada, a concentração de substrato, o pH e a razão carbono/nitrogênio (C/N), apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a produção de lipídeos. Dentre estas variáveis, a concentração de substrato e o pH apresentaram comportamento quadrático, com pontos de máximo acúmulo de lipídeos próximos a 140 g/L e pH 6,5, respectivamente. Quanto a razão C/N, esta variável mostrou um efeito positivo sobre o acúmulo de lipídeos, ou seja, dentro a região avaliada, o aumento da razão C/N levou a um aumento do acúmulo de lipídeos pela levedura. Nos cultivos realizados nas condições determinadas pelo modelo para maximizar o acúmulo de lipídeos foram alcançadas concentrações de células de 30 ± 1 g/L e lipídios de 15 ± 3 g/L, em 200 h de cultivo. Na segunda etapa deste estudo foi avaliada a ampliação de escala dos cultivos da levedura de frascos agitados para biorreatores de agitação pneumática do tipo coluna de bolhas (CB) e *airlift* (AL), com volumes de 0,5 e 1,8 L. Os cultivos em biorreatores foram realizados empregando-se as condições otimizadas na etapa anterior deste trabalho. De modo geral, os cultivos realizados em biorreatores de bancada aprearam concentração de células (15 a 21 g/L) e de lipídeos (5 a 9 g/L), inferiores aos observados em frascos agitados (30 g/L de células e 15 g/L de lipídeos). Tal resultado pode estar relacionado a condição de disponibilidade de oxigênio uma vez que o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para os cultivos em frascos agitados (k_La 49 h⁻¹) foi superior ao alcançado em biorreatores (k_La ente 20 e 30 h⁻¹). Nesta etapa, verificou-se ainda que, os biorreatores do tipo CB possibilitaram alcançar uma concentração de lipídeos (8 a 9 g/L) superior à obtida nos reatores AL (5 a 7 g/L), além de proporcionar uma condição de mistura mais eficiente. Quanto a composição do óleo microbiano (OM) extraído da biomassa celular ao fim do cultivo, verificou-se elevados teores dos ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2), os quais corresponderam a cerca de 95% de sua composição. A proporção de ácidos graxos de dezesseis e dezoito carbonos do óleo microbiano assemelha-se a encontrada no óleo de soja (cerca de 94% de C16 e C18), o que possibilita o emprego deste óleo para finalidades semelhantes às do óleo de soja, como por exemplo, produção de biodiesel.

Palavras-chave: Lipídeos microbianos. Biorreator. Coluna de bolhas. *Airlift*. *Rhodotorula glutinis*.

ABSTRACT

FERREIRA, D. S. **Optimization of lipid production by *Rhodotorula glutinis* and scale-up in pneumatic agitation bioreactors.** 2019. 101 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Glycerol can be used in biotechnological processes as a substrate to obtain various products, among them microbial oils. In this way, the present study aims to evaluate the lipids production by the yeast *Rhodotorula glutinis* from glycerol. In the initial stage of this study, experiments were performed in 250 mL shaken flasks, containing 50 mL of medium, according to an experimental design 2^4 , face centered and repetitions at the central point, in which the substrate concentration (40 to 200 g/L), carbon/nitrogen ratio (20:1 to 100:1), pH (5 to 7) and inoculum concentration (1 to 5 g/L) effects on lipid production were evaluated. It was verified that, within the evaluated region, the substrate concentration, pH and carbon/nitrogen ratio (C/N) had statistically significant effects on lipid production. Among these variables, the substrate concentration and pH presented a quadratic behavior, with maximum lipids accumulation points close to 140 g/L and pH 6.5, respectively. The C/N ratio presented a positive effect on the lipid accumulation, that is, within the region evaluated, the increase in the C/N ratio led to an increase in the lipid accumulation by yeast. Cultures performed under conditions determined by the model to maximize lipid accumulation reached cell concentrations of 30 ± 1 g/L and lipids of 15 ± 3 g/L in 200 h of culture. In the second stage of this study, the scale-up of the yeast shake flasks cultures for bubble column (CB) and airlift (AL) pneumatic agitation bioreactors, with volumes of 0.5 and 1.8 L, were evaluated. Cultures in bioreactors were performed using the optimized conditions in the previous stage of this work. In general, cultures in bioreactors presented cells concentrations (15 to 21 g / L) and lipids (5 to 9 g/L) lower than those observed in shaker flasks (30 g/L of cells and 15 g/L of lipid). This result may be related to the oxygen availability condition since the volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) for cultures in shaker flasks (k_{La} 49 h^{-1}) was higher than in bioreactors (k_{La} 20 and 30 h^{-1}). In this stage, it was also verified that CB-type bioreactors achieve a lipid concentration (8 to 9 g/L) higher than that obtained in AL reactors (5 to 7 g/L), besides providing more efficient mixing conditions. About the composition of the microbial oil (MO), extracted from the cell biomass at the end of the cultivation, presented high levels of palmitic (C16: 0), stearic (C18: 0), oleic (C18:1) and linoleic (C18:2) fatty acids, which corresponded to about 95% of its composition. The proportion of microbial oil fatty acids of sixteen and eighteen carbons resembles that found in soybean oil (about 94% C16 and C18), which makes it possible to use this oil for similar purposes as soybean oil, such as biodiesel production, for example.

Keywords: Microbial oil. Bioreactor. *Airlift*. Bubble column. *Rhodotorula glutinis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Possíveis aplicações industriais do glicerol.	24
Figura 2.2 – Reação de transesterificação, onde o triglicerídeo e o metanol, na presença de um catalisador, formam ésteres metílicos e glicerol.	25
Figura 2.3 – Via metabólica da síntese de lipídeos a partir da glicose, glicerol e xilose.	28
Figura 2.4 – Diagrama dos possíveis regimes que podem ocorrer em um reator do tipo coluna de bolhas.	35
Figura 2.5 – Esquema dos possíveis regimes que ocorrem em um reator do tipo coluna de bolhas.	36
Figura 2.6 – Reatores do tipo airlift com (a) fluxo externo, e com (b) fluxo interno.	37
Figura 4.1 – Biorreator de bancada do tipo airlift, dotado de entrada de ar (1), Sonda polarográfica (2), tampa (3), camisa para controle de temperatura (4), meio de cultivo (5), vaso de vidro (6) e tubo concêntrico do reator airlift (7). Reator de 500 mL (a) e Reator de 1800 mL (b). Os reatores coluna de bolhas apresentam as mesmas características, exceto pela ausência do tubo concêntrico (7).	45
Figura 5.1 – Gráfico de Pareto para os efeitos estimados (barra azul) das variáveis concentração de glicerol inicial (S_0), razão C/N, pH inicial e concentração de inóculo (X_0) sobre as respostas: (a) acúmulo de lipídeos, (b) concentração celular, (c) consumo de substrato, para um limite de significância estatística ao nível de 95% de confiança (linha vermelha).	56
Figura 5.2 – Gráfico de superfície de resposta para a variável acúmulo de lipídeos em função da concentração inicial de substrato (S_0) e da razão C/N, pH mantido fixo em 6.	60
Figura 5.3 – Gráfico de superfície de resposta para a variável acúmulo de lipídeos em função do pH e da concentração inicial de glicerol (S_0), razão C/N mantida fixa em 60.	61
Figura 5.4 – Gráfico de superfície de resposta para a variável acúmulo de lipídeos em função do pH e da razão C/N, mantendo fixa em 120 g/L a concentração inicial de glicerol.	62

Figura 5.5 – Gráfico de superfície de resposta para a variável concentração celular em função da concentração inicial de glicerol (S_0) e da razão C/N, com pH mantido em 6.....	63
Figura 5.6 – Gráfico de superfície de resposta para a variável concentração celular em função do pH e da concentração inicial de glicerol (S_0), mantendo razão C/N fixa em 60.	64
Figura 5.7 – Gráfico de superfície de resposta para a variável concentração celular em função do pH e da razão C/N, mantendo a concentração inicial de glicerol em 120 g/L.....	65
Figura 5.8 - Gráfico de superfície de resposta para a variável consumo de glicerol em função do pH e da concentração inicial de glicerol (S_0), mantendo a concentração razão C/N em 60 e concentração de inóculo (X_0) igual a 3 g/L.	67
Figura 5.9 – Gráfico de superfície de resposta para a variável consumo de glicerol em função da razão C/N e da concentração inicial de glicerol (S_0), mantendo fixo o pH em 6 e concentração de inóculo (X_0) em 3 g/L.....	68
Figura 5.10 - Gráfico de superfície de resposta para a variável consumo de glicerol em função da razão C/N e do pH, mantendo fixo a concentração inicial de substrato (S_0) em 120 g/L e concentração de inóculo (X_0) em 3 g/L.	69
Figura 5.11 – Concentração de glicerol, concentração celular, concentração de lipídeos e pH em função do tempo, obtido pelo experimento de confirmação realizado em frasco agitado de 250 mL a 250 rpm e mantido a 30 °C contendo 50 mL do meio de cultivo.....	71
Figura 5.12 – Coeficiente de transferência volumétrica de oxigênio (k_{La}) em função da aeração para os reatores do tipo coluna de bolhas com volume útil de 0,5 L. 73	73
Figura 5.13 – Concentração de glicerol, concentração celular, concentração de lipídeos e pH em função do tempo, obtido pelo experimento realizado em biorreator do tipo coluna de bolhas com um volume útil de 0,5 L com aeração de 0,1 vvm e temperatura de 30 °C.....	76
Figura 5.14 – Concentração de glicerol, concentração celular, concentração de lipídeos e pH em função do tempo, obtido pelo experimento realizado em biorreator do tipo airlift com um volume útil de 0,5 L com aeração de 0,1 vvm e temperatura de 30 °C.....	77
Figura 5.15 – Concentração de glicerol, concentração celular, concentração de lipídeos e pH em função do tempo, obtido pelo experimento realizado em biorreator	

do tipo coluna de bolhas com um volume útil de 1,8 L com aeração de 0,1 vvm e temperatura de 30 °C.....	78
Figura 5.16 – Concentração de glicerol, concentração celular, concentração de lipídeos e pH em função do tempo, obtido pelo experimento realizado em biorreator do tipo airlift com um volume útil de 1,8 L com aeração de 0,1 vvm e temperatura de 30 °C.....	79
Figura A.1 – Concentração celular em função da absorbância em um comprimento de onda de 600 nm.	99
Figura B.1 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) para o biorreator do tipo coluna de bolhas com o volume útil de 0,5 L, com aeração de 0,1 vvm.....	100
Figura B.2 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) para o biorreator do tipo coluna de bolhas com o volume útil de 1,8 L, com aeração de 0,1 vvm.....	100
Figura B.3 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) para o biorreator do tipo airlift com o volume útil de 0,5 L, com aeração de 0,1 vvm.	101
Figura B.4 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) para o biorreator do tipo airlift com o volume útil de 1,8 L, com aeração de 0,1 vvm.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Teor de Lipídeos acumulados por microalgas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos e sua comparação com a soja, uma das principais fontes de lipídeos utilizada pela indústria.	19
Tabela 2.2 – Teor de lipídeos (%T _L) (dado em massa de lipídeos por biomassa seca) e perfis de ácidos graxos de algumas leveduras oleaginosas e da soja.	20
Tabela 2.3 – Biomassa celular (X), concentração de lipídeos (L), teor de lipídeos (T _L), tempo de cultivo (h), produtividade de lipídeos (Q _L), obtidos em diferentes cultivos com microrganismos autotróficos e heterotróficos.	22
Tabela 2.4 – Microrganismo, modo de cultivo, tempo final do cultivo (t), máxima biomassa obtida (X), máxima concentração de lipídeos (L), produtividade em células (Q _X), produtividade em lipídeos (Q _L), para cultivos realizados em frasco agitado e biorreatores.	39
Tabela 4.1 - Composição do meio de inóculo.	41
Tabela 4.2 – Planejamento composto central rotacional DCCR 2 ⁴ , face centrada, com valores reais e níveis codificados das variáveis Concentração de Substrato (S ₀), Razão molar entre carbono e nitrogênio (Razão C/N), pH inicial e concentração de inóculo (X ₀).....	43
Tabela 5.1 – Planejamento composto central rotacional DCCR 2 ⁴ , face centrada, com valores das variáveis independentes: concentração de Substrato (S ₀), razão molar entre carbono e nitrogênio (Razão C/N), pH inicial e concentração de inóculo (X ₀) e das variáveis resposta células, acúmulo de lipídeos e consumo de glicerol, obtidos após 240 h de cultivo.....	54
Tabela 5.2 – Análise de variância (ANOVA) do modelo que descreve o acúmulo de lipídeos pela levedura R. glutinis após 240 h de cultivo em função das variáveis concentração inicial de glicerol (S ₀), razão C/N e pH inicial do meio de cultivo.	58
Tabela 5.3 – Análise de variância (ANOVA) do modelo que descreve a concentração celular obtida pela levedura R. glutinis após 240 h de cultivo em função das variáveis concentração inicial de glicerol (S ₀), razão C/N e pH inicial do meio de cultivo.	58
Tabela 5.4 – Análise de variância (ANOVA) do modelo que descreve o consumo de glicerol pela levedura R. glutinis após 240 h de cultivo em função das variáveis	

concentração inicial de glicerol (S_0), razão C/N, pH inicial e concentração de inóculo (X_0).....	59
Tabela 5.5 – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), tempo de mistura, velocidade superficial do gás, retenção gasosa e relação entre altura e diâmetro interno obtidos para os biorreatores do tipo coluna de bolhas e airlift com volumes uteis de 0,5 L e 1,8 L.	74
Tabela 5.6 – Concentração celular, concentração de lipídeos, tempo de cultivo, produtividade volumétrica em células (Q_x) e produtividade volumétrica em lipídeos (Q_L), fator de rendimento de substrato em células ($Y_{x/s}$), fator de conversão de substrato em lipídeos ($Y_{L/s}$), máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e eficiência (η) obtidos nos cultivos realizados em frasco agitado e nos biorreatores do tipo coluna de bolhas e airlift de 0,5 L e 1,8 L.....	81
Tabela 5.7 – Perfil de ácidos graxos dos lipídeos obtidos nos reatores e do óleo de soja.	83
Tabela 5.8 – Propriedades físico-químicas previstas pelo software BiodiselAnalyzer© geradas pelo perfil de ácidos graxos obtidos pelas amostras de lipídeo produzido pela levedura <i>R. glutinis</i> , em biorreatores do tipo coluna de bolhas (CB) e Airlift (AL), e do óleo de soja, comparadas com as especificações do biodiesel padronizadas pela norma brasileira (ANP 07/2018), da União Européia (EN 14214) e dos Estados Unidos (ASTM D6751).....	84

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Revisão Bibliográfica	17
2.1 Microrganismos oleaginosos no contexto das Biorrefinarias	17
2.2 Microrganismos como fonte de lipídeos para biorrefinarias	17
2.3 Microrganismos oleaginosos	21
2.4 Glicerol como matéria prima para biorrefinarias baseadas em microrganismos.....	24
2.5 Síntese de lipídeos.....	27
2.6 Fatores que influenciam a produção de Lipídeos.....	28
2.7 Produção de lipídeos microbianos em biorreatores.....	33
3. Objetivo.....	40
3.1 Objetivos específicos	40
4. Materiais e Métodos.....	41
4.1 Microrganismo e preparação do inóculo	41
4.2 Estudo da produção de lipídeos em frasco agitado	42
4.3 Estudo da produção de lipídeos em biorreatores.....	44
4.4 Métodos analíticos.....	46
4.4.1 Determinação do k_La	46
4.4.2 Retenção gasosa	47
4.4.3 Tempo de Mistura.....	47
4.4.4 Velocidade superficial do gás	48
4.4.5 Dosagem de glicerol	48
4.4.6 Determinação de biomassa	48
4.4.7 Extração e quantificação de lipídeos totais na biomassa	49
4.4.8 Composição em ácidos graxos do óleo microbiano.....	50
4.5 Análise de resultados	52
5. Resultados e Discussão	53
5.1 Estudo das condições de cultivo	53
5.2 Variação de escala em Biorreatores de bancada.....	72
5.2.1 Caracterização dos Biorreatores	72
5.2.2 Obtenção de óleo microbiano em Biorreatores.....	75

5.3 Perfil de Ácidos Graxos	82
6. Conclusões.....	89
Referências	91
APÊNDICE.....	99
APÊNDICE A - Adequação de metodologias analíticas	99
A.1 – Curva de calibração para determinação da concentração celular da levedura <i>Rhodotorula glutinis</i> por espectrofotometria.....	99
APÊNDICE B - Caracterização do Biorreator	100
B.1 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La).....	100

1. Introdução

A atual busca por fontes de recursos sustentáveis, vem motivando o desenvolvimento de tecnologias voltadas para o uso de matérias-primas renováveis em larga escala, capazes de substituir os insumos de origem fósseis, suprimindo a demanda atual de insumos para indústria química e de combustíveis renováveis, para setores com elevada demanda energética, como o de transportes.

Diante da necessidade do uso de matérias-primas renováveis e em larga escala, surge o conceito de biorrefinarias, as quais seriam instalações industriais capazes de utilizar tais matérias-primas renováveis para a produção de insumos químicos variados e produtos energéticos, tais como os biocombustíveis. Dentro das biorrefinarias, o aproveitamento de resíduos e subprodutos industriais pode contribuir para o estabelecimento de processos mais eficientes e sustentáveis. Dentro deste contexto, tecnologias voltadas para o aproveitamento do glicerol, principal subproduto da produção de biodiesel, ocupam um papel importante para o desenvolvimento de biorrefinarias baseadas em lipídios.

O glicerol pode ser utilizado como substrato em processos biotecnológicos, como por exemplo a produção de lipídeo microbiano por microrganismos heterotróficos. Os microrganismos oleaginosos heterotróficos, como as leveduras, são capazes de acumular lipídeos em elevadas proporções e em curtos períodos de tempo, comparado a culturas vegetais. O uso de microrganismos oleaginosos pode apresentar vantagens pela possibilidade de uso de diferentes fontes de carbono, além de sofrer interferências de condições climáticas, e pela sua ausência de sazonalidade na produção. Por estes motivos estes microrganismos se tornam promissores como fonte de lipídeos para uso em larga escala.

De um modo geral os lipídeos microbianos podem ser adotados como complemento ou até mesmo em substituição aos óleos de cultivos vegetais em um grande número de processos industriais. Desta forma, instalações de grande porte destinadas a produção de lipídeos microbianos podem ser construídas de forma independente ou mesmo anexas a instalações industriais já existentes, como por exemplo plantas de produção de biodiesel, aproveitando o glicerol para a obtenção de lipídeos microbianos, além de outros produtos como proteínas e carotenoides.

Como todo processo biotecnológico em fase de desenvolvimento, a produção de lipídeos microbianos em larga escala requer o desenvolvimento de estudos visando o estabelecimento de condições adequadas, que possibilitem maximizar sua eficiência. Desta forma, estudos de melhorias de condições de cultivo, assim como a aplicação de escala, são etapas fundamentais para o desenvolvimento de tais processos.

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de cultivo para maximizar a produção de lipídeos pela levedura *Rhodotorula glutinis* a partir de glicerol, avaliando a influência, sobre o acúmulo de lipídeos pela levedura, das variáveis concentração de substrato inicial e inóculo, proporção entre fontes de nitrogênio e fonte de carbono, e pH do meio de cultivo. Uma vez estabelecidas as condições de cultivos em frascos agitados, foi também avaliada o aumento de escala de cultivos, de frascos agitados para biorreatores de bancada de agitação pneumática, do tipo *airlift* e coluna de bolhas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Microrganismos oleaginosos no contexto das Biorrefinarias

O interesse por tecnologias que permitem o uso de matérias-primas renováveis em grande escala, em substituição às matérias-primas de origem fóssil tem se intensificado para várias finalidades, tais como energia e insumos químicos (BLAKEY; RYE; WILSON, 2011; CHAPMAN, 2007). Em virtude dessa necessidade, surge o conceito de biorrefinarias.

Segundo Mayaki et al. (2008) uma biorrefinaria é uma instalação industrial que integra processos de conversão de biomassa para produzir combustíveis, energia e produtos químicos de valor agregado. O conceito de biorrefinaria é análogo à atual refinaria de petróleo, que produz vários combustíveis e produtos derivados do petróleo.

Pode-se categorizar os projetos de biorrefinarias em três principais tipos: “*greenfield*” onde há a construção de uma planta industrial totalmente nova; “*retrofit*” quando há uma anexação de uma nova tecnologia em uma planta industrial que já existe, podendo haver integração energética entre elas; e a “*brownfields*”, onde se utiliza a estrutura ou equipamentos de plantas industriais que estão desativadas (BRAZ, 2018).

As biorrefinarias podem ser baseadas em diferentes tipos de plataformas, que estão relacionadas às suas matérias-primas e métodos de processamento. O uso de microrganismos oleaginosos como base para biorrefinarias é um campo muito promissor, porém é pouco explorado (JENA et al., 2015).

2.2 Microrganismos como fonte de lipídeos para biorrefinarias

O modelo de biorrefinarias que são baseadas em microrganismos oleaginosos são uma alternativa promissora às biorrefinarias que utilizam óleos vegetais como principal matéria-prima renovável. O uso desses microrganismos oleaginosos para produção de lipídeos tem como principais vantagens, comparados às culturas vegetais, a alta produtividade e a sua produção não possui sazonalidade (CHISTI, 2007). De acordo com Avagyan (2008), as culturas vegetais,

tais como a soja, o milho e a palma podem atingir uma conversão em média de 140, 450 e 5900 litros de óleo por hectare em um ano, respectivamente. Enquanto que cultivos microbianos tais como microalgas por exemplo, são capazes de produzir cerca de 17 mil litros de óleo por hectare por ano, com um potencial de atingir valores de até 140 mil litros por hectare anualmente.

Atualmente os lipídeos microbianos são considerados uma alternativa em potencial aos óleos vegetais, que podem ser empregados como complemento ou até mesmo em substituição aos óleos vegetais em diversos processos industriais. Estes lipídeos podem ser obtidos por vários microrganismos, como por exemplo leveduras, fungos filamentosos, bactérias e microalgas. Aqueles microrganismos que possuem a capacidade de acumular lipídeos em proporções que superam 20% de sua massa seca são denominados microrganismos oleaginosos. (CHISTI, 2007; LIANG; JIANG, 2013)

Na Tabela 2.1 são apresentados os teores de lipídeos presentes em alguns microrganismos oleaginosos, os quais são comparados ao teor de lipídeos presente na soja, uma das principais fontes de lipídeos para diversos processos. Observa-se nesta tabela que a grande maioria dos microrganismos são capazes de acumular lipídeos em maior proporção que a soja, mostrando assim, um grande potencial para a produção de lipídeos. Algumas espécies de microalgas, leveduras e fungos filamentosos são capazes de acumular teores de lipídeo em torno de 60% (m/m), entretanto, há uma espécie de bactéria capaz de acumular teores de lipídeo em torno de 80% (m/m).

A composição desses lipídeos, em termos de perfil de ácidos graxos, é semelhante aos óleos vegetais utilizados atualmente para a produção de biodiesel, são basicamente compostos por ácidos graxos de cadeia longa, entre 16 e 18 carbonos (SITEPU et al., 2013).

Na Tabela 2.2 são apresentadas as composições de ácidos graxos de algumas leveduras oleaginosas, em comparação a de ácidos graxos presentes no óleo de soja, uma das principais fontes de lipídeos. Como pode ser observado, os ácidos graxos de 16 (C16) e 18 (C18) carbonos representam cerca de 98% do perfil lipídico do óleo da soja, o que é semelhante ao da maioria das leveduras, cujo teor de C16 e C18 representa entre 96 a 100% destes ácidos graxos.

Tabela 2.1 – Teor de Lipídeos acumulados por microalgas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos e sua comparação com a soja, uma das principais fontes de lipídeos utilizada pela indústria.

Fonte oleaginosa	Teor de lipídeos (%m/m)
Plantas superiores	
Soja*	21
Microalgas	
<i>Chaetoceros gracilis</i>	15 – 60
<i>Chlorella sp.</i>	33 – 66
<i>Chlorella vulgaris</i>	20 – 42
<i>Nannochloropsis sp.</i>	21 – 38
<i>Pseudochlorococcum sp.</i>	25 – 52
Bactérias	
<i>Arthrobacter sp.</i>	> 40
<i>Nocardia globerula 432</i>	> 49
<i>Rhodococcus opacus PD630</i>	> 50
<i>Streptomyces coelicolor TR0123</i>	64
<i>Streptomyces coelicolor TR0958</i>	83
Leveduras	
<i>Cryptococcus curvatus</i>	25
<i>Lipomyces starkeyi</i>	61
<i>Rhodospiridium toruloides Y4</i>	48
<i>Rhodotorula glutinis**</i>	72
<i>Trichosporon fermentans</i>	62
Fungos filamentosos	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Cunninghamella echinulata</i>	57
<i>Mortierella isabellina</i>	65
<i>Mucorales fungi</i>	42 – 65
<i>Trichoderma harzianum Q2-37</i>	20

Fonte: Liang; Jiang (2013). *Pípolo et al. (2015). **Beopoulos et al. (2009)

Tabela 2.2 – Teor de lipídeos (%T_L) (dado em massa de lipídeos por biomassa seca) e perfis de ácidos graxos de algumas leveduras oleaginosas e da soja.

Espécies		Perfil de ácidos graxos (relativo %m/m)						
Leveduras	%T _L	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Soma
<i>Cryptococcus curvatus</i>	58	25	<1	10	57	7	0	99
<i>Cryptococcus albidus</i>	65	12	1	3	73	12	0	100
<i>Candida</i> sp. 107	42	44	5	8	31	9	1	98
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63	34	6	5	51	3	0	99
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72	37	1	3	47	8	0	96
<i>Rhodotorula graminis</i>	36	30	2	12	36	15	4	99
<i>Rhizopus arrhizus</i>	57	18	0	6	22	10	12	68
<i>Trichosporon pullulans</i>	65	15	0	2	57	24	1	99
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36	11	6	1	28	51	1	98
Plantas superiores								
Soja*	-	11	-	4	23	53	7	98

Fonte: Beopoulos et al. (2009). *Carvalho (2011)

No Brasil, as biorrefinarias se tornam uma maneira muito atraente de promover não só segurança energética, mas como também acabaria alavancando o setor industrial, pois haveria melhor aproveitamento dos resíduos que são gerados pelo agronegócio, e com a tecnologia de biocombustíveis brasileira provenientes da cana-de-açúcar e soja, se tornaria mais fácil a implementação de biorrefinarias no Brasil (OLIVEIRA, 2016).

2.3 Microrganismos oleaginosos

Os microrganismos podem ser classificados de acordo com a fonte de energia e carbono que utilizam como autotróficos ou heterotróficos. Os microrganismos autotróficos, mais especificamente os fotoautotróficos, obtêm energia da luz e utilizam o CO₂ do ar como fonte de carbono, e através da fotossíntese, produzem polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Já os microrganismos heterotróficos utilizam os compostos orgânicos como fonte de energia e carbono. Entre os microrganismos cultivados sob condições heterotróficas estão os fungos filamentosos, as leveduras, bactérias e algumas microalgas. Já os cultivos sob condições autotróficas podem ser realizados com microalgas e algumas cianobactérias. (FRANCO et al., 2013; KONG et al., 2013; ZHU et al., 2012)

Na Tabela 2.3 são apresentados alguns microrganismos produtores de lipídeos (autotróficos e heterotróficos), com seus respectivos valores de acúmulos de biomassa e de lipídeos, bem como o teor e a produtividade em lipídeos obtidos no cultivo. Dentre os microrganismos autotróficos a *Scenedesmus sp.* se destaca por alcançar concentração celular e produtividade em lipídeos de 3,05 g/L e de 0,0207 g/L.dia, respectivamente. Com relação aos heterotróficos, são reportadas concentrações celulares de até 11,8 g/L e com produtividades em lipídeos em cerca de 0,79 g/L.dia. Se compararmos o microrganismo autotrófico que possui a menor produtividade em lipídeos com o microrganismo autotrófico que possui a maior produtividade em lipídeos, a produtividade em lipídeos dos microrganismos heterotróficos, chega a ser superior cerca de 10 vezes.

Dentre as vantagens de se utilizar um cultivo heterotrófico em comparação ao autotrófico, é que nos cultivos heterotróficos são comumente obtidas maiores concentrações celulares e maior produtividade em lipídeos. Outra vantagem no uso de microrganismos heterotróficos para produção de lipídeos, refere-se à simplicidade da estrutura física dos biorreatores, pois não necessitam de energia luminosa. Entretanto uma desvantagem do cultivo heterotrófico em relação ao autotrófico está relacionada com o custo de fontes de carbono, como por exemplo a glicose, os quais são mais elevados comparados a maioria dos nutrientes adicionados ao meio de cultivo. Por este motivo se torna necessário encontrar

fontes de carbono alternativas e de menor custo, para tornar o processo mais viável (LIANG; SARKANY; CUI, 2009; PEREIRA et al., 2013).

Tabela 2.3 – Biomassa celular (X), concentração de lipídeos (L), teor de lipídeos (T_L), tempo de cultivo (h), produtividade de lipídeos (Q_L), obtidos em diferentes cultivos com microrganismos autotróficos e heterotróficos.

Microrganismo	X (g/L)	L (g/L)	T_L (%m/m)	t (h)	Q_L (g/L.dia)	Referência
Autotróficos						
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,13	0,02	15,38	240	0,0020	Zhang et al. (2017)
<i>Botryococcus braunii</i>	0,37	0,08	20,75	336	0,0055	
<i>Chlorella vulgaris</i>	1,47	0,10	6,60	336	0,0069	Yoo et al. (2010)
<i>Scenedesmus sp.</i>	3,05	0,29	9,49	336	0,0207	
Heterotróficos						
<i>Yarrowia lipolytica</i>	8,5	2,31	27,27	120	0,46	Dobrowolski et al. (2016)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	6,0	2,5	41,67	72	0,80	Saenge et al. (2011)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	4,1	0,86	20,98	26	0,79	
<i>Cryptococcus curvatus</i>	11,8	1,48	12,54	195	0,18	Tchakouteu et al. (2015)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	11,0	2,83	25,73	96	0,71	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	9,0	2,95	32,78	168	0,42	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre os microrganismos heterotróficos as leveduras têm mostrado grande potencial para produção de lipídeos, mesmo utilizando-se substratos diferentes. Alguns trabalhos vêm mostrando o uso de matérias-primas alternativas como fonte de carbono e energia para o cultivo, tais como o glicerol, xilose, frutose, sacarose, por exemplo, dando enfoque no uso de até mesmo efluentes industriais. (BEOPOULOS et al., 2009; FAKAS et al., 2009). Por exemplo Dai et al. (2007) estudaram o crescimento celular e o acúmulo de lipídeos pela levedura *Rhodotorula glutinis* em meios de cultivos contendo hidrolisado ácido de sabugo de milho, folhas de árvore (*Populus euramevicana*) ou palha de arroz como substituto para a glicose. Os estudos foram realizados partindo de uma concentração inicial de 100 g/L de açúcares provenientes dos respectivos hidrolisados em 72 h de cultivo. O maior acúmulo de lipídeos foi observado nos cultivos realizados com o hidrolisado das folhas da *P. euramevicana*, onde foram obtidos 16,56 e 4,73 g/L de células e lipídeos respectivamente. A composição do hidrolisado das folhas da

P. euramevicana foi determinada por HPLC, sendo de D-xilose (44,9%), glicose (26,9%), L-arabinose (18,5%) e galactose (9,7%). Já nos cultivos realizados com hidrolisado de sabugo de milho foram obtidas concentrações de células e lipídeos de 17,08 e 2,01 g/L respectivamente. O menor acúmulo foi observado no cultivo realizado com o hidrolisado de palha de arroz, no qual foram produzidos cerca de 3,58 e 0,21 g/L de células e lipídeos respectivamente, o que segundo o autor esse menor desempenho foi atribuído a presença de compostos nesse hidrolisado que causaram inibição da levedura. Segundo o autor os resultados sugeriram que os hidrolisados provenientes de resíduos lignocelulósicos podem ser utilizados como fonte de carbono alternativo para síntese de lipídeos para a produção de biodiesel.

Liu et al. (2017) utilizaram a levedura *Cryptococcus curvatus* para produzir lipídeos com um meio de cultivo composto de uma mistura de ácidos graxos voláteis (VFA), tais como ácido acético, propanóico e butanóico, que podem ser obtidos a partir da fermentação de lixo orgânico. Os autores reportaram ainda a obtenção, empregando apenas o ácido acético como substrato (30 g/L) de cerca de 7,3 g/L de células e 4,2 g/L de lipídeos em 24 h de cultivo, atingindo um teor de lipídeos de aproximadamente 58%. Quando ao utilizar apenas ácido acético, propanóico e butanoico, na proporção de 15:5:10 (melhor condição), foram obtidos cerca de 8,68 g/L de células e 4,93 g/L de lipídeos em 24 h de cultivo.

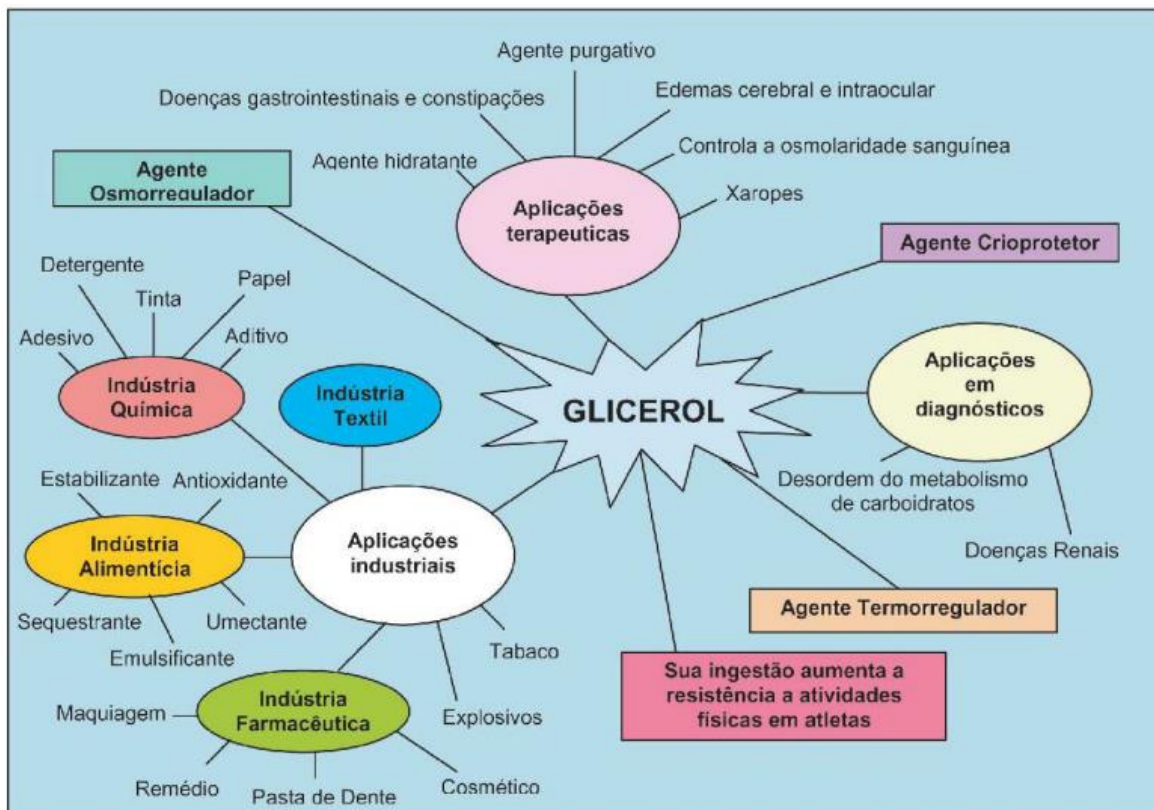
Liang et al. (2010) utilizaram a levedura *C. curvatus* (ATCC 20509) para produção de lipídeos, tendo glicerina bruta proveniente da produção de biodiesel como principal substrato. Sua composição é basicamente glicerol, sais de potássio e sódio, metanol, e outros compostos orgânicos. Nos estudos realizados em batelada alimentada, os autores reportaram a obtenção uma concentração celular de aproximadamente 31,2 g/L em 12 dias de cultivo e um teor de lipídeos de 44,6%, atingindo assim uma produtividade de lipídeos de 1,2 g/L.dia. Em outro estudo utilizando glicerina bruta, também residual da produção de biodiesel, Saenge et al. (2011) utilizaram a levedura *Rhodotorula glutinis* para a obtenção de lipídeos. Os autores reportam uma concentração celular de aproximadamente 6 g/L e uma concentração de lipídeos cerca de 3 g/L em 72 h de cultivo, obtendo assim uma produtividade em lipídeos de aproximadamente 1 g/L.dia. Tais estudos demonstram que estes microrganismos podem utilizar fontes alternativas de carbono, fator este que demonstra grande potencial destes microrganismos para o emprego na produção de lipídeos. Por isso o desenvolvimento tecnológico para o

emprego de tais microrganismos se torna muito importante para a sua aplicação em larga escala.

2.4 Glicerol como matéria prima para biorrefinarias baseadas em microrganismos

O glicerol tem várias aplicações em diversos setores da indústria, entre eles podemos destacar os setores produtores de fármacos, cosméticos, resinas, alimentos e bebidas, entre outros (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009; PAGLIARO et al., 2007). A Figura 2.1 mostra possíveis aplicações para o glicerol, dentre os setores os que mais se destacam são os da indústria farmacêutica, na produção de fármacos e cosméticos, na indústria química e alimentícia.

Figura 2.1 – Possíveis aplicações industriais do glicerol.



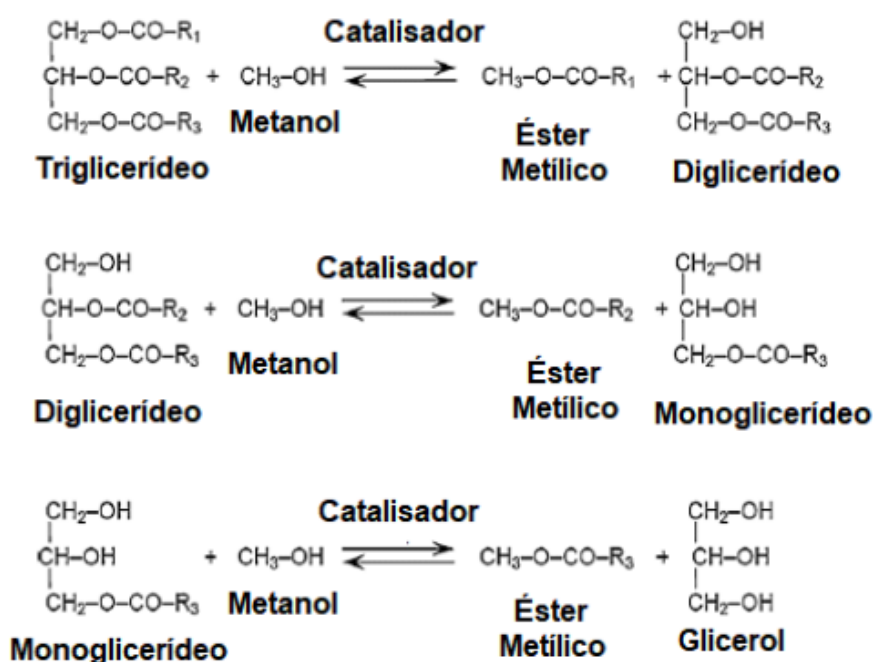
Fonte: Arruda et al. (2006)

Até meados de 1949 o glicerol era produzido a partir da epícloridrina proveniente do propileno (de origem fóssil). Porém atualmente, as plantas

produtoras de glicerol estão sendo fechadas, enquanto que plantas que utilizam o glicerol como matéria-prima estão sendo abertas, devido ao grande excedente obtido como subproduto da produção de biodiesel. Em 2017 foi estimado que, com a introdução do B8 (mistura de 8% de biodiesel ao diesel comum) no mercado brasileiro houve uma produção em torno de 380 mil ton/ano de glicerol, uma produção que ultrapassou a demanda de mercado nacional (EPE, 2018).

O glicerol proveniente da reação do biodiesel é obtido industrialmente pela transesterificação dos triacilgliceróis (TAG) presentes em óleos, com álcool na presença de um catalisador, como produto principal, obtemos os ésteres, que depois de purificado é vendido como biodiesel (CORDEIRO et al., 2011; DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). Essa reação ocorre em etapas, com o auxílio do catalisador o álcool reage com o ácido graxo que está ligado ao glicerol, formando o éster, e liberando assim o glicerol, como é mostrado na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Reação de transesterificação, onde o triglicerídeo e o metanol, na presença de um catalisador, formam ésteres metílicos e glicerol.



Fonte: Adaptado de Borges; Díaz (2012).

O glicerol gerado através da reação de transesterificação para produção de biodiesel metílico é separado por decantação, já que o metanol é adicionado em excesso formando duas fases, a de biodiesel, e a de metanol. O glicerol se distribui entre essas duas fases, porém a maior quantidade é retida na fase metanólica, o

que facilita o processo de separação. Como resultado desse processo, obtém-se a glicerina comercial (glicerina vegetal) que apresenta em torno de 20% de impurezas, que podem ser, catalisador, álcool, ácidos graxos, sais e água. Essas impurezas variam conforme a fonte oleaginosa, o tipo de catalise, empregados na produção do biodiesel. O grau de pureza da glicerina é um fator determinante no preço que é atribuído a ela. Em 2008 a cotação da glicerina bruta chegava a algo em torno de R\$ 105,00/t, já a bidestilada (pureza de 96%) R\$ 2100,00/t e a farmacêutica (pureza > 99,5%) R\$ 2500,00/t em média. Sendo assim, é fundamental a busca por alternativas para o uso do excesso de glicerina produzida pela indústria do biodiesel que não necessite de purezas elevadas (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).

Alguns estudos vêm sendo conduzidos para a conversão microbiológica do glicerol em outros produtos de maior valor agregado. Como por exemplo Anand e Saxena (2012) investigaram o uso de glicerina bruta proveniente do biodiesel de diferentes fontes oleaginosas, tais como soja, girassol, *Jatropha*, farelo de arroz e de linhaça, para a produção de 1,3-propanodiol por *Citrobacter freundii*. A maior concentração de produto foi atingida utilizando-se a glicerina proveniente da produção de biodiesel com o óleo de linhaça. Papanikolaou e Aggelis (2003) também estudaram o uso de glicerol para produção de 1,3-propanodiol pela *Clostridium butyricum* em um processo contínuo de fermentação. Desta forma o glicerol pode ser utilizado como substrato para sua produção de produtos de maiores valores agregados.

Glicerol também vem sendo estudado para produção de lipídeos por microrganismos. Bento (2017) produziu lipídeos microbianos a partir do glicerol como fonte de carbono, utilizando cinco leveduras diferentes, a *Cryptococcus curvatus* Y-1511, *Lipomyces starkeyi* Y-27493, *Rhodotorula glutinis* Y-12905, *Rhodospiridium toruloides* Y-1091 e a *Rhodotorula mucilaginosa* Y-27053. Dentre estas leveduras avaliadas, a que apresentou o maior consumo de glicerol durante o tempo de cultivo (58%), o maior acúmulo de biomassa celular (23,9 g/L) e produtividade volumétrica em lipídeos (0,0083 g/L.h), foi a *Rhodotorula glutinis* Y-12905.

Easterling et al. (2009) investigaram o uso de glicerol e outras fontes de carbono na produção de lipídeos, também utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis*. As fontes de carbono utilizadas além do glicerol foram dextrose e xilose.

Os autores também investigaram o uso dessas fontes combinadas, misturando-se dextrose e xilose, xilose e glicerol, dextrose e glicerol. Os resultados mostravam que em 24 h de fermentação a mistura de dextrose e glicerol resultou em um teor de lipídeos em torno de 35% da biomassa seca, enquanto que o cultivo contendo apenas glicerol resultou um teor de lipídeos em torno de 25%. Já no dobro do tempo, em 48 h, o cultivo com apenas glicerol atingiu um teor de lipídeos próximo de 47%, enquanto que no cultivo contendo a mistura de glicerol mais dextrose obteve-se algo em torno de 32%.

2.5 Síntese de lipídeos

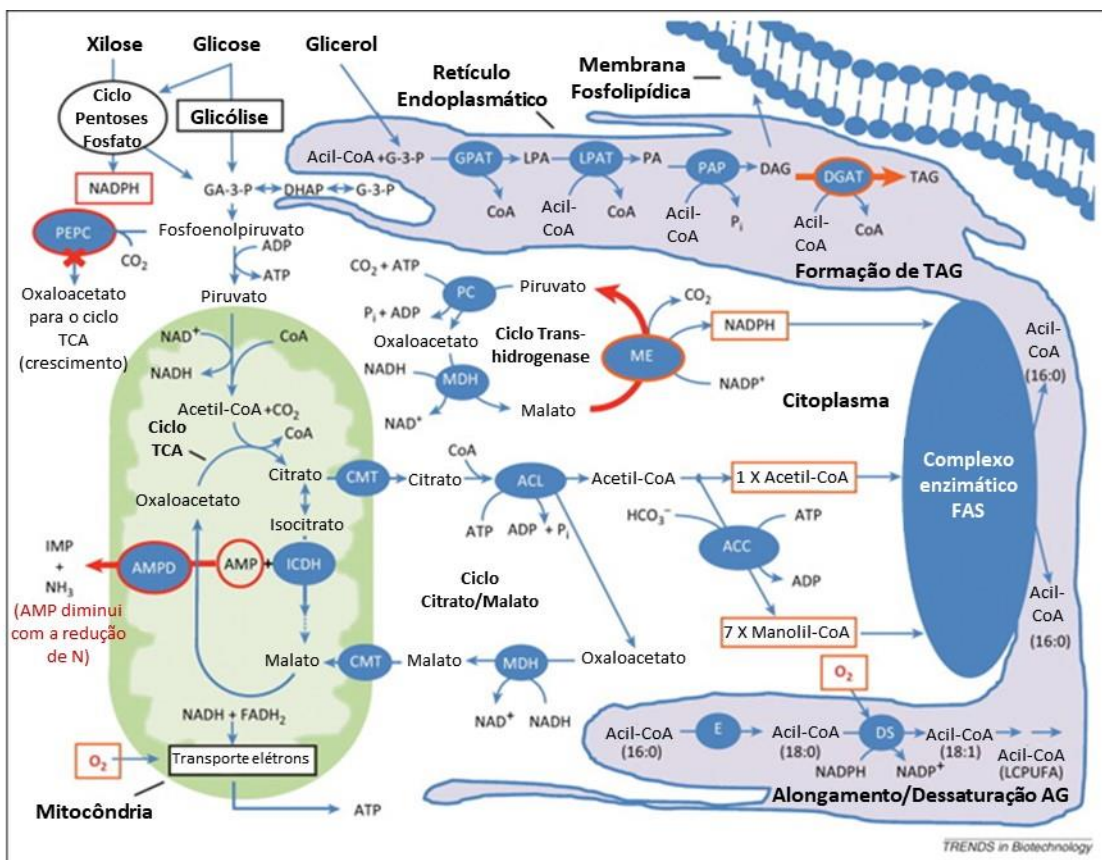
Os lipídeos podem se acumular em leveduras oleaginosas através de duas vias diferentes: (1) síntese “*de novo*”, que envolve a produção, em condições definidas, de precursores de ácidos graxos, como acetil e malonil-CoA e sua integração na via biossintética de acúmulo de lipídeos e (2) a via metabólica “*ex novo*”, que envolve a absorção de ácidos graxos, óleos e triacilgliceróis (TAG) do meio de cultura e seu acúmulo em uma forma inalterada ou modificada dentro da célula. Esta via requer a hidrólise do substrato hidrofóbico (HS), o transporte dos ácidos graxos liberados para dentro da célula, a sua reposição em de frações TAG e esteril éster (SE) e o seu acúmulo dentro do corpo lipídico. (BEOPOULOS et al., 2009)

Em microrganismos oleaginosos, o acúmulo de lipídeos ocorre quando há a exaustão de algum nutriente do meio de cultura. Embora muitos nutrientes possam ser limitados, geralmente se limita o nitrogênio para esse propósito. Quando o nitrogênio se torna não disponível o organismo continua a assimilar a fonte de carbono, porém o crescimento celular se torna reduzido, uma vez que o nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (BEOPOULOS; CHARDOT; NICAUD, 2009).

A síntese de lipídeos é representada na Figura 2.3. Esta síntese ocorre quando há falta de nitrogênio no meio, logo para suprir a sua ausência, é ativado a enzima AMP desaminase que quebra as moléculas de AMP, liberando assim NH_4^+ . Na mitocôndria, os baixos níveis de AMP faz com que a atividade da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) diminua ou até pare, fazendo com que na mitocôndria o isocitrato, através da enzima aconitase, seja convertido em citrato

(CIT), aumentando assim a concentração de CIT na mitocôndria. Então o CIT é transportado por citrato/malato translocase (CMT) da mitocôndria para o citoplasma onde é clivado pela ATP:citrato liase (ACL) em Acetil-CoA e oxaloacetato. O oxaloacetato é reduzido pela malato desidrogenase (MD) para malato que é convertido em piruvato liberando NADPH. O Acetil-CoA é então convertido pela enzima acetil-CoA carboxilase para malonil-CoA, o qual é utilizado para síntese de ácidos graxos (GARAY; BOUNDY-MILLS; GERMAN, 2014).

Figura 2.3 – Via metabólica da síntese de lipídeos a partir da glicose, glicerol e xilose.



Fonte: Adaptado de Jin et al. (2015)

2.6 Fatores que influenciam a produção de Lipídeos

Em um cultivo microbiano há vários fatores que influenciam a eficiência do processo, como por exemplo, a composição do meio e as condições operacionais usadas na fermentação. Diferentes microrganismos requerem determinados tipos de nutrientes e condições para converter, de uma forma eficiente, os açúcares em

produtos de interesse (SILVA et al., 2012). Por esse motivo, é extremamente importante conhecer os efeitos de cada parâmetro sobre o processo.

O efeito das fontes de nitrogênio e de sua concentração sobre o acúmulo total de ácidos graxos variara com a espécie da levedura. Em um estudo feito com 17 espécies (dentre elas *Candida curvata*, *C. utilis*, *Hansenula saturnus*, *Lipomyces lipofer*, *L. satarkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *R. graminis*, *S. cerevisiae* e *Trichosporon cutaneum*), foi observado que conteúdo de lipídeos variou muito pouco entre as espécies estudadas cultivadas em fontes de nitrogênio inorgânica como o cloreto de amônio e em fontes de nitrogênio orgânica tais como asparagina e glutamato. A *Rhodospiridium toruloides*, por outro lado, apresentou um maior acúmulo de lipídeos quando cultivada em meio contendo uma fonte de nitrogênio orgânica ao invés de uma fonte de nitrogênio inorgânica (EVANS; RATLEDGE, 1984).

Sitepu et al. (2013) cultivaram 69 cepas de leveduras em um meio composto por glicose (120 g/L), cloreto de cálcio (0,1 g/L), cloreto de amônio (0,5 g/L), extrato de levedura (1,5 g/L), KH_2PO_4 (7,0 g/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,5 g/L), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,08 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10,0 mg/L), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,07 mg/L), CuSO_4 (0,1 mg/L) e $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ (0,063 mg/L). Foi observado que a limitação de nitrogênio induziu a um grande acúmulo de lipídeos nas leveduras oleaginosas. Por este motivo a razão molar entre carbono e nitrogênio (C/N) do meio de cultivo tem um grande efeito na produção de lipídeo por microrganismos. A maior parte das leveduras oleaginosas conhecidas acumulam mais lipídeos quando a razão C/N é aumentada até um determinado ponto que pode variar de espécie para espécie, a partir desse ponto o acúmulo de lipídeos decresce. O acúmulo de lipídeos é desencadeado quando o nitrogênio é esgotado no meio. Como mostrado por Beopoulos et al. (2009) ao avaliar a levedura *Rhodotorula glutinis*, quando houve um aumento da razão molar de C/N de 150 para 350, foi aumentado também o fator de conversão de glicose em lipídeos de 0,25 para 0,40 g/g. Os autores ainda observaram que se aumentando a razão molar acima de 350, a viabilidade celular da levedura foi decrescida. Kraisintu, Yongmanitchai e Limtong (2010) quantificou a biomassa e a produção de lipídeos em uma cepa de *R. toruloides* sob várias condições incluindo a razão de C/N. Eles concluíram que a razão C/N apresentou um efeito muito significativo. De acordo com o que foi relatado, aumentando-se a razão C/N de 65 para 140, resultou em decréscimo do crescimento celular, porém

em aumento do teor de lipídeos. Em média, a produtividade foi aumentada discretamente nas maiores razões molares de C/N de 115 e 140, com um máximo teor de lipídeo de 62,3% na razão de C/N de 140.

Nos processos fermentativos aeróbicos, o oxigênio é um nutriente muito importante, sendo utilizado pelos microrganismos para seu crescimento, manutenção e produção de metabólitos, e a sua escassez pode afetar a performance do processo (ÇALIK et al., 2004). Por esse motivo é importante assegurar que o oxigênio esteja chegando ao meio de cultura de forma adequada. A medida que a viscosidade do meio aumenta, devido ao crescimento celular, a transferência de oxigênio se torna um fator limitante para o seu crescimento. Em cultivos aeróbicos a taxa de transferência de oxigênio (OTR) que é fornecida, deve pelo menos ser igual a taxa de oxigênio que é demandada pelo microrganismo. A OTR é diretamente proporcional ao coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) e ao gradiente de concentração de oxigênio no presente no meio. O valor máximo do gradiente de concentração é limitado devido à baixa solubilidade do oxigênio na fase líquida, e o valor máximo da taxa de transferência de oxigênio é dado pelo produto do k_{LA} com a concentração de saturação de oxigênio no meio.

Há vários parâmetros que podem influenciar na taxa de transferência de oxigênio, tais como as propriedades físicas do gás e do líquido, condições operacionais do processo, os parâmetros geométricos do biorreator e a presença de microrganismos que irão consumir o oxigênio. Como os bioprocessos envolvem tanto fenômenos de transporte quanto reações bioquímicas de várias espécies químicas, pode ocorrer que se o transporte dessas substâncias seja feito numa taxa consideravelmente maior do que a taxa das reações metabólicas, a taxa de conversão desse substrato é governada pela cinética das reações bioquímicas, contudo se ocorrer o contrário, a taxa das reações metabólicas forem maiores que a do transporte dessas substâncias então a taxa de conversão do substrato será regida pelos fenômenos de transporte. Por esse motivo é necessário garantir que haja uma transferência de oxigênio eficiente para o processo. (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). Em estudos realizados por Yen e Liu (2014), em reatores do tipo *airlift*, foi avaliada a influência da taxa de aeração empregada na produção de lipídeos pela levedura *R. glutinis*. Foi observado que quando houve um aumento na taxa de aeração de 1 para 2 vvm, foi observado um aumento de cerca de 53% na quantidade de células obtidas (de 16,6 para 25,4 g/L) e um aumento de cerca de

73% na quantidade de lipídeos obtidos (de 7,4 para 12,8 g/L). Segundo os autores esse aumento foi devido ao aumento do valor do k_La , que passou de 8,1 para 16,1 h^{-1} , quando a taxa de aeração passou de 1 para 2 vvm, o que promoveu uma maior quantidade de oxigênio disponível no meio.

Diferentes espécies de leveduras são capazes de utilizar diferentes fontes de carboidratos tais como glicerol, pentoses e hexoses por exemplo. Uma estirpe de levedura deve ser selecionada por ser capaz de converter a maior quantidade possível de açúcares presentes no meio nos produtos desejados. Além disso, a levedura selecionada deve ser a que é mais capaz de tolerar a inibição devido a altas concentrações de açúcar do meio de cultivo (SITEPU et al., 2014). Diferentes comportamentos são observados para diferentes espécies, por exemplo Kraisintu, Yongmanitchai e Limtong (2010) observaram que para a levedura *R. toruloides* DMKU3-TK16 houve um aumento da conversão lipídica em meios contendo até 70 g/L de glicose, mas quando a concentração foi maior a produção de lipídeos e células diminuiu. Já por outro lado, Amaretti et al. (2010) utilizando a levedura *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785, observaram que ela continuou a aumentar a produção de lipídeos e biomassa até uma concentração ótima de 120 g/L de glicose.

O efeito de uma alta concentração de açúcares no meio de cultivo sobre a produção de lipídeos varia de acordo com a espécie da levedura. É observado uma diferença bem marcante quando comparadas espécies de leveduras que são Crabtree negativas e Crabtree positivas. Leveduras Crabtree positivas tais como *S. cerevisiae* e *Y. lipolytica* estão sujeitas a repressão catabólica, enquanto que as leveduras Crabtree negativas, tais como a *R. glutinis*, *C. utilis* e a *Pichia stipitis* não estão. Sabe-se há algum tempo que enquanto que as leveduras que são Crabtree positivas produzem menos lipídeos sob altas concentrações de glicose, as que são Crabtree negativas conseguem acumular maiores quantidades de lipídeos totais. Isso foi possível observar com a levedura oleaginosa *R. glacialis* que é Crabtree negativa (AMARETTI et al., 2010; RATTRAY; SCHIBECI; KIDBY, 1975; SITEPU et al., 2014).

Para se obter os lipídeos microbianos pode-se utilizar substratos de menor custo que a glicose, tais como soro de leite, hidrolisados, glicerina bruta, entre outros. Por exemplo, Zhao et al. (2008) utilizam uma mistura de glicose com xilose (proporção de 2:1 de glicose para xilose em m/m) como fonte de carbono para cultivar a levedura *Lipomyces starkeyi* para a produção de lipídeos. Ao final do

cultivo em frasco, obteve-se 20,5 g/L de células com um teor de lipídeos em torno de 61,5% em massa seca em 5 dias de cultivo.

O pH um fator de grande importância que pode afetar tanto o crescimento quanto a produção de lipídeos. Seus efeitos sobre essas variáveis mudam de acordo com as diversas condições de composição do meio de cultivo, de acordo com o microrganismo utilizado e também das condições operacionais (LUO et al., 2013). Por exemplo, em estudos realizados por Johnson et al. (1992), utilizando-se a levedura *Rhodotorula glutinis* IIP-30, foram avaliados os valores de pH 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0, sendo observado o maior consumo de substrato (81 g/L), biomassa (22,3 g/L), e teor de lipídeos (66% m/m de biomassa) no pH 4,0 em 120 h de cultivo.

Em uma escala industrial, o controle do pH adiciona custos ao processo de produção. Por este motivo deve-se preferir utilizar leveduras que possam acumular lipídeos apesar do meio de cultivo apresentar variações no pH. Em geral, leveduras são mais tolerantes a meios ácidos, os que a tornam muito úteis para a fermentação de alimentos e bebidas de baixo pH, como por exemplo, vinho, pickles, azeitonas, entre outros. Condições de cultivo mais ácidas são também utilizadas industrialmente para prevenir o crescimento de várias bactérias que podem ser contaminantes em potencial. (SITEPU et al., 2014)

A temperatura do meio de cultivo é também um fator muito importante para o processo, pois influencia no crescimento celular e no acúmulo de lipídeos pela levedura. Em estudo realizado por Zhang et al. (2014), o efeito da temperatura foi avaliado sobre o acúmulo de lipídeos e sobre o crescimento celular para a levedura *Rhodotorula glutinis*. Foi observado pelos autores que em cultivos realizados a temperatura de 30 °C obteve-se maiores concentrações celulares do que o obtido em temperatura de 24 °C (respectivamente, 17,9 g/L em 30 h, e 15,8 g/L, em 40 h). Os autores também reportam que para temperaturas maiores de 44 °C e menores que 18 °C, há inibição do crescimento celular. Já para o acúmulo de lipídeos os autores reportaram que para a temperatura de 24 e 30 °C a concentração de lipídeos se manteve semelhante, até 45 h de cultivo. Após esse período houve estagnação do crescimento celular e o cultivo em 24 °C atingiu um acúmulo de lipídeos de 6,2 g/L em 50 h, valor maior se comparado ao cultivo em 30 °C que obteve 5,1 g/L em 50 h. Segundo os autores isso é atribuído ao alto teor residual de glicose e a deficiência de nitrogênio presente no meio, mostrando que o

mecanismo de acúmulo de lipídeos continua ativo por um certo período de tempo após o crescimento celular ter sido interrompido.

A adição de outros componentes ao meio de cultivo pode impactar no acúmulo de lipídeos por leveduras. Enquanto os efeitos de compostos de nitrogênio e concentrações, e razão C/N, sobre o teor de lipídeos já foram amplamente estudados, os efeitos de outros compostos, tais como fósforo, enxofre, entre outros não foram. Limitando-se o fósforo em meio de cultivo da *S. cerevisiae*, por exemplo resultou em aumento do teor de triglicerídeos (TAG). Aumentando o teor de NaCl em 10% resultou em um aumento significativo no teor de lipídeos da *Candida albicans* (RATTRAY; SCHIBECI; KIDBY, 1975). O uso de um inóculo novo e ativo também é crucial para a maioria das espécies de leveduras (SITEPU et al., 2014).

2.7 Produção de lipídeos microbianos em biorreatores

Atualmente na indústria, há vários tipos de biorreatores que são utilizados, cada um se adequa melhor ao tipo de cultivo. Os principais biorreatores utilizados para cultivos em fase líquida são: biorreator tipo tanque agitado (*STR – Stirred Tank Reactor*), coluna de bolhas e *airlift*. Sendo que a principal diferença entre o STR e os colunas de bolhas e *airlift* é sua agitação, enquanto que o STR é agitado mecanicamente por pás acopladas a motores elétricos, os outros dois são agitados pelo próprio fluxo de ar que passam por eles. Cerca de 90% dos biorreatores empregados em processos industriais são do tipo STR, pois conseguem assegurar uma correta distribuição de nutrientes, tornando o meio mais homogêneo, e também uma confiável transferência de calor e massa para o controle de temperatura e suprimento de oxigênio. Embora eles sejam muito utilizados podem não se tornar muito adequados quando o grau de agitação requerido para o processo para atingir a transferência de massa adequada se torna muito elevado, pois além de causar danos aos microrganismos devido às zonas de alto cisalhamento das pás do agitador, a energia que é necessária para promover uma boa mistura, para garantir assim uma boa transferência de massa, é muito elevada e se torna necessário remove-la do meio para se manter a temperatura controlada. Por esses motivos, mais estudos estão sendo desenvolvidos com outros tipos de biorreatores, como por exemplo o de coluna de bolhas e *airlift*. (ALVES, 2010)

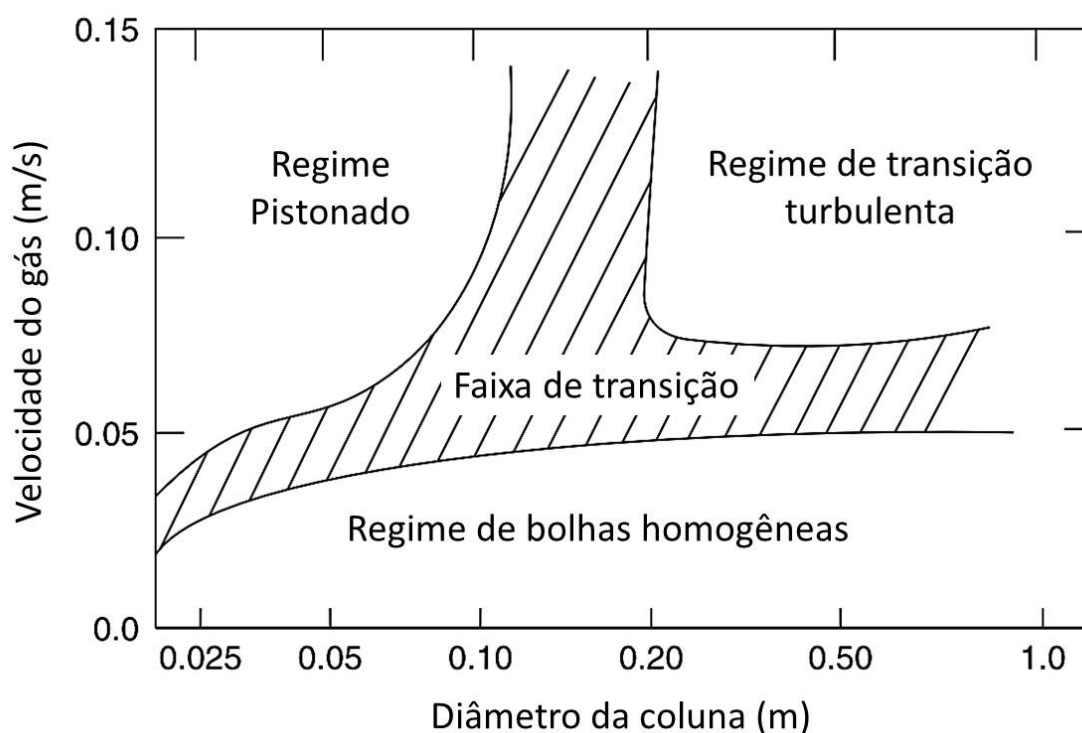
O biorreator do tipo coluna de bolhas é basicamente um vaso cilíndrico com um distribuidor de gás (*spargers*) em seu fundo. O gás é distribuído em forma de bolhas dentro da fase líquida, o que gera um movimento aleatório de seus fluidos. O seu design e aumento de escala tem ganhado uma considerável atenção nos últimos anos devido a sua complexa hidrodinâmica e na influência que ela exerce nas características do transporte de massa e energia. Embora sua construção seja simples, é necessário compreender sua dinâmica multifásica de fluidos, para que se obtenha sucesso do processo quando se amplia a sua escala e no seu design. (DEGALEESAN; DUDUKOVIC; PAN, 2001)

Segundo Kantarci, Borak e Ulgen (2005) as principais características que devem ser observadas são:

- Dimensionamento: razão entre o seu comprimento e seu diâmetro (L/D), geralmente, em processos bioquímicos essa razão está entre 2 e 5;
- Dinâmica do fluido e regime: há basicamente três tipos de regimes que são mantidos de acordo com a velocidade superficial do gás, o regime homogêneo (obtidos em baixas velocidades superficiais do gás, algo em torno de 5 cm/s) , heterogêneo (obtido com altas velocidades superficiais de gás > 5 cm/s) e o regime pistonado (*slug flow*) (observado apenas em colunas de pequenos diâmetros, com alta velocidade superficial de gás);
- Retenção gasosa (*gas holdup*): que seria a fração de volume ocupada pelas bolhas de gás;
- Propriedades do meio de cultivo: viscosidade (que irá interferir no tamanho da bolha, na retenção gasosa), presença de surfactantes, entre outros;
- Condições de operação: pressão e temperatura que podem interferir na retenção gasosa;
- Dispensor do gás: afeta as características das bolhas;
- As características das bolhas: tamanho médio e distribuição;
- A velocidade superficial do gás;
- Coeficientes de transferência de massa e energia.

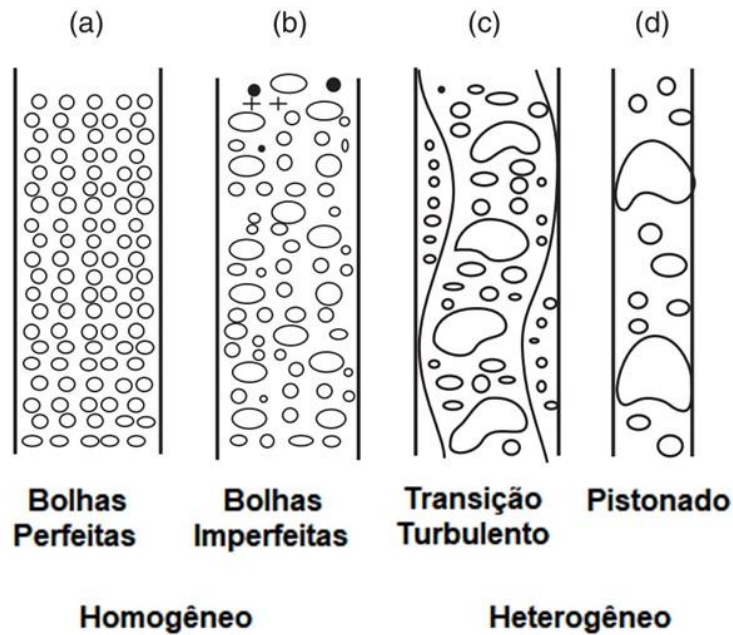
Na Figura 2.4 é apresentado o diagrama de regimes que podem ocorrer em um reator do tipo coluna bolhas em função do diâmetro da coluna, e da velocidade do gás. Em baixas velocidades superficial do gás (menores que 0,05 m/s) temos o regime homogêneo de bolhas (Figura 2.5a e b), em diâmetros maiores que 0,2 m, com velocidades superficiais de gás maiores que 0,05 m/s, temos o regime de transição turbulento (Figura 2.5c), e para colunas com diâmetros menores que 0,1 m para velocidades superficial do gás acima de 0,05 m/s encontramos o regime pistonado (*slug flow*) (Figura 2.5d).

Figura 2.4 – Diagrama dos possíveis regimes que podem ocorrer em um reator do tipo coluna de bolhas



Fonte: Adaptado de Kantarci; Borak; Ulgen (2005).

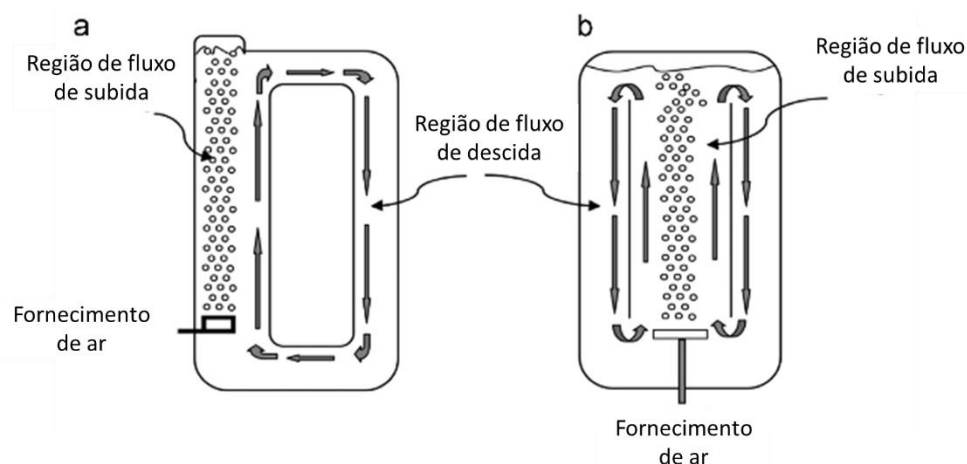
Figura 2.5 – Esquema dos possíveis regimes que ocorrem em um reator do tipo coluna de bolhas.



Fonte: Adaptado de Kantarci; Borak; Ulgen (2005).

Os reatores do tipo *airlift*, são bem semelhantes em termos de estrutura, se comparados aos reatores do tipo coluna de bolhas e podem ser considerados como uma variação do reator do tipo coluna de bolhas. Os reatores do tipo *airlift* podem ser classificados como de fluxo externo (Figura 2.6a), onde há a presença de um duto externo por onde o fluxo é conduzido, ou de fluxo interno (Figura 2.6b), onde há a presença de um tubo ou uma parede interna, que possibilita a circulação do fluxo no reator. No reator do tipo *airlift* são criadas duas principais regiões de movimentação de fluxo: a região de fluxo ascendente, onde o dispersor de ar é direcionado de tal forma que a injeção do ar causa o movimento ascendente do fluido; e a região de fluxo descendente. Devido a esta circulação do fluido, o reator do tipo *airlift*, apresenta um melhor controle da mistura entre líquido e gás (KADIC; HEINDEL, 2014).

Figura 2.6 – Reatores do tipo airlift com (a) fluxo externo, e com (b) fluxo interno.



Fonte: Adaptado de AL-Mashhadani; Wilkinson; Zimmerman (2015)

O estudo de cultivos em biorreatores de bancada é o próximo passo para uma ampliação de escala de um processo. Ao se fazer fermentações em frascos obtemos parâmetros importantes que deverão determinar muitos fatores importantes para isso. Pois tendo em vista que as condições de cultivo influenciam na produtividade, é fundamental o desenvolvimento de estudo de bioprocessos em diferentes escalas (CHRISTOPHE et al., 2012).

Algumas complicações podem surgir, quanto maior for a escala de um processo, e necessitam de atenção para serem contornadas. Como a maioria dos processos fermentativos requerem esterilização, o custo com utilidades, como o vapor utilizado para se esterilizar, aumenta significativamente com o tamanho do biorreator empregado, uma vez que não se pode esteriliza-lo em autoclaves convencionais (HSIAO et al., 1999; MIYAMOTO; WABLE; BENEMANN, 1988).

Outro fator que se torna crítico quando se aumenta o volume do reator é a transferência de massa, e para proporcionar seu aumento, é necessário adequar o design do biorreator, ou usar de estratégias, como promover uma melhor agitação do meio de cultivo, aumentar a taxa da aeração do reator, empregar *micro-spargers*, para diminuir o tamanho das bolhas e aumentar a área superficial de contato do gás com o líquido entre outros (KUNDIYANA; HUHNKE; WILKINS, 2010).

Como principais vantagens do uso de biorreatores em relação ao cultivo em frasco agitado estão: o maior volume de produção obtido, e também um maior

controle de parâmetros de processo, tais como temperatura, pH, agitação, entre outros (ALVES, 2010).

Na Tabela 2.4 são apresentados alguns cultivos realizados tanto em frasco agitado, quanto em biorreatores, os microrganismos utilizados nos cultivos, assim como a biomassa, o acúmulo de lipídeos e suas respectivas produtividades obtidas. Nota-se que na maioria dos casos os cultivos em frascos agitados obtiveram menores concentrações de células e lipídeos que os obtidos em biorreatores, chegando a um aumento de até quatro vezes na produtividade em células e lipídeos, quando passou do frasco agitado para o biorreator (no caso da levedura *R. toruloides* Y4). Tal fato pode ser atribuído a melhor aeração proporcionada pelos biorreatores em comparação a aeração dos frascos agitados. Uma exceção a este comportamento foi observada com levedura *R. diobovatum* 08-225, onde houve uma redução de cerca de 30% na produtividade tanto de células quanto de lipídeos.

Comparando-se entre os reatores do tipo *airlift* e tanque agitado apresentados na Tabela 2.4, a levedura *S. pararoseus* KM281507 apresentou maiores concentrações de células e lipídeos no reator *airlift*, em sete dias de cultivo levando a uma produtividade em células e lipídeos cerca de 63 e 73%, respectivamente, maior do que o obtido no reator do tipo tanque agitado. Já a levedura *R. glutinis* BCRC 22361 conseguiu atingir maiores concentração celular e de lipídeos em menor tempo, comparado ao cultivo realizado no reator *airlift* atingindo maiores produtividades de ambos. Já para o biorreator do tipo coluna de bolhas não foi encontrado dados na literatura referentes a produção de lipídeos.

Tabela 2.4 – Microrganismo, modo de cultivo, tempo final do cultivo (t), máxima biomassa obtida (X), máxima concentração de lipídeos (L), produtividade em células (Q_x), produtividade em lipídeos (Q_L), para cultivos realizados em frasco agitado e biorreatores.

Microrganismo	Modo de Cultivo	t (h)	X (g/L)	L (g/L)	Q_x (g/L.dia)	Q_L (g/L.dia)	Ref.
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389	Frasco agitado	160	19,2	9,2	2,9	1,4	Xu et al. (2012)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389	Batelada (Tanque agitado)	200	26,7	18,5	3,2	2,2	Xu et al. (2012)
<i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR 5159	Frasco agitado	72	6,0	2,5	2,0	0,8	Saenge et al. (2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR 5159	Batelada (Tanque agitado)	72	8,2	4,3	2,7	1,4	Saenge et al. (2011)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Frasco agitado	144	25,5	10,1	4,3	1,7	Zhao et al. (2010)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Batelada (Tanque agitado)	45	40,0	17,2	21,3	9,1	Zhao et al. (2010)
<i>Rhodospiridium diobovatum</i> 08-225	Frasco agitado	120	14,1	7,1	2,8	1,4	Munch et al. (2015)
<i>Rhodospiridium diobovatum</i> 08-225	Batelada (Tanque agitado)	168	13,6	6,9	1,9	1,0	Munch et al. (2015)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> KM281507	Batelada (Tanque agitado)	168	9,2	2,8	1,3	0,4	Manowattana et al. (2018)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> KM281507	Batelada (Airlift)	168	15,1	4,9	2,2	0,7	Manowattana et al. (2018)
<i>Rhodotorula glutinis</i> BCRC 22361	Batelada (Tanque agitado)	92	20,3	9,1	5,3	2,3	Yen; Liu (2014)
<i>Rhodotorula glutinis</i> BCRC 22360	Batelada (Airlift)	140	16,6	7,4	2,8	1,2	Yen; Liu (2014)

Fonte: Elaborado pelo autor.

3. Objetivo

Este trabalho teve como objetivos, o estudo da influência das condições de cultivo sobre a produção de lipídeos pela levedura *Rhodotorula glutinis*, a partir de glicerol, visando estabelecer uma condição de maior acúmulo de lipídeos, avaliar a ampliação de escala em biorreatores de bancada, e também avaliar a utilização de tais lipídeos para produção de biodiesel.

3.1 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos das variáveis concentração inicial de glicerol, razão molar entre C/N, pH e concentração de inóculo sobre o acúmulo de lipídeos, através de um planejamento de experimentos 2^4 do tipo composto central rotacional (DCCR) realizado em frasco agitado. Estabelecer uma condição de cultivo para maximização da produção de lipídeos através de metodologia de superfície de resposta utilizando as respostas obtidas pelo planejamento de experimentos.
- Avaliar os efeitos da ampliação de escala sobre o acúmulo de lipídeos pela levedura, em cultivos em biorreatores de agitação pneumática dos tipos coluna de bolhas e *airlift*, de 0,5 para 1,8 L.
- Avaliar o perfil de ácidos graxos do óleo microbiano obtido nos cultivos realizados em biorreatores, assim como as propriedades estimadas para o biodiesel obtido a partir destes óleos.

4. Materiais e Métodos

4.1 Microrganismo e preparação do inóculo

O microrganismo utilizado neste estudo foi a levedura *Rhodotorula glutinis* NRRL-Y-12905, cedida pela USDA (*United States Department of Agriculture*), de Peoria, Illinois. A levedura foi mantida a 4 °C em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinado.

Para a obtenção do inóculo foi utilizado meio de cultura com a composição apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Composição do meio de inóculo.

Composto	Concentração (g/L)
Glicerina bidestilada	30
Extrato de Levedura	3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3
KH ₂ PO ₄	20

Fonte: Bento (2017).

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 0,5 kgf/cm² por 15 min. Os inóculos foram preparados transferindo-se uma alçada de células do meio de manutenção, para os tubos de ensaio contendo aproximadamente 5 mL de água destilada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para os Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura, e foram incubadas em agitador rotatório a 30 °C, sob agitação de 250 rpm por 48 h. Em seguida as células foram separadas por centrifugação e ressuspensas em água destilada estéril para a obtenção de uma solução celular densa. A partir desta suspensão foi calculado o volume necessário para inocular o meio fermentativo com concentração celular desejada conforme a condição experimental.

4.2 Estudo da produção de lipídeos em frasco agitado

Esta etapa visa estabelecer condições de cultivos, em frascos agitados, que favoreçam o acúmulo de lipídeos pela levedura, as quais foram utilizadas como base para uma etapa seguinte dos estudos em biorreator.

Nesta etapa foi realizado um planejamento composto central rotacional (DCCR) 2^4 , face centrada, com seis pontos centrais, conforme mostrado na Tabela 4.2. No planejamento foram avaliados os efeitos das variáveis concentração inicial de glicerol (S_0), a razão molar inicial entre carbono e nitrogênio (C/N), o pH inicial do meio de cultivo e a concentração de inóculo utilizado (X_0) sobre o acúmulo de lipídeos, crescimento celular e consumo de substrato. Para a obtenção dos valores de razão C/N, manteve-se fixo a quantidade de carbono proveniente do glicerol (39% de carbono), e variou-se a quantidade de nitrogênio, proveniente do extrato de levedura (11% de nitrogênio) e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (21% de nitrogênio). As concentrações de MgSO_4 e KH_2PO_4 foram mantidas fixas em 1 e 20 g/L, respectivamente em todos os ensaios.

Para o preparo dos meios de cultivo, foi utilizado três soluções concentradas, a primeira contendo glicerol (500 g/L), a segunda contendo extrato de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (ambos a 75 g/L), e a terceira contendo MgSO_4 (5 g/L) e KH_2PO_4 (100 g/L). Os volumes necessários para a preparação dos meios de cultivo, nas condições previstas na Tabela 4.2, foram calculados com base na concentração de glicerol e na razão C/N, para um volume final dos meios de cultivo de 50 mL, levando-se em conta que cerca de 34% do nitrogênio total presente no meio de cultivo é proveniente do extrato de levedura e os outros 66% do $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (nessa proporção a concentração de extrato de levedura é a mesma do $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$). Após o preparo dos meios, o ajuste do pH inicial foi realizado com soluções concentradas de NaOH e H_2SO_4 . Em seguida os meios foram esterilizados em autoclave a 0,5 kgf/cm² por 15 min.

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, contendo em cada um 50 mL de meio de cultivo que foram mantidos em agitadores rotatórios à 30 °C com uma agitação de 250 rpm durante 240 h. Alíquotas de 2 mL do meio foram retiradas a cada 100 h para o acompanhamento analítico do processo. Ao final das 240 h foram feitos o peso seco celular e a extração e quantificação de lipídeos, para determinação, pelo método de superfície de resposta, de um modelo matemático

para a previsão de uma melhor condição para produção de lipídeos. A qual foi utilizada para a etapa de cultivo em biorreatores.

Tabela 4.2 – Planejamento composto central rotacional DCCR 2⁴, face centrada, com valores reais e níveis codificados das variáveis Concentração de Substrato (S_0), Razão molar entre carbono e nitrogênio (Razão C/N), pH inicial e concentração de inóculo (X_0).

Ensaio	Variáveis do planejamento							
	S_0		Razão C/N		pH inicial		X_0	
	(g/L)	Nível	C/N	Nível	pH	Nível	(g/L)	Nível
1	40	-1	20	-1	5	-1	1	-1
2	200	1	20	-1	5	-1	1	-1
3	40	-1	100	1	5	-1	1	-1
4	200	1	100	1	5	-1	1	-1
5	40	-1	20	-1	7	1	1	-1
6	200	1	20	-1	7	1	1	-1
7	40	-1	100	1	7	1	1	-1
8	200	1	100	1	7	1	1	-1
9	40	-1	20	-1	5	-1	5	1
10	200	1	20	-1	5	-1	5	1
11	40	-1	100	1	5	-1	5	1
12	200	1	100	1	5	-1	5	1
13	40	-1	20	-1	7	1	5	1
14	200	1	20	-1	7	1	5	1
15	40	-1	100	1	7	1	5	1
16	200	1	100	1	7	1	5	1
17	40	-1	60	0	6	0	3	0
18	200	1	60	0	6	0	3	0
19	120	0	20	-1	6	0	3	0
20	120	0	100	1	6	0	3	0
21	120	0	60	0	5	-1	3	0
22	120	0	60	0	7	1	3	0
23	120	0	60	0	6	0	1	-1
24	120	0	60	0	6	0	5	1
25	120	0	60	0	6	0	3	0
26	120	0	60	0	6	0	3	0
27	120	0	60	0	6	0	3	0
28	120	0	60	0	6	0	3	0
29	120	0	60	0	6	0	3	0
30	120	0	60	0	6	0	3	0

Fonte: próprio autor.

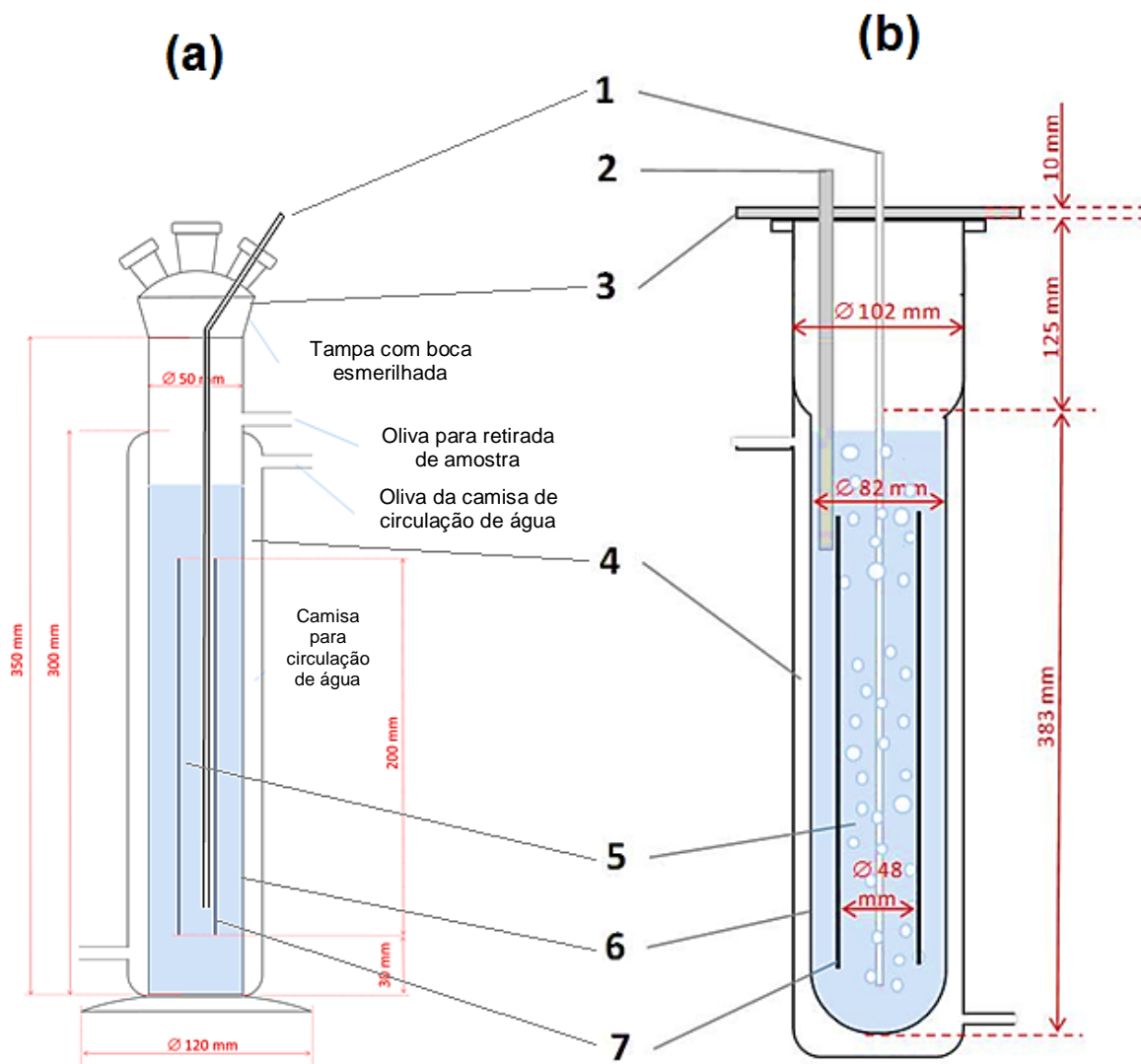
Para a validação desse modelo matemático foram feitos seis cultivos em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultivo nas condições determinadas pelo modelo matemático. Os cultivos também foram incubados à 30 °C, com agitação de 250 rpm durante 240 h.

4.3 Estudo da produção de lipídeos em biorreatores

Nesta etapa foram utilizados reatores do tipo coluna de bolhas e *airlift* para produção de lipídeos. Os ensaios foram realizados em fermentadores de bancada do tipo coluna de bolhas e *airlift* confeccionado em vidro com o volume útil de 0,5 L e de 1,8 L (Figura 4.1), acoplados à um banho termostático. Os cultivos foram realizados empregando a composição do meio de cultura e as condições pH e concentração de inóculo estabelecidos na etapa anterior deste trabalho de estudo das condições de cultivo. A temperatura foi mantida a 30 °C. O k_{La} foi determinado em condições abióticas (antes da inoculação), e a vazão de ar comprimido fornecida ao reator foi mantida fixa em 0,1 vvm durante todo o cultivo. Amostras foram retiradas a cada 48 h para o acompanhamento do processo.

Os biorreatores foram caracterizados quanto aos seus parâmetros hidrodinâmicos e de transferência de oxigênio sob condições abióticas. Foram caracterizados os seguintes parâmetros hidrodinâmicos: a velocidade superficial de gás, tempo de mistura, retenção gasosa. Já o parâmetro de transferência de massa foi determinado: o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}).

Figura 4.1 – Biorreator de bancada do tipo airlift, dotado de entrada de ar (1), Sonda polarográfica (2), tampa (3), camisa para controle de temperatura (4), meio de cultivo (5), vaso de vidro (6) e tubo concêntrico do reator airlift (7). Reator de 500 mL (a) e Reator de 1800 mL (b). Os reatores coluna de bolhas apresentam as mesmas características, exceto pela ausência do tubo concêntrico (7).



Fonte: próprio autor.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Determinação do k_{La}

O k_{La} pode ser determinado pela técnica de passagem de gás através do método estático. Nesse método o oxigênio é removido do meio pela passagem de nitrogênio. Logo após a retirada do oxigênio do meio, a aeração é novamente retomada, e o aumento da concentração do oxigênio no meio é acompanhada pelo tempo. Esse aumento da concentração de oxigênio pode ser descrito como sendo: $dC_L/dt = k_{La}(C^* - C_L)$ onde C_L e C^* são as concentrações de oxigênio presente no meio e de saturação, respectivamente. Quando integramos a expressão, obtemos: $\ln(C^* - C_L) = -k_{La} \cdot t$. Ao plotar o gráfico de $\ln(C^* - C_L)$ versus o tempo, a inclinação da reta é igual à $-k_{La}$. O k_{La} é utilizado para medir a capacidade de aeração de um biorreator, pois quanto maior for o seu valor, maior é a capacidade de aeração do sistema. O k_{La} depende tanto das características de design do biorreator (dimensionamento), quanto dos parâmetros operacionais (taxa de aeração e agitação). Como os processos fermentativos aeróbicos dependem da disponibilidade de oxigênio no meio, o k_{La} se torna uma variável muito importante para o controle do processo, e também para o seu futuro escalonamento (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

Os coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio (k_{La}) foram determinados para os reatores, em condições abióticas. A determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi feita pelo método estático, proposto por Wise (1951). Para este propósito foi utilizada uma sonda de oxigênio dissolvido, a qual foi calibrada à pressão atmosférica, definindo-se como zero o meio isento de oxigênio, que foi removido com a passagem de nitrogênio pelo meio, e como 100% o meio saturado com ar atmosférico.

Após removido todo o oxigênio do meio de cultivo por introdução de nitrogênio, foi retomada a condição de aeração, sendo monitoradas a variação da porcentagem de oxigênio dissolvido em função do tempo, o que foi utilizado para calcular o valor de k_{La} através da forma integrada da equação proposta por Stanbury, Whitaker e Hall (1995), onde o valor de $-k_{La}$ é igual à inclinação resultante da representação linear de $\ln(C^* - C_L)$ em função do tempo.

Para os ensaios realizados para a determinação do k_{LA} foram utilizados dois tipos de dispersores diferentes, um metálico e outro de vidro sinterizado nas seguintes taxas de aeração de 0,1, 1,5, 2,5, 4,0 e 6,0 vvm.

4.4.2 Retenção gasosa

A retenção gasosa foi determinada pela técnica de expansão de volume, que consiste em medidas visuais de volume de líquido na condição não aerado (V_L) e do volume do líquido com o sistema aerado (V_G). A determinação da retenção global (ε_G) é dada pela Equação 4.1.

$$\varepsilon_G = \frac{V_G}{V_G + V_L} \quad (4.1)$$

4.4.3 Tempo de Mistura

A determinação do tempo de mistura foi realizada através de um ensaio do tipo degrau, onde se cria uma perturbação em uma dada variável, como a adição de um marcador químico, e se determina o tempo necessário para que o valor desta variável se estabilize. Para a determinação deste parâmetro foi utilizada a técnica de perturbação de condutividade.

Esta determinação foi realizada utilizando-se água, e o pulso foi gerado por um marcador salino (solução de NaCl 4 mol/L) introduzido no sistema. A evolução da concentração de sal no reator foi avaliada por meio de medições da condutividade elétrica do sistema. Esta solução de traçador foi injetada no fundo do reator e a condutividade foi medida, por um condutímetro. Para a determinação das concentrações de sal no meio reacional foi estabelecida uma relação entre a condutividade e a concentração de sal através de uma curva de calibração feita com soluções de sal com concentrações conhecidas.

4.4.4 Velocidade superficial do gás

A velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}) foi estimada com base na razão entre a vazão volumétrica de alimentação do gás (Q_G) e a área da seção transversal da região de subida (A_S) como mostrado na Equação 4.2.

$$U_{GS} = \frac{Q_G}{A_S} \quad (4.2)$$

4.4.5 Dosagem de glicerol

As concentrações de glicerol no meio de cultivo foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Waters com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), nas seguintes condições: temperatura de coluna de 45 °C; temperatura do detector de 35 °C, solução de ácido sulfúrico (0,005 mol/L) como fase móvel; fluxo de 0,6 mL/min; com volume de amostra de 20 µL. As amostras foram centrifugadas para a separação das células e alíquotas do sobrenadante foram diluídas e filtradas em filtro Sep-Pack C18 Cartridge (Waters Associates) antes das injeções. As concentrações de glicerol foram calculadas utilizando curvas de calibração.

4.4.6 Determinação de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada em um espectrofotômetro (BEL Engineering S.R.L, modelo UV-M51) pela medida das absorvâncias das amostras diluídas, utilizando água destilada como branco. As concentrações foram determinadas através da equação da curva de calibração entre peso seco e absorvância, a 600 nm, obtidas para o microrganismo.

Para obtenção da curva de calibração, foi preparada uma solução concentrada de células. Dessa solução concentrada de células foram retiradas três alíquotas de 3 mL e colocadas em cadinhos previamente pesados, que foram levados a estufa à 105 °C, sendo pesados diariamente até não se observar variação na massa comparando-se a última pesagem. Dessa mesma solução

concentrada de células foram preparadas diluições de 5x, 10x, 25x, 50x, 100x, 250x, 500x, 1000x, 2500x e 5000x, as quais a absorvância foi lida.

4.4.7 Extração e quantificação de lipídeos totais na biomassa

A extração dos lipídeos foi realizada utilizando-se o método de Bligh e Dyer (1959) modificado, sendo posteriormente quantificado por gravimetria. Para tal propósito foram retiradas amostras de 1 mL do meio de cultivo. Essas amostras foram centrifugadas para separação do sobrenadante. Para extração de lipídeos adicionou-se às células centrifugadas, 1 mL de metanol e 2 g de pérolas de vidro (0,50 mm de diâmetro). A mistura foi então submetida a agitação em vórtex por quatro ciclos de um minuto com intervalos de 1 min em banho de gelo. Após realização dos ciclos foram adicionados 2 mL de clorofórmio e a mistura foi agitada durante 1 h a 200 rpm, em seguida foram adicionados 1 mL de solução de KCl 0,88% e 0,8 mL de água destilada. A mistura foi agitada e centrifugada a 3500 rpm por 15 min para a separação de fases. Uma alíquota de 1 mL da fase de fundo (orgânica) a qual foi colocada em frascos de vidros previamente tarados, e levados a estufa a 80 °C por 48 h para a evaporação do solvente. Após a completa evaporação do solvente, os frascos foram pesados novamente, e a diferença de massa obtida foi utilizada para calcular a concentração de lipídeos, através da Equação 4.3, onde m_F é massa do frasco com a amostra contida, após a completa evaporação do solvente, m_I é a massa do frasco vazio, V_A é o volume de amostra coletada do meio de cultivo, V_{FO} é o volume da fase orgânica, no caso, o volume clorofórmio usado para extração, V_{AFO} é o volume de alíquota coletada da fase orgânica levada para a evaporação e L é a concentração de lipídeos em grama por litro de meio de cultivo.

$$L[g/L] = \frac{(m_F - m_I)[g]}{V_A[L]} \cdot \frac{V_{FO} [mL]}{V_{AFO} [mL]} \quad (4.3)$$

4.4.8 Composição em ácidos graxos do óleo microbiano

Para a determinação da composição de ácidos graxos presentes no óleo microbiano foi utilizada a cromatografia gasosa, segundo a metodologia descrita por AOCS (2004). Foi utilizado um cromatógrafo de fase gasosa equipado com coluna capilar DB-23 Agilent (50% cianopropil – metilpolisiloxano, com as seguintes dimensões 60 m, diâmetro interno: 0,25 mm, 0,25 µm filme), operando com hélio como gás de arraste e uma rampa de aquecimento de 110 °C por 5 min, de 110 – 215 °C (taxa de aquecimento de 5 °C/min) e a 215 °C por 24 min. Os padrões de ácido graxo utilizados foram os ácidos capróico (C6:0); caprílico (C8:0); cáprico (C10:0); láurico (C12:0); mirístico (C14:0); miristoléico (C14:1); pentadecanóico (C15:0); palmítico (C16:0); palmitoléico (C16:1); margárico (C17:0); cis-10-heptadecenóico (C17:1); esteárico (C18:0); oleico (C18:1); linoleico (C18:2); α-linolênico (C18:3 n-3); araquídico (C20:0); eicosenóico (C20:1); beênico (C22:0); erúcico (C22:1); lignocérico (C24:0) e nervônico (C24:1).

As amostras foram preparadas segundo metodologia proposta por Dong et al. (2015), onde 2 mL do meio de cultivo, contendo as células suspensas, foram colocadas em tubos de ensaio com tampa, os quais foram centrifugados a 3500 rpm por 10 min, em seguida o sobrenadante foi descartado, e as células foram lavadas e centrifugadas novamente, e o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao tubo com células, 5 mL de metanol e a amostra foi homogeneizada, em seguida foi adicionado 0,5 mL de solução aquosa de NaOH (14 mol/L) e foi agitada em vórtex por 10 s. A amostra foi deixada repousar em banho por 15 min à 85 °C. Após o banho, a amostra foi resfriada com água da torneira até a temperatura ambiente e foi adicionado 0,58 mL de solução de H₂SO₄ em metanol (12 mol/L) ao tubo, que foi agitado em vórtex por 1 min. Em seguida a amostra foi deixada em banho à 85 °C por 15 min novamente. Após ser resfriada até a temperatura ambiente, 2 mL de hexano e de água destilada foram adicionados para a extração, que foi feita em vórtex por 2 min. Após a extração a amostra foi centrifugada à 1500 g por 2 min, e a fase menos densa (fase de cima) foi coletada e armazenada, para análise por cromatografia gasosa.

4.5 Quantificação de nitrogênio no extrato de levedura

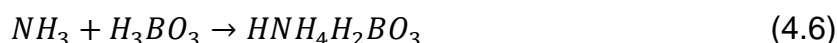
A quantificação de nitrogênio presente no extrato de levedura foi realizada pelo método 4500-Norg C, Semi-micro-Kjeldahl descrito no “*Standard methods for the examination of water and waste-water analysis*” (APHA, 1998). De uma solução com concentração conhecida de extrato de levedura foi coletado 1 mL de amostra, que foram submetidas a digestão em ácido sulfúrico concentrado para a conversão do nitrogênio em forma amoniacal que foi alcalinizado e separado por destilação em um aparelho Bunchi K-355, da Bucchi/Pensalab, com recolhimento em ácido bórico. A quantidade de amônia recolhida em ácido bórico foi determinada por destilação, e a quantidade de nitrogênio na amostra foi calculada com base na estequiometria das seguintes etapas: primeiramente transferiu-se a alíquota de 1 mL da amostra para o tubo Kjeldahl, à esta alíquota foi adicionado 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 2,0 g de mistura catalítica (sulfato de sódio anidro/ sulfato de cobre pentaidratado 20:1), em seguida a amostra foi levada ao digestor com aquecimento a temperatura de 250 °C, até que a amostra assumisse coloração azul límpida. A reação que ocorre nesta etapa é demonstrada na Equação 4.4



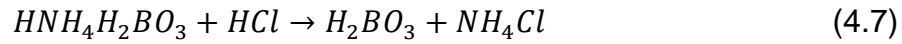
Após esse período retirou-se a amostra do digestor e adicionou-se uma solução 40% de NaOH até apresentar uma mudança na coloração de azul límpido a um azul escuro, tal reação é demonstrada na Equação 4.5



A amostra então foi levada ao destilador onde o ácido bórico com indicador teve a função de recolher o gás formado segundo a reação mostrada na Equação 4.6



Essa reação teve a duração de 4 minutos. Ao fim da reação retirou-se o produto do destilador e titulou-se com uma solução de HCl 0,01M. A Equação 4.7 representa esta etapa do processo.



Com isso podemos calcular a concentração de nitrogênio na amostra a partir da Equação 4.8

$$C = \frac{(V_{titulação} - V_{Branco}) \cdot f \cdot Concentração\ HCl}{V_{Amostra}} \quad (4.4)$$

4.6 Análise de resultados

Para a análise dos resultados dos cultivos foram considerados os seguintes parâmetros: fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e lipídeo ($Y_{P/S}$); produtividade volumétrica de biomassa (Q_X) e de lipídeos (Q_P). Os dados foram analisados quanto a cinética de crescimento considerando a velocidade específica de crescimento celular (μ_X), velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) e velocidade específica de produção de lipídeos (μ_P).

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas empregando o programa STATISTICA 13.4 (licença: JPZ807I453017ARCNACD-L) e Minitab (licença: 2081340-2332218), utilizando-se conceitos de estatística descritiva, análise multivariada e metodologia de superfície de resposta.

Para a estimativa das propriedades do biodiesel através do perfil de ácido graxo foi utilizado o software BiodieselAnalyzer©.

5. Resultados e Discussão

5.1 Estudo das condições de cultivo

A influência da concentração inicial de glicerol (S_0), da razão molar entre carbono e nitrogênio (C/N), do pH inicial e da concentração de inóculo (X_0) sobre o acúmulo de lipídeos, a concentração celular e o consumo de glicerol foram avaliados empregando um planejamento composto central rotacional (DCCR) 2^4 com face centrada e seis repetições no ponto central. Na Tabela 5.1 é mostrada as condições experimentais, assim como as respostas concentração celular (g/L), acúmulo de lipídeos (g/L) e consumo de glicerol (%), obtidas após 240 h de cultivo.

Nesta etapa do estudo verificou-se que a levedura foi capaz de crescer e acumular lipídeos em todas as condições avaliada. Verificou-se ainda que houve uma grande variação na concentração celular (cerca de 8 a 36 g/L), na concentração de lipídeo (cerca de 1 a 22 g/L) e no consumo de glicerol (de 44 a 100%) observados ao final dos cultivos, em função das diferentes condições experimentais avaliadas. Tal variação demonstra uma influência parâmetros estudados sobre as repostas do planejamento.

Foi observado, de um modo geral, que a concentração inicial de substrato (S_0) apresentou um efeito positivo sobre a concentração celular e o acúmulo de lipídeos obtidos, pois nas condições avaliadas em que há a maior concentração inicial de glicerol (200 g/L), foram obtidas concentrações de células e lipídeos superiores às alcançadas para os ensaios realizados com menor concentração inicial de glicerol (40 g/L).

Tabela 5.1 – Planejamento composto central rotacional DCCR 2⁴, face centrada, com valores das variáveis independentes: concentração de Substrato (S_0), razão molar entre carbono e nitrogênio (Razão C/N), pH inicial e concentração de inóculo (X_0) e das variáveis resposta células, acúmulo de lipídeos e consumo de glicerol, obtidos após 240 h de cultivo.

Exp	Variáveis independentes				Variáveis Resposta		
	S_0 (g/L)	C/N	pH	X_0 (g/L)	Células (g/L)	Lipídeos (g/L)	Consumo de Glicerol (%)
1	40	20	5	1	11,1	1,9	97,5
2	200	20	5	1	27,0	8,7	44,5
3	40	100	5	1	10,3	6,3	94,2
4	200	100	5	1	16,0	4,5	50,6
5	40	20	7	1	9,8	3,6	100,0
6	200	20	7	1	17,8	7,2	31,3
7	40	100	7	1	8,5	6,5	86,2
8	200	100	7	1	30,6	18,8	68,9
9	40	20	5	5	12,9	3,3	100,0
10	200	20	5	5	27,3	9,5	52,0
11	40	100	5	5	11,4	6,3	98,8
12	200	100	5	5	19,0	5,1	50,5
13	40	20	7	5	12,2	3,9	97,5
14	200	20	7	5	14,2	7,3	58,3
15	40	100	7	5	11,6	7,3	98,1
16	200	100	7	5	29,5	19,9	88,0
17	120	60	6	1	10,6	7,1	87,4
18	120	60	6	5	31,9	14,3	58,6
19	120	60	5	3	36,4	13,8	95,6
20	120	60	7	3	22,2	16,2	78,1
21	120	20	6	3	19,5	7,6	79,1
22	120	100	6	3	25,1	17,1	92,8
23	40	60	6	3	28,2	18,1	85,4
24	200	60	6	3	34,4	22,1	98,3
25	120	60	6	3	31,3	20,1	97,5
26	120	60	6	3	27,2	15,5	86,0
27	120	60	6	3	26,1	14,9	91,3
28	120	60	6	3	26,7	14,5	87,1
29	120	60	6	3	26,8	13,2	89,7
30	120	60	6	3	25,3	14,7	88,1

Fonte: próprio autor.

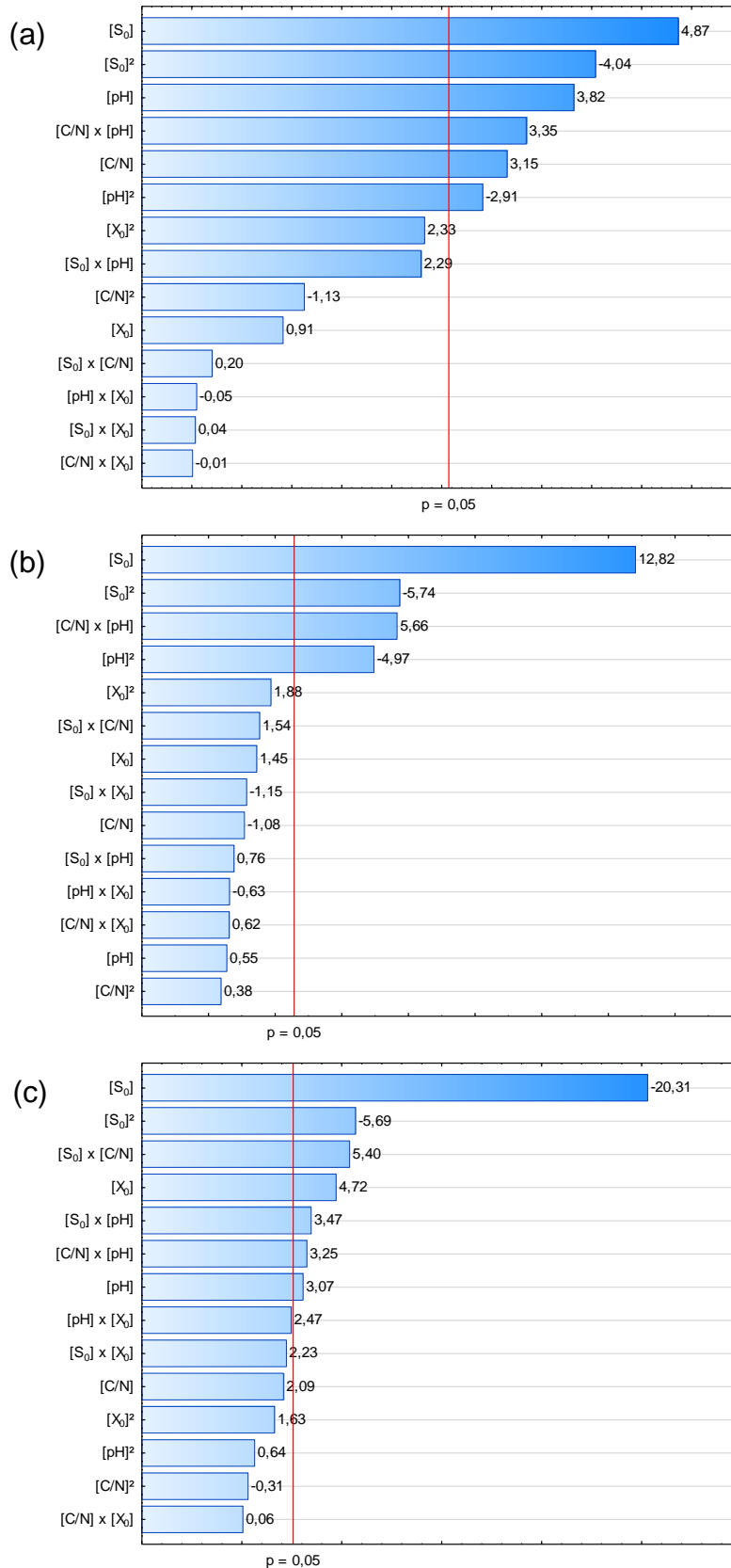
Para melhor avaliar a influência dos efeitos das variáveis concentração inicial de glicerol (S_0), razão C/N, pH inicial e a concentração de inóculo (X_0) sobre as respostas concentração celular, acúmulo de lipídeos e consumo de glicerol, foram utilizadas ferramentas estatísticas como a análise de variância (ANOVA) e o método de superfície de resposta.

Na Figura 5.1 é mostrado o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados, das variáveis independentes avaliadas no planejamento experimental sobre a resposta acúmulo de lipídeos (Figura 5.1a), concentração celular (Figura 5.1b) e consumo de glicerol (Figura 5.1c). Para se dizer que o efeito de uma variável foi significativo, o valor $t_{calculado}$ (representado pelas barras azuis no gráfico de Pareto) de seu efeito deve ser maior do que o valor de $t_{tabelado}$ (representado pela linha vermelha a $p = 0,05$ no gráfico de Pareto), para a distribuição de *Student*, num intervalo de 95% de confiança.

Na análise do gráfico de Pareto, verificou-se que para a resposta acúmulo de lipídeos (Figura 5.1a), dentro do intervalo estudado, foram significativos os efeitos linear e quadrático da concentração inicial de substrato (S_0) e do pH, o efeito linear da razão C/N e o efeito da interação entre pH e razão C/N. Para a resposta concentração de células (Figura 5.1b) foi verificado que os efeitos linear e quadrático da concentração inicial de glicerol (S_0), o efeito quadrático do pH e o efeito da interação entre pH e razão C/N foram significativos. E para a resposta consumo de glicerol (Figura 5.1c) foi verificado que os efeitos linear e quadrático da concentração inicial de glicerol (S_0), o efeito linear da concentração de inóculo (X_0), o efeito da interação entre concentração inicial de glicerol (S_0) e razão C/N.

Com as variáveis consideradas estatisticamente significativas foram propostos modelos empírico para descrever o comportamento do acúmulo de lipídeos (Equação 5.1), a concentração celular (Equação 5.2) e o consumo de glicerol (Equação 5.3) pela levedura *Rhodotorula glutinis* após 240 h de cultivo, em função dos valores reais de concentração inicial de substrato (S_0), razão carbono nitrogênio (C/N) e pH inicial do meio de cultivo.

Figura 5.1 – Gráfico de Pareto para os efeitos estimados (barra azul) das variáveis concentração de glicerol inicial (S_0), razão C/N, pH inicial e concentração de inóculo (X_0) sobre as respostas: (a) acúmulo de lipídeos, (b) concentração celular, (c) consumo de substrato, para um limite de significância estatística ao nível de 95% de confiança (linha vermelha).



Fonte: próprio autor.

$$\begin{aligned} \text{Lipídeos (g/L)} = & -125,053 + 0,230 \cdot [S_0] - 0,001 \cdot [S_0]^2 - 0,254 \cdot [C/N] + 41,779 \cdot [\text{pH}] \\ & - 3,552 \cdot [\text{pH}]^2 + 0,050 \cdot [C/N] \cdot [\text{pH}] \end{aligned} \quad (5.1)$$

$$\begin{aligned} \text{Células (g/L)} = & -159,346 + 0,316 \cdot [S_0] - 0,001 \cdot [S_0]^2 - 0,462 \cdot [C/N] + 59,122 \cdot [\text{pH}] \\ & - 5,278 \cdot [\text{pH}]^2 + 0,075 \cdot [C/N] \cdot [\text{pH}] \end{aligned} \quad (5.2)$$

$$\begin{aligned} \text{Consumo de glicerol (\%)} = & 136,099 - 0,121 \cdot [S_0] - 0,002 \cdot [S_0]^2 - 0,664 \cdot [C/N] \\ & - 7,459 \cdot [\text{pH}] + 2,305 \cdot [X_0] + 0,002 \cdot [S_0] \cdot [C/N] \\ & + 0,045 \cdot [S_0] \cdot [\text{pH}] + 0,084 \cdot [C/N] \cdot [\text{pH}] \end{aligned} \quad (5.3)$$

Para avaliar a qualidade dos modelos propostos para o acúmulo de lipídeos, concentração celular e consumo de glicerol foi realizada a análise de variância (ANOVA).

A análise de variância dos modelos propostos para o acúmulo de lipídeos, concentração celular e consumo de glicerol são apresentadas nas Tabela 5.2, 5.3 e 5.4, respectivamente. Nesta análise foi verificado que todos os modelos foram significativos a 95% de confiança e não apresentaram falta de ajuste significativa. Verificou-se ainda que os modelos apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,80. Desta forma, por serem estatisticamente significativos, não apresentarem falta de ajuste e diante o valor encontrado para os coeficientes de determinação, os modelos foram considerados adequados para serem representados na forma de superfície.

Tabela 5.2 – Análise de variância (ANOVA) do modelo que descreve o acúmulo de lipídeos pela levedura *R. glutinis* após 240 h de cultivo em função das variáveis concentração inicial de glicerol (S_0), razão C/N e pH inicial do meio de cultivo.

Efeito	Número de G.L.	Soma Quadrática	Média Quadrática	F	P
Modelo	6	815,250	135,875	15,960	0,000
Linear	3	272,420	90,807	10,670	0,000
S_0	1	133,750	133,752	15,710	0,001
C/N	1	56,180	56,180	6,600	0,017
pH	1	82,490	82,490	9,690	0,005
Quadrático	2	479,630	239,813	28,170	0,000
$S_0^*S_0$	1	93,790	93,794	11,020	0,003
pH*pH	1	43,450	43,448	5,100	0,034
Interações	1	63,200	63,203	7,420	0,012
C/N*pH	1	63,200	63,203	7,420	0,012
Erro	23	195,800	8,513		
Falta de Ajuste	18	167,570	9,310	1,650	0,304
Erro Puro	5	28,230	5,645		
Total	29	1011,050		R ² =	0,81

Fonte: próprio autor.

Tabela 5.3 – Análise de variância (ANOVA) do modelo que descreve a concentração celular obtida pela levedura *R. glutinis* após 240 h de cultivo em função das variáveis concentração inicial de glicerol (S_0), razão C/N e pH inicial do meio de cultivo.

Efeito	Número de G.L.	Soma Quadrática	Média Quadrática	F	P
Modelo	6	1712,650	285,442	16,650	0,000
Linear	3	739,140	246,381	14,370	0,000
S_0	1	732,590	732,594	42,730	0,000
C/N	1	5,200	5,203	0,300	0,587
pH	1	1,350	1,346	0,080	0,782
Quadrático	2	830,510	415,253	24,220	0,000
$S_0^*S_0$	1	136,230	136,228	7,950	0,010
pH*pH	1	95,940	95,945	5,600	0,027
Interações	1	143,000	143,002	8,340	0,008
C/N*pH	1	143,000	143,002	8,340	0,008
Erro	23	394,370	17,146		
Falta de Ajuste	18	372,070	20,670	4,630	0,049
Erro Puro	5	22,300	4,460		
Total	29	2107,020		R ² =	0,81

Fonte: próprio autor.

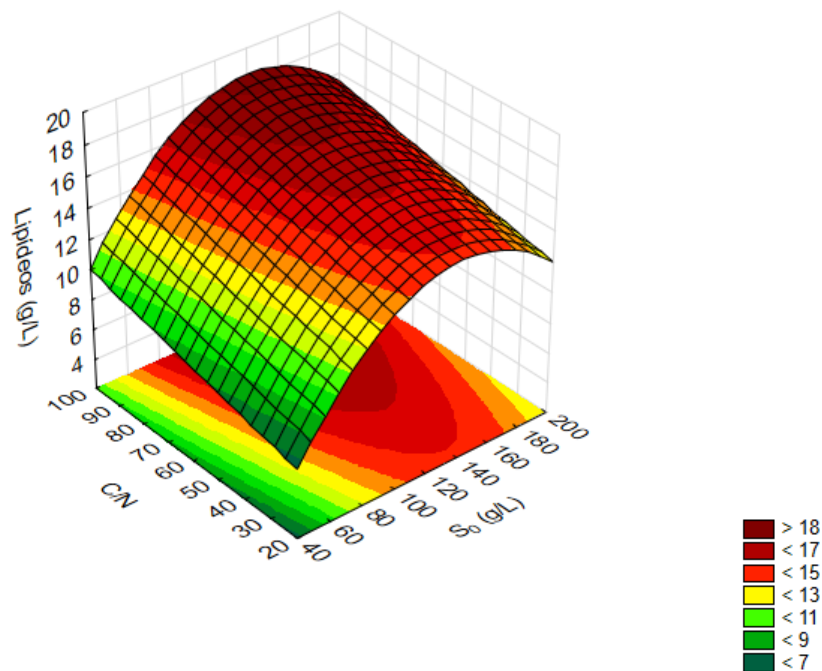
Tabela 5.4 – Análise de variância (ANOVA) do modelo que descreve o consumo de glicerol pela levedura *R. glutinis* após 240 h de cultivo em função das variáveis concentração inicial de glicerol (S_0), razão C/N, pH inicial e concentração de inóculo (X_0).

Efeito	Número de G.L.	Soma Quadrática	Média Quadrática	F	P
Modelo	8	9875,800	1234,480	21,710	0,000
Linear	4	7698,500	1924,630	33,850	0,000
S_0	1	7079,900	7079,860	124,520	0,000
C/N	1	74,700	74,660	1,310	0,265
pH	1	161,400	161,380	2,840	0,107
X_0	1	382,600	382,640	6,730	0,017
Quadrático	1	1287,800	1287,810	22,650	0,000
$S_0 * S_0$	1	1287,800	1287,810	22,650	0,000
Interações	3	889,500	296,490	5,210	0,008
$S_0 * C/N$	1	500,500	500,530	8,800	0,007
$S_0 * pH$	1	207,200	207,200	3,640	0,070
C/N * pH	1	181,700	181,730	3,200	0,088
Erro	21	1194,000	56,860		
Falta de Ajuste	16	1108,100	69,260	4,030	0,065
Erro Puro	5	85,900	17,170		
Total	29	11069,8000		R ² =	0,89

Fonte: próprio autor.

Na Figura 5.2 é apresentado o gráfico de superfície de resposta que descreve o comportamento do acúmulo de lipídeos pela levedura *R. glutinis*, após 240 h de cultivo, em função da concentração inicial de glicerol (S_0) e da razão C/N, mantendo o pH fixo em 6. Foi verificado que a concentração inicial de glicerol apresentou um comportamento quadrático, pois o acúmulo de lipídeos atinge um valor máximo quando a concentração inicial de glicerol de aproximadamente 140 g/L. Verificou-se ainda que para valores inferiores ou superiores a este, o modelo prevê uma redução no acúmulo de lipídeos. Foi verificado também que a razão C/N apresentou um comportamento linear positivo, indicando a tendência de maior acúmulo de lipídeos em maiores valores de razão C/N. Para essas condições de concentração inicial de glicerol (140 g/L), razão C/N (100) e pH de 6, o modelo prevê um acúmulo de lipídeos de aproximadamente 18 g/L.

Figura 5.2 – Gráfico de superfície de resposta para a variável acúmulo de lipídeos em função da concentração inicial de substrato (S_0) e da razão C/N, pH mantido fixo em 6.



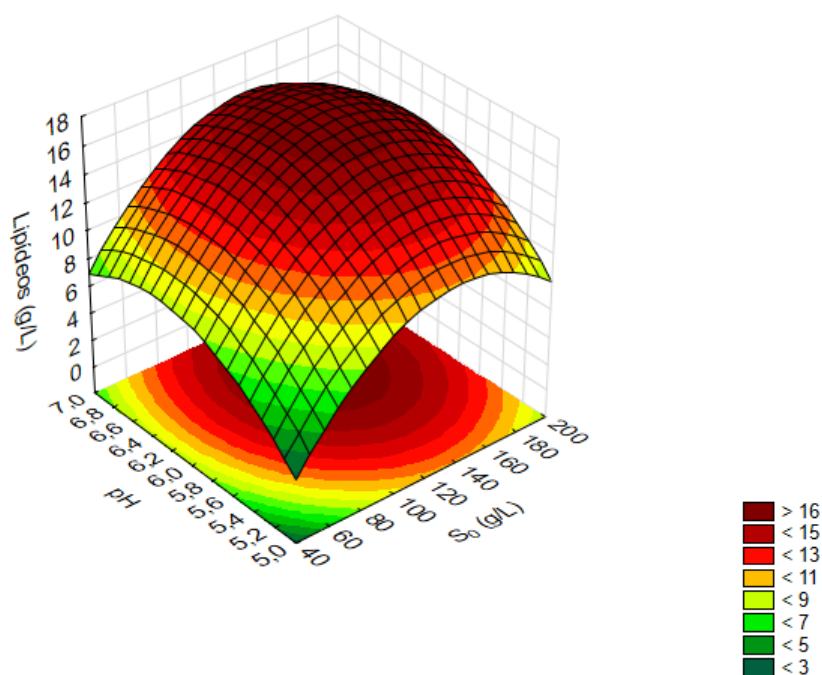
Fonte: próprio autor.

Na Figura 5.3 é apresentado o gráfico de superfície de resposta que descreve o comportamento do acúmulo de lipídeos pela levedura *R. glutinis* em função da concentração inicial de glicerol (S_0) e do pH, sendo mantido fixa a razão C/N em 60. Verifica-se na superfície de resposta um comportamento quadrático de ambas as variáveis, pH e concentração inicial de substrato. Verifica-se ainda que o modelo prevê a existência de um ponto de máximo acúmulo de lipídeos, cerca de 16 g/L, para concentração inicial de glicerol (S_0) de 140 g/L e de pH de 6,5.

Na Figura 5.4 é apresentado o gráfico de superfície de resposta que descreve o comportamento do acúmulo de lipídeos (g/L) pela levedura *R. glutinis* após 240 h de cultivo, em função das variáveis razão C/N e pH, mantendo-se a concentração inicial de glicerol (S_0) fixada em 120 g/L. Foi observado que com o pH próximo a 5, a variação da razão C/N não teve influência sobre o acúmulo de lipídeos. Nesta condição o modelo prevê um acúmulo de lipídeos de cerca de 11 g/L após 240 h de cultivo. Porém, para condições de pH próximas de 7, o aumento da razão C/N de 20 para 100, levou a um aumento de acúmulo de lipídeos de 12 para 19 g/L. Com relação a influência do pH sobre o acúmulo de lipídeos, verificou-se

que esta variável apresentou um comportamento quadrático com a presença de um ponto de máxima, ou seja, a concentração de lipídeos alcançou valores próximos a 19 g/L para cultivos realizados sob pH inicial próximos a 6,5. Verificou-se ainda que a variação do pH para valores superiores ou inferiores a estes acarretavam em um menor acúmulo de lipídeos pela levedura. Já com relação a razão C/N verificou-se um comportamento linear, que indica uma tendência de maior acúmulo de lipídeos quando seu valor tende a 100. Para essas condições o modelo prevê uma concentração de lipídeos próxima a 19 g/L.

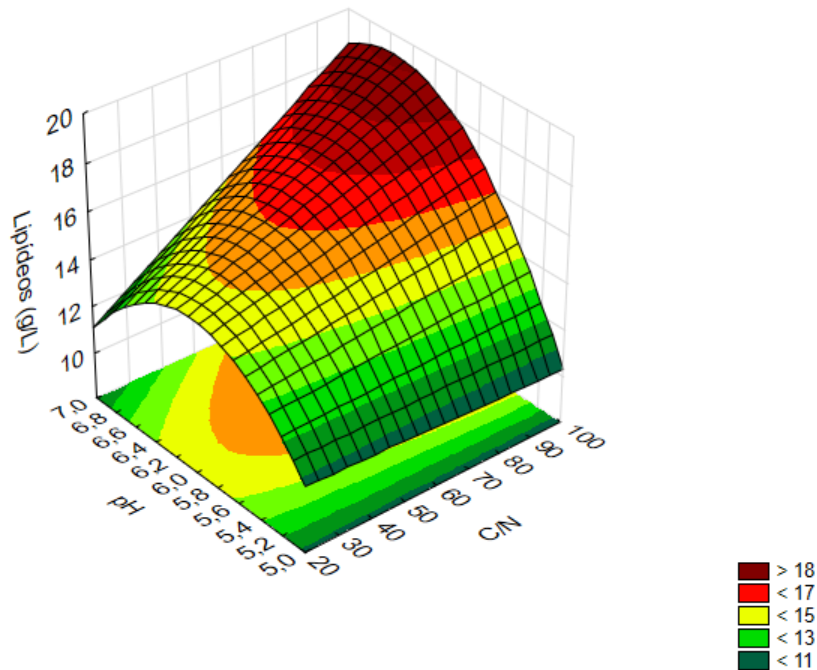
Figura 5.3 – Gráfico de superfície de resposta para a variável acúmulo de lipídeos em função do pH e da concentração inicial de glicerol (S_0), razão C/N mantida fixa em 60.



Fonte: próprio autor.

De modo geral, o modelo que descreve o acúmulo de lipídeos pela levedura mostrou que, dentro da faixa de variação estudada, o máximo acúmulo de lipídeos pela levedura (cerca de 19 g/L), pode ser alcançado para cultivos com condições de concentração inicial de glicerol (S_0) de 140 g/L, razão C/N de 100 e pH de 6,5.

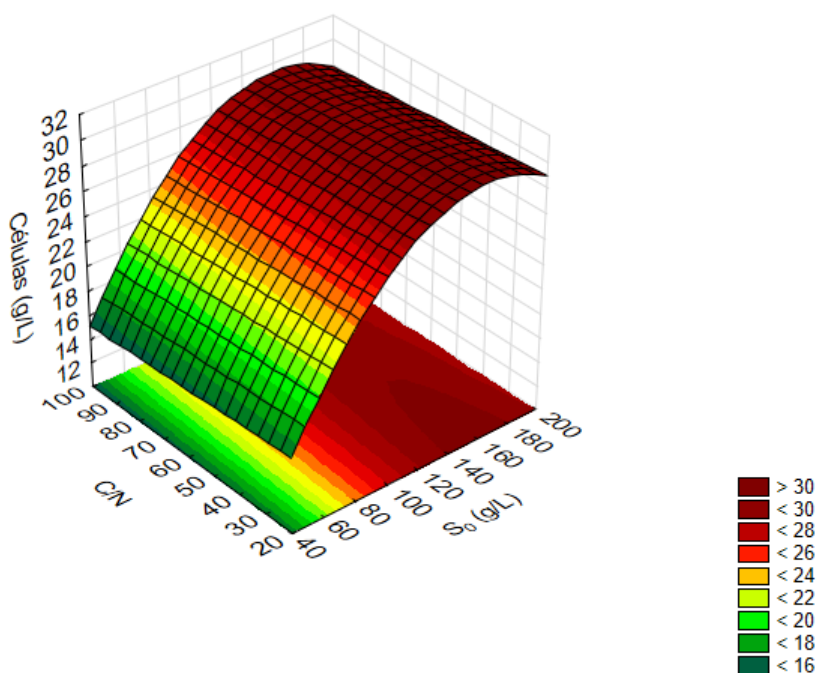
Figura 5.4 – Gráfico de superfície de resposta para a variável acúmulo de lipídeos em função do pH e da razão C/N, mantendo fixa em 120 g/L a concentração inicial de glicerol.



Fonte: próprio autor.

Na Figura 5.5 é mostrado o gráfico de superfície de resposta da variável concentração celular obtida após 240 h de cultivo em função das variáveis concentração inicial de glicerol (S_0) e razão C/N, mantendo fixo o pH em 6. Foi observado que dentro da região de estudo, a razão C/N apresentou um comportamento linear negativo, pois com o seu incremento houve redução na concentração celular, indicando, dentro do limite estudado, a maior concentração de células obtidas em um valor de C/N de 20. Quanto ao comportamento da concentração inicial de glicerol (S_0), foi observado um comportamento quadrático. Com o aumento da concentração inicial de glicerol (S_0) de 40 para 140 g/L o modelo prevê um aumento na concentração celular de cerca de 12 para 28 g/L após 240 h de cultivo, com o aumento da concentração de glicerol para valores maiores que 160 g/L o modelo prevê uma redução na concentração celular ao fim das 240 h de cultivo.

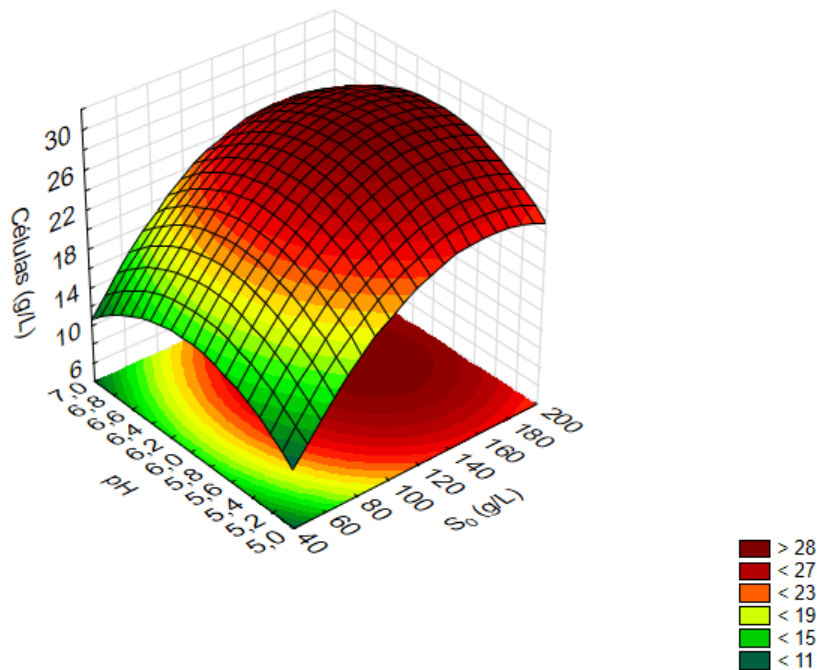
Figura 5.5 – Gráfico de superfície de resposta para a variável concentração celular em função da concentração inicial de glicerol (S_0) e da razão C/N, com pH mantido em 6.



Fonte: próprio autor.

Na Figura 5.6 é mostrado o gráfico de superfície de resposta da variável concentração celular em função da concentração inicial de glicerol (S_0) e do pH, mantendo fixo a razão C/N em 60. Verifica-se neste gráfico que a influência da concentração inicial de glicerol (S_0) e do pH inicial sobre a resposta concentração de células obtidas em 240 h de cultivo, que ambas apresentaram um comportamento quadrático. A máxima concentração celular observada foi prevista pelo modelo para uma concentração inicial de glicerol (S_0) de aproximadamente 160 g/L e um pH de 6,0. Para valores superiores ou inferiores a estes, verificou-se que há uma redução na concentração celular obtida.

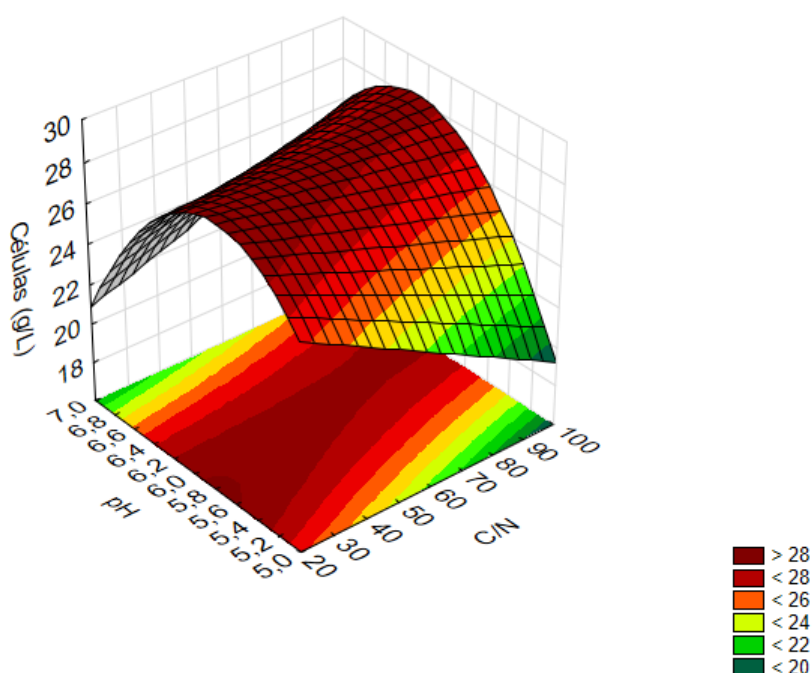
Figura 5.6 – Gráfico de superfície de resposta para a variável concentração celular em função do pH e da concentração inicial de glicerol (S_0), mantendo razão C/N fixa em 60.



Fonte: próprio autor.

Na Figura 5.7 é observado o gráfico de superfície de resposta para a variável concentração celular em função da razão C/N e do pH, mantendo fixa a concentração inicial de glicerol (S_0) em 120 g/L. Foi verificado que a variável razão C/N apresenta comportamento linear dentro da faixa de estudo, já a variável pH apresenta um comportamento quadrático, apresentando valores de máxima concentração celular em um pH em torno de 5,8 em razão C/N de 20, já para uma razão de C/N de 100 o ponto de máxima concentração celular é observada em valores de pH próximos à 6,2. Tal comportamento demonstra a influência da interação que existe entre as variáveis pH e razão C/N, pois é observado comportamentos distintos da razão C/N, em diferentes faixas de pH, sobre a concentração de células obtidas após 240 h de cultivo, ou seja, para valores de pH em torno de 6,0, observa-se que o incremento da razão C/N desfavorece a concentração celular obtida, já para pH em torno de 7,0 o incremento da razão C/N favorece a concentração celular obtida.

Figura 5.7 – Gráfico de superfície de resposta para a variável concentração celular em função do pH e da razão C/N, mantendo a concentração inicial de glicerol em 120 g/L.



Fonte: próprio autor.

Como pode ser observado nesta etapa do estudo, a razão C/N afeta de forma significativa tanto concentração celular quanto a produção de lipídeos obtidos pela levedura, pois quanto maior a razão C/N menor é a quantidade de nitrogênio presente no meio de cultivo. E condições de baixa concentração de nitrogênio favorecem, até certo ponto, a produção de lipídeos, pois quando há o esgotamento da fonte de nitrogênio no meio de cultura, o microrganismo continua assimilando o carbono disponível (glicerol presente no meio) para a produção de lipídeos através da lipogênese (BEOPOULOS; CHARDOT; NICAUD, 2009).

Braunwald et al. (2013) estudaram o efeito de diferentes razões de C/N na produção de lipídeos pela levedura *R. glutinis*. Os autores observaram que quando houve o aumento da razão C/N de 20 para 70 através do aumento da concentração de glicose, a produção de lipídeos aumentou de 0,2 para 0,5 g/L em cerca de 216 h de cultivo. Os autores reportaram ainda que não houve um aumento na produção de lipídeos quando se aumentou a razão C/N de 70 para 100. As concentrações de lipídeos reportadas por Braunwald et al. (2013), foram inferiores as obtidas no presente estudo. Tal fato pode ser explicado pela menor concentração de fonte de carbono utilizada pelos autores em seu estudo, que variou de 16,2 a 97,4 g/L.

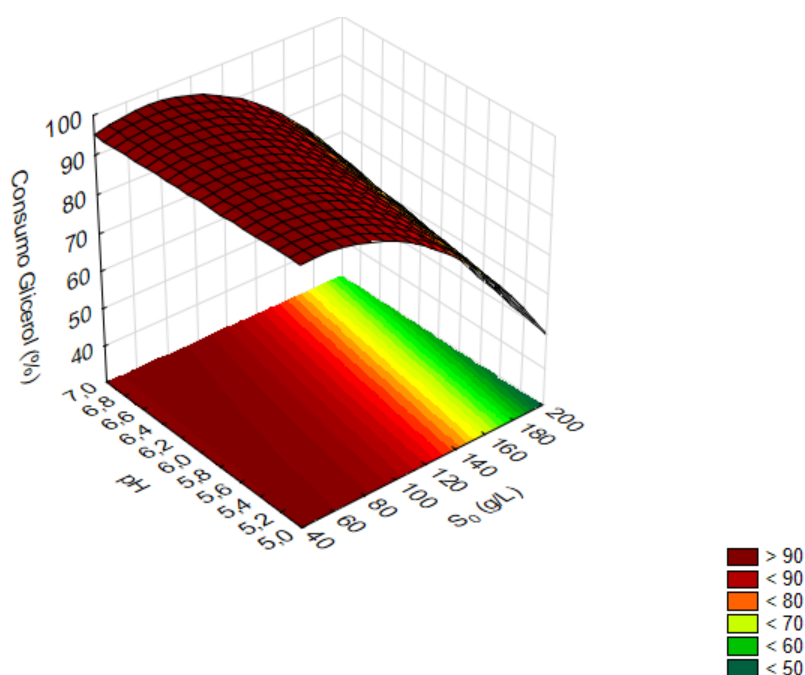
A concentração inicial de substrato no meio também apresenta um papel fundamental no processo, pois elevadas concentrações do substrato no meio podem causar inibição do crescimento celular e no acúmulo de lipídeos. No presente estudo foi observado um maior acúmulo de lipídeos em torno de 140 g/L de glicerol, valor próximo ao encontrado na literatura, por exemplo em Zhang et al. (2011). Os autores reportaram que quando houve um aumento na concentração inicial de glicose de 10 para 60 g/L, foi observado um aumento na concentração celular de 5 para 18 g/L e um aumento no teor de lipídeos de 0,05 para 1,62 g/L obtidos pela levedura *C. curvatus* em 120 h de cultivo. Porém quando a concentração inicial de glicose passou para 120 g/L houve uma pequena redução no acúmulo de lipídeo e na concentração celular, em 150 g/L de glicose houve uma grande redução em ambos concentração celular e acúmulo de lipídeos, e praticamente quando chegou a 300 g/L de glicose ambos os processos foram inibidos.

Semelhante ao presente estudo, onde a melhor faixa de pH, tanto para a concentração celular, quanto para o acúmulo de lipídeos, ficou entre 6 e 7, foi observado por Bento (2017) que a concentração celular, o acúmulo de lipídeos o consumo de glicerol, pela levedura *R. glutinis*, em pH entre 6 e 7 foram superiores aos observados para cultivos realizados em pH de 3, 4 e 5. Nessas condições de pH (entre 6 e 7) o autor reporta uma concentração celular de cerca de 27 g/L, concentração de lipídeos de 7,7 g/L. Valores inferiores comparados aos obtidos neste trabalho na condição de maior acúmulo de lipídeos (Experimento 22), tal fato pode ser explicado pois há uma maior concentração de glicerol utilizada no presente trabalho (200 g/L) comparado ao trabalho de Bento (2017) (70 g/L).

Com relação ao modelo que descreve o consumo de glicerol em função da concentração inicial de glicerol (S_0), pH, da concentração de inóculo e razão C/N, verificou-se que a variável concentração de inóculo (X_0) não apresentou nenhum efeito de interação com as demais variáveis. Verificou-se ainda que o aumento da concentração de inóculo de 1 para 5 g/L leva a um aumento do consumo de substrato em cerca de 9 %. Como a concentração inóculo não apresentou efeito significativo sobre a concentração celular e acúmulo de lipídeos obtidos, optou-se por mantê-la fixa em seu ponto central para a análise da influência das demais variáveis sobre a resposta consumo de substrato, desenvolvida a seguir.

Na Figura 5.8 é apresentada a superfície de resposta para a variável consumo de glicerol em função das variáveis concentração inicial de glicerol (S_0) e pH. Verificou-se que a variável concentração inicial de glicerol (S_0) apresentou um comportamento quadrático, porém o máximo consumo de glicerol (cerca de 95%) foi alcançado no limite da região de variação observada, ou seja, para uma concentração inicial de glicerol em torno de 40 g/L. Já a variável pH apresentou um comportamento linear que varia de acordo com a concentração inicial de substrato (S_0), pois em torno da região de S_0 igual a 200 g/L, observa-se que o incremento do pH acarreta em um incremento do consumo de glicerol de 50% para aproximadamente 60%, ou seja um comportamento linear positivo, já na região de S_0 igual a 40 g/L, o oposto é observado, ou seja, um comportamento linear negativo, pois com o incremento do pH ocorre uma leve redução no consumo de glicerol. Tal fato se deve pela interação que ocorre entre as variáveis S_0 e pH.

Figura 5.8 - Gráfico de superfície de resposta para a variável consumo de glicerol em função do pH e da concentração inicial de glicerol (S_0), mantendo a concentração razão C/N em 60 e concentração de inóculo (X_0) igual a 3 g/L.

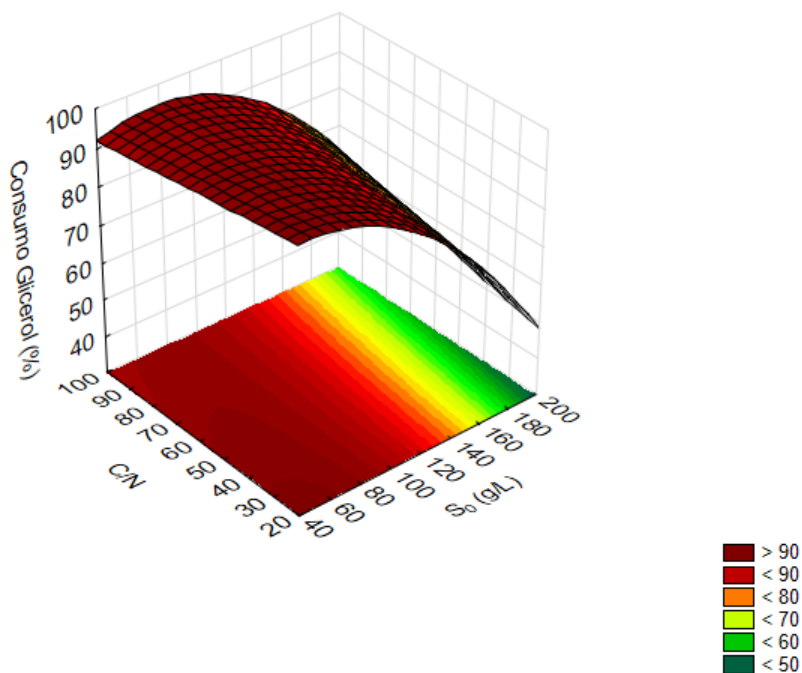


Fonte: próprio autor.

Na Figura 5.9 é apresentado o gráfico de superfície de resposta para a variável consumo de glicerol em função da razão C/N e da concentração inicial de glicerol (S_0), mantendo fixo a concentração inicial de inóculo em 3 g/L e o pH em 6.

Foi verificado que o aumento da razão C/N apresentou uma influência linear positivo quando a concentração inicial de glicerol (S_0) foi mantida próxima a 200 g/L, ou seja, o aumento da razão C/N de 20 para 100 levou a um aumento no consumo de substrato de 49 para 63%. Por outro lado, quando a concentração inicial de glicerol (S_0) foi próxima de 40 g/L, o aumento da razão C/N teve uma influência linear negativa sobre o consumo de glicerol, uma vez que o aumento da razão C/N de 20 para 100 levou a uma redução do consumo de 100 para 92%. Tal fato evidencia a interação que existe entre essas variáveis. Já a variável concentração inicial de glicerol (S_0) apresenta um comportamento quadrático, atingindo maior consumo de glicerol numa concentração inicial de substrato em torno de 40 g/L. Nessas condições é previsto um consumo completo de glicerol.

Figura 5.9 – Gráfico de superfície de resposta para a variável consumo de glicerol em função da razão C/N e da concentração inicial de glicerol (S_0), mantendo fixo o pH em 6 e concentração de inóculo (X_0) em 3 g/L.

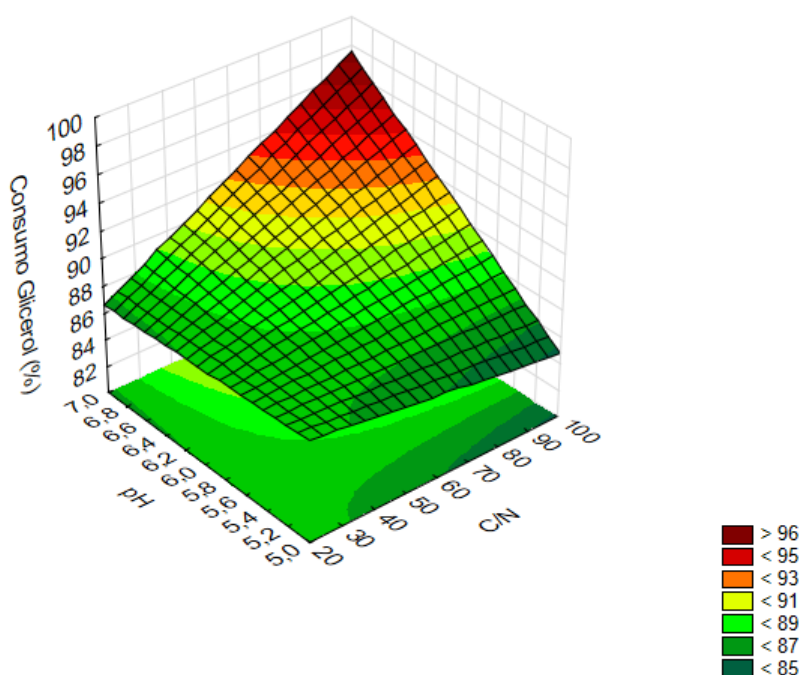


Fonte: próprio autor.

Já na Figura 5.10 é apresentada a superfície de resposta que descreve o consumo de glicerol em função da razão C/N e do pH, com os valores de concentração inicial de substrato (S_0) e concentração de inóculo (X_0) fixas em 120

e 3 g/L, respectivamente. Nestas condições foi verificado que a razão C/N apresenta comportamento linear positivo, quando o pH foi fixado em torno de 7, e que quando o pH foi mantido em torno de 5, a variação da razão C/N teve pouca influência sobre o consumo de glicerol. Com relação a Influência do pH sobre o consumo de substrato, foi observado o comportamento linear positivo para razões de C/N em torno de 100, e para razões C/N em torno de 20, o pH não afeta de forma significativa o consumo de glicerol, o qual se manteve aproximado a 86%. A condição de maior consumo de glicerol apontada pelo gráfico é de razão C/N de 100 e pH de 7, onde o modelo prevê um consumo de aproximadamente 99%.

Figura 5.10 - Gráfico de superfície de resposta para a variável consumo de glicerol em função da razão C/N e do pH, mantendo fixo a concentração inicial de substrato (S_0) em 120 g/L e concentração de inóculo (X_0) em 3 g/L.



Fonte: próprio autor.

Utilizando ferramentas de otimização, podemos chegar a uma condição prevista de maior consumo de substrato, na qual o modelo prevê um consumo de 100% de glicerol para cultivos realizados com concentração inicial de substrato (S_0) igual a 78 g/L, uma razão C/N de 56, um pH de 6,8 e uma concentração de inóculo de 4,6 g/L. Entretanto, em tais condições o modelo prevê que ao final do cultivo a

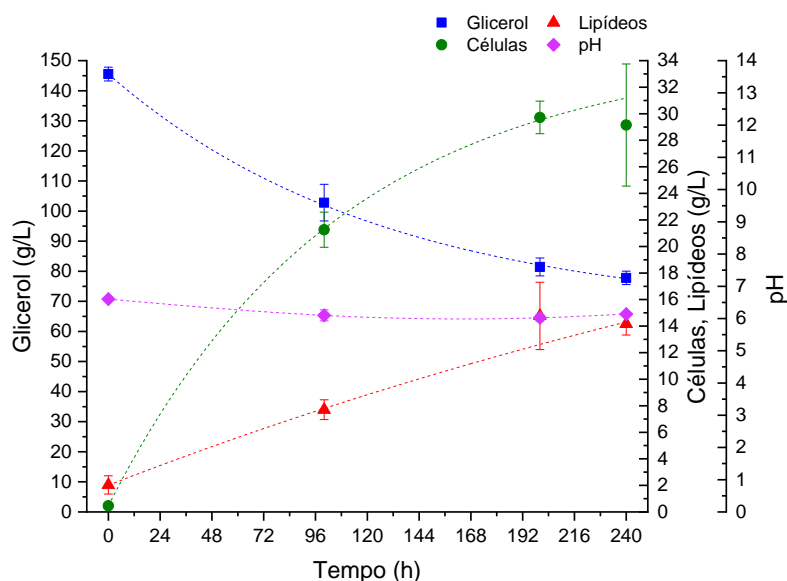
levedura alcance uma concentração celular de 20 g/L e um acúmulo de lipídeos de 11 g/L, condições estas que não são interessantes para o processo.

Considerando a otimização do modelo, tendo como principal critério de desejabilidade a maximização do acúmulo de lipídeos pela levedura, foi realizado um novo estudo de otimização no qual se determinou que, dentro da região estudada, o objetivo pode ser satisfeito com a seguinte condição experimental: concentração inicial de substrato (S_0) igual a 140 g/L, razão C/N de 100, pH de 6,5, e concentração de inóculo (X_0) de 1 g/L. Desta forma, tal condição foi escolhida para ser utilizada nas próximas etapas. Com relação a concentração de inóculo (X_0), como esta variável não apresentou efeito sobre o acúmulo de lipídeos e sobre a concentração celular, ela foi mantida em 1 g/L, referente ao nível (-1) do planejamento.

Buscando validar o modelo resultante do planejamento experimental, foram realizados cultivos nas condições de maior acúmulo de lipídeos previsto pelo modelo ($S_0 = 140$ g/L, razão C/N = 100, pH = 6,5 e $X_0 = 1$ g/L). Na Figura 5.11 são apresentados os resultados obtidos no ensaio de validação do modelo. Verificou-se neste ensaio que as maiores concentrações de células e lipídeos foram obtidas em 200 h de cultivo (cerca de 29,7 e 14,8 g/L, respectivamente) não havendo variação significativa nestas concentrações até o tempo final de cultivo observado, de 240 h, neste tempo também foi observado um consumo de glicerol de apenas 64 g/L (cerca de 44%). Ao longo do cultivo o pH não variou de forma significativa, permanecendo próximo a pH 6.

Pelo modelo proposto para essas condições são previstos uma concentração celular de 28 ± 10 g/L, e uma concentração de lipídeos de 19 ± 6 g/L, num limite de confiabilidade de 95%. Como foi observado a concentração de células e de lipídeos atingidas no cultivo estão dentro do intervalo aceitável.

Figura 5.11 – Concentração de glicerol, concentração celular, concentração de lipídeos e pH em função do tempo, obtido pelo experimento de confirmação realizado em frasco agitado de 250 mL a 250 rpm e mantido a 30 °C contendo 50 mL do meio de cultivo.



Fonte: próprio autor.

Foi observado para o cultivo de confirmação um fator de rendimento de substrato em células ($Y_{X/S}$) de aproximadamente 0,46 e um fator de rendimento de substrato em lipídeo ($Y_{L/S}$) de aproximadamente 0,20 e uma produtividade volumétrica em lipídeos de 1,8 g/L.dia.

Em estudos realizados por Kot et al. (2017), utilizando a levedura *Rhodotorula glutinis* para a produção de lipídeos, foi obtida uma concentração de cerca de 19,4 g/L de células e de cerca de 12,7 g/L de lipídeos em 72 h de cultivo, o que corresponde a uma produtividade volumétrica em lipídeos de 4,2 g/L.dia. O meio empregado pelo autor é composto de glicerol 5% (m/v) e água residual do processo de produção de amido da batata. Este meio foi analisado e sua composição foi determinada com concentração de 0,543 mol/L de glicerol, 0,076 mol/L de açúcares redutores e 0,147 mol/L de nitrogênio numa razão C/N de 4,6. Apesar da produtividade reportada no estudo de Kot et al. (2017) ser o dobro a encontrada no presente trabalho, sua concentração final de lipídeos (12,7 g/L), foi inferior ao acúmulo observado para o ensaio de confirmação do planejamento (14,8 g/L). Saenge et al. (2011) também utilizaram a levedura *Rhodotorula glutinis* para a produção de lipídeos através de glicerol proveniente da produção de biodiesel. Partindo de uma concentração inicial de glicerol de aproximadamente

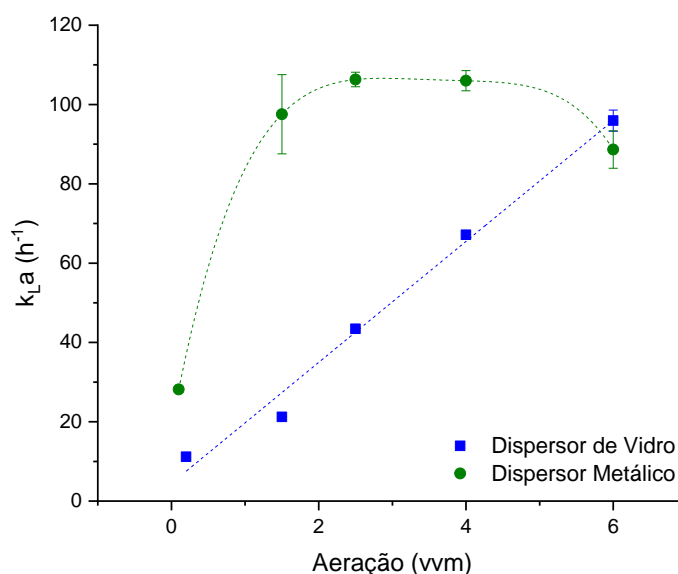
95 g/L conseguiram uma concentração celular de aproximadamente 6 g/L e uma concentração de lipídeos cerca de 3 g/L em 72 h de cultivo. O que equivale a uma produtividade volumétrica em lipídeos de aproximadamente 1,0 g/L.dia. Valor este muito semelhante ao encontrado no presente trabalho.

5.2 Variação de escala em Biorreatores de bancada

5.2.1 Caracterização dos Biorreatores

Na etapa de variação de escala do processo de produção de óleo microbiano por *R. glutinis*, teve como intuito inicial a utilização de biorreatores de agitação pneumática dos tipos coluna de bolhas e *airlift*, para dois diferentes tamanhos (volume útil de 500 mL e 1800 mL), sob diferentes condições de aeração, ou seja, uma variação ampla do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). Os ensaios foram iniciados com os reatores colunas de bolhas de 500 mL, nos quais foram realizadas determinações do k_{La} sob diferentes vazões de ar, e com dois tipos de dispersores porosos, um de vidro e outro metálico, ambos sinterizados. Estes resultados são apresentados na Figura 5.12. Foi observado neste estudo que, na faixa de aeração avaliada, houve uma correlação linear e positiva entre o k_{La} e a vazão de ar empregada, utilizando o dispersor de vidro. Nestes ensaios a aeração foi variada de 0,1 a 6,0 vvm, o que resultou em valores de k_{La} de 10 h^{-1} a 100 h^{-1} , respectivamente, com variação linear nesta região, e com um coeficiente de determinação (R^2) de 96% para o ajuste dos dados a um modelo. Já para o dispersor de metal sinterizado, houve uma grande variação do k_{La} de 0,1 até 1,5 vvm, entre 30 e 105 h^{-1} , respectivamente. Para vazões de ar superiores a 1,5 vvm o valor do k_{La} praticamente se manteve constante, em cerca de 105 h^{-1} .

Figura 5.12 – Coeficiente de transferência volumétrica de oxigênio (k_{La}) em função da aeração para os reatores do tipo coluna de bolhas com volume útil de 0,5 L.



Fonte: próprio autor.

Após a determinação da relação entre a aeração e o k_{La} foram escolhidas cinco condições de aeração (0,1; 1,5; 2,5; 4,0 e 6,0 vvm), de modo a proporcionar valores de k_{La} entre $10 h^{-1}$ e $100 h^{-1}$. Entretanto, com o início dos cultivos da levedura em biorreator foram encontradas dificuldades, que impossibilitaram operar o processo na ampla faixa de k_{La} desejada inicialmente. Nos cultivos, com exceção apenas do realizado com 0,1 vvm, ocorreu uma intensa formação de espuma. A qual apresentou uma característica bastante persistente, não sendo contornada nem mesmo com o uso de antiespumante. Devido a impossibilidade de desenvolver os cultivos com maiores aerações, optou-se por dar continuidade nos ensaios em biorreatores operando apenas na condição de menor aeração avaliada (0,1 vvm), uma vez que esta foi a única condição em que não houve intercorrências devido a formação de espuma. Optou-se também por utilizar o dispersor metálico, pois este proporcionou um maior k_{La} ao meio de cultivo.

Previamente a etapa de cultivo em biorreatores, e uma vez tendo definido a condição de aeração a ser utilizada e o tipo de dispersor, foram realizadas as determinações do Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), Tempo de mistura, Velocidade Superficial do Gás (U_{GS}) e Retenção Gasosa (ϵ_G), para os reatores *airlift* e coluna de bolhas de 500 e 1800 mL, a fim de compreender melhor o comportamento dos biorreatores sob tais condições operacionais.

Na Tabela 5.5 são apresentados os valores de Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), Tempo de mistura, Velocidade Superficial do Gás (U_{GS}) e Retenção Gasosa (ϵ_G), para os biorreatores operados a 0,1 vvm de aeração. De modo geral, todos os biorreatores apresentaram tempo de mistura próximos (entre 15 e 20 s). Quanto ao coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, para a condição de operação avaliada, foram encontrados valores entre 21 e 30 h^{-1} . O valor de k_{La} para os biorreatores foi inferior ao estimado para os cultivos em frascos (49 h^{-1}), o que pode ser uma desvantagem para o processo, uma vez que a produção de lipídeos por leveduras é um processo aeróbio, sendo favorecido por maiores níveis de aeração (BENTO, 2017). A relação entre ficou entre 4 e 6, valor está dentro do intervalo descrito na literatura (KANTARCI; BORAK; ULGEN, 2005). Nessa faixa de velocidade superficial de gás e do diâmetro interno, conforme visto na Figura 2.4, o fluxo dos reatores encontra-se no regime de bolhas homogêneo.

Tabela 5.5 – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), tempo de mistura, velocidade superficial do gás, retenção gasosa e relação entre altura e diâmetro interno obtidos para os biorreatores do tipo coluna de bolhas e airlift com volumes uteis de 0,5 L e 1,8 L.

Propriedades	Airlift		Coluna de Bolhas	
	0,5 L	1,8 L	0,5 L	1,8 L
Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio - k_{La} (h^{-1})	28,9 ± 0,2	21,4 ± 0,8	28,6 ± 0,3	29,8 ± 0,5
Tempo de mistura (s)	15 ± 3	19 ± 3	20 ± 2	18 ± 3
Velocidade Superficial do Gás - U_{GS} (cm/s)	0,14	0,19	0,04	0,06
Retenção Gasosa - ϵ_G (%)	18,3	6,8	19,7	6,8
Relação entre altura e diâmetro interno (L/D)	5,0	4,7	5,0	4,7

Fonte: próprio autor.

Em estudo realizado por McClure et al. (2016), foi investigado o efeito do tipo do dispersor de ar sobre o tempo de mistura de reator de agitação pneumática do tipo coluna de bolhas. Os autores relatam que a mudança do tamanho do orifício do dispersor (de 0,5 para 3 mm) não afetou de forma significativa o tempo de mistura, mesmo fazendo-se a adição do traçador em locais diferentes do reator (200, 350 e 850 mm acima da base do reator) ou sob diferentes vazões de aeração (entre 1 e 5 vvm). Porém quando foi adotado um dispersor com orifícios distribuídos de forma assimétrica, os autores reportam que houve uma redução do tempo de

mistura do reator, principalmente na região abaixo do dispersor (a qual geralmente é a região onde há menor mistura). De modo geral, os autores reportaram tempos de mistura entre 3 e 25 s. Comparando os resultados reportados por McClure et al. (2016), aos obtidos no presente trabalho, verifica-se que os valores de tempo de mistura observados estão dentro da faixa relatada pelos autores, porém mais próximas dos maiores tempos de mistura. O elevado tempo de mistura encontrado no presente estudo podem ser atribuídos as baixas vazões de ar empregada no processo (0,1 vvm), as quais eram no mínimo dez vezes menor que os utilizados por McClure et al. (2016).

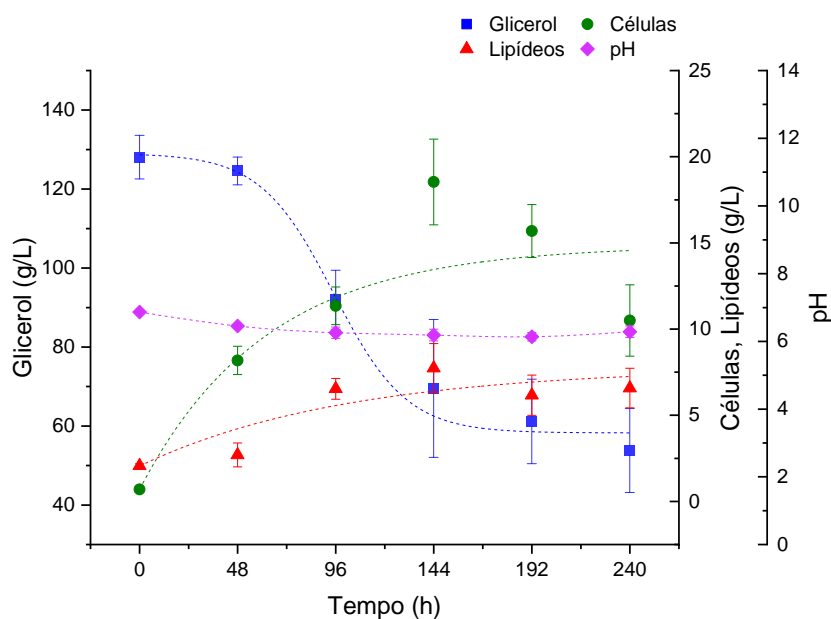
5.2.2 Obtenção de óleo microbiano em Biorreatores

Nesta etapa do trabalho foi realizado o estudo do cultivo da levedura em biorreatores de agitação pneumática, *airlift* e coluna de bolhas em diferentes escalas (0,5 e 1,8 L).

As condições de cultivo utilizadas nesta etapa foi a otimizada na etapa anterior deste estudo, onde a concentração inicial de substrato é de 140 g/L, a razão C/N de 100, pH de 6,5 e o inóculo de 1 g/L de células. Em todos os cultivos foi utilizada uma aeração de 0,1 vvm.

Na Figura 5.13 são apresentados os resultados obtidos no cultivo realizado no reator coluna de bolhas de 0,5 L. Neste cultivo verificou-se que a concentração celular e o acúmulo de lipídeos foram mais acentuados nas primeiras 96 horas de cultivo e que a partir de 144 h de cultivo houve estagnação na concentração celular, acúmulo de lipídeos e consumo de glicerol. O pH manteve-se praticamente constante ao longo do cultivo, mantendo seu valor próximo a 6. Neste cultivo foram obtidos uma concentração máxima de células (cerca de 18,5 g/L) e lipídeos (cerca de 7,7 g/L) e um consumo glicerol de aproximadamente 59 g/L em 144 h de cultivo.

Figura 5.13 – Concentração de glicerol, concentração celular, concentração de lipídeos e pH em função do tempo, obtido pelo experimento realizado em biorreator do tipo coluna de bolhas com um volume útil de 0,5 L com aeração de 0,1 vvm e temperatura de 30 °C.

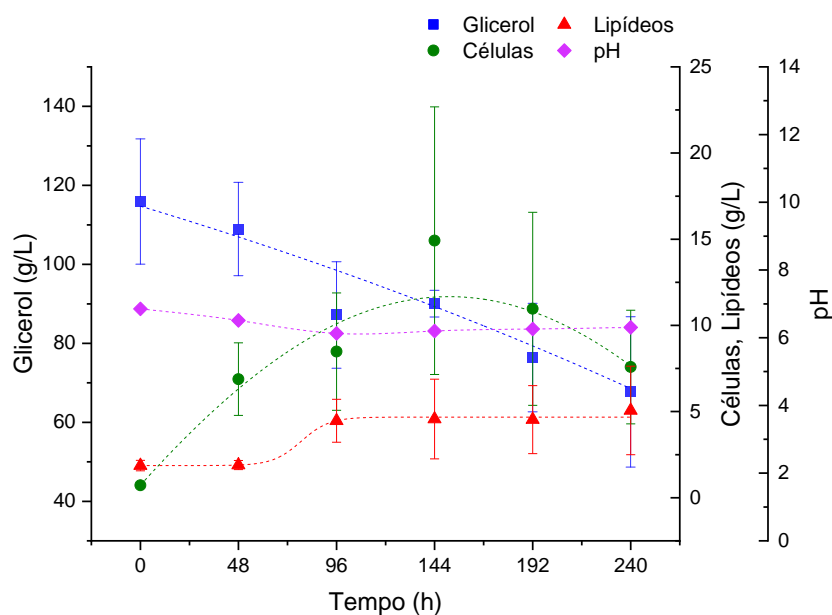


Fonte: próprio autor.

Os resultados obtidos no cultivo realizado no reator *airlift* de 0,5 L são apresentados na Figura 5.14. Semelhante ao observado para o reator coluna de bolhas, no reator *airlift* o aumento da concentração celular e do acúmulo de lipídeos foi mais acentuado durante as primeiras 96 horas de cultivo. Verificou-se ainda que após 144 h houve estagnação do crescimento celular e do acúmulo de lipídeos, mesmo havendo um consumo de glicerol constante ao longo das 240 h de cultivo. Ao fim deste período a levedura consumiu cerca de 51 g/L de glicerol. O pH também se manteve constante em torno de 6, semelhante ao ocorrido no reator coluna de bolhas. O ponto máximo de acúmulo de lipídeos e da concentração celular obtida foram obtidos cerca de 14,9 g/L de células e cerca de 4,6 g/L de lipídeos, não havendo um aumento significativo após as 144 h. Durante os cultivos realizados no reator *airlift* foi observado um acúmulo de células no fundo do reator, o que indica a existência de uma zona morta de mistura. A deficiência na mistura do reator pode ter se originado devido à baixa vazão de aeração empregada para o tipo de reator, a qual pode não ter sido suficiente manter adequadamente as células em suspensão. É importante ressaltar que nos reatores coluna de bolhas, mesmo com a baixa vazão de aeração empregada, as células permaneceram em condição de homogeneidade durante todo o período de cultivo.

Comparando os biorreatores coluna de bolhas e *airlift* de 500 mL, verificou-se que o primeiro permitiu alcançar maiores concentrações de células e lipídeos ao fim do cultivo. Tal comportamento pode ter ocorrido devido pela capacidade do reator coluna de bolhas se manter homogêneo, mesmo sob baixa vazão de aeração.

Figura 5.14 – Concentração de glicerol, concentração celular, concentração de lipídeos e pH em função do tempo, obtido pelo experimento realizado em biorreator do tipo *airlift* com um volume útil de 0,5 L com aeração de 0,1 vvm e temperatura de 30 °C.



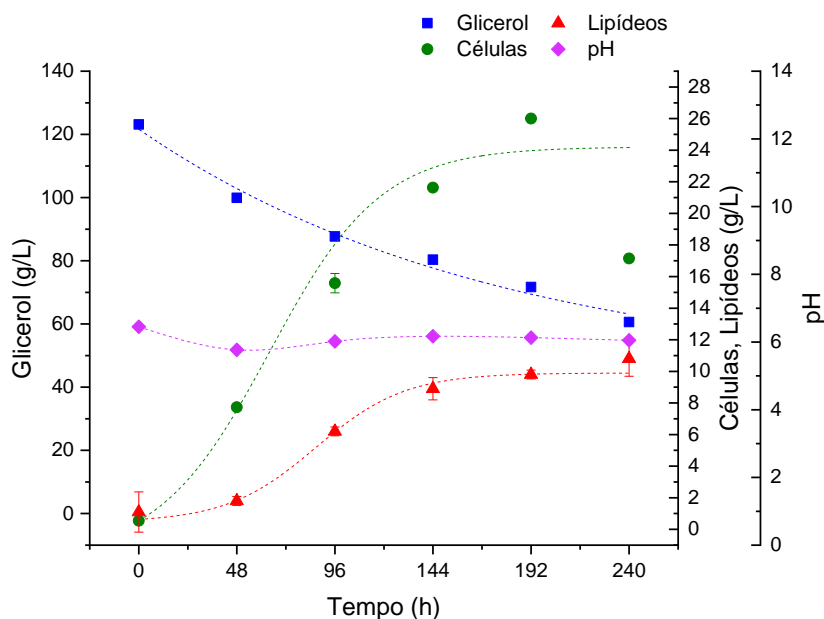
Fonte: próprio autor.

Os resultados obtidos no cultivo em biorreatores de 1,8 L, do tipo coluna de bolhas são apresentados na Figura 5.15. Como pode ser observado, houve um crescimento celular e acúmulo de lipídeos mais acentuado nas primeiras 144 horas de cultivo, havendo um discreto aumento destas concentrações entre 144 e 192 horas. Desta forma, as concentrações máximas de células (cerca de 26,0 g/L) e de lipídeos (cerca de 9,8 g/L) foram obtidos em 192 h. Verificou-se ainda que o pH se manteve constante em torno de 6, e que o consumo de glicerol se manteve constante ao longo do cultivo chegando a consumir cerca de 60 g/L ao final do das 240 h.

Comparando o comportamento observado nos reatores coluna de bolhas de 500 e 1800 mL, verificasse que este último apresentou uma concentração celular

41% superior à observada no reator de menor volume, e um acúmulo de lipídeos 27% superior. Mesmo em condições de aeração e $k_L a$ bastante semelhantes, a ocorrência maior produção de células e lipídeos no reator de maior volume pode indicar a ocorrência de condições de cultivo distintas entre os reatores, porém não percebidas os parâmetros analisados no presente estudo.

Figura 5.15 – Concentração de glicerol, concentração celular, concentração de lipídeos e pH em função do tempo, obtido pelo experimento realizado em biorreator do tipo coluna de bolhas com um volume útil de 1,8 L com aeração de 0,1 vvm e temperatura de 30 °C.

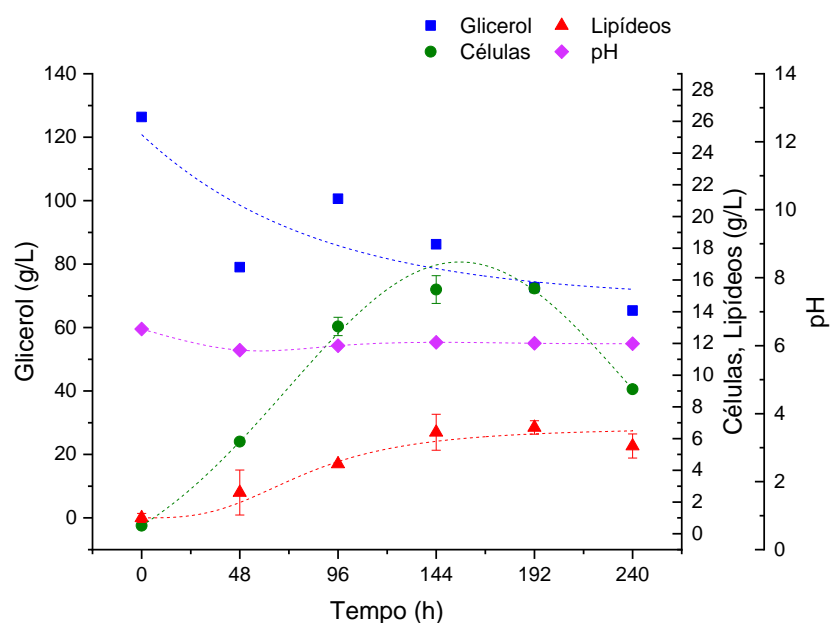


Fonte: próprio autor.

Na Figura 5.16 são apresentados os resultados dos cultivos em biorreatores do tipo *airlift* com volume útil de 1,8 L. O pH se manteve praticamente constantes ao longo de todo período acompanhado, mantendo-se próximo a pH 6. Quanto ao consumo de glicerol, verificou-se que o mesmo foi consumido durante todo o cultivo, consumindo cerca de metade do glicerol disponível, durante as 240 horas observadas. Semelhante ao observado para o reator coluna de bolhas, o crescimento celular e acúmulo de lipídeos ocorreu de forma mais acentuada durante as primeiras 144 horas de cultivo. Após este período, houve uma estagnação do acúmulo de lipídeos e um aparente declínio da concentração celular. Esta aparente redução da concentração celular pode ser explicada pela ocorrência de zonas mortas (regiões com deficiência na mistura) no reator *airlift*. Semelhante ao reportado para o reator *airlift* de 500 mL, no reator de 1800 mL também foi observado o acúmulo de células ao fundo, principalmente após 144 horas de

cultivo. Em ambos os reatores do tipo *airlift*, a deficiência na homogeneização pode estar relacionada a vazão de aeração empregada, que provavelmente estava abaixo do mínimo necessário para que este tipo de reator mantivesse a homogeneidade. O máximo acúmulo de lipídeos, cerca de 6,4 g/L, foi observado para o tempo de 144 h de cultivo, no mesmo tempo que se obteve a máxima concentração celular, cerca de 15,4 g/L de células.

Figura 5.16 – Concentração de glicerol, concentração celular, concentração de lipídeos e pH em função do tempo, obtido pelo experimento realizado em biorreator do tipo *airlift* com um volume útil de 1,8 L com aeração de 0,1 vvm e temperatura de 30 °C.



Fonte: próprio autor.

Comparando os biorreatores *airlift* e coluna de bolhas de 1,8 L, semelhante ao observado para os reatores de 0,5 L, verificou-se um maior acúmulo de lipídeos e concentração celular para o biorreator do tipo coluna de bolhas. De modo geral, comparando a eficiência de mistura dos reatores, verificou-se que os reatores do tipo coluna de bolhas mantiveram de forma adequada a homogeneidade da suspensão celular, enquanto que para os reatores *airlift*, nas condições de aeração em que foram operados, ocorreu sedimentação de parte da biomassa, havendo um certo acúmulo no fundo do biorreator. Esta diferença na eficiência de mistura dos reatores está provavelmente relacionada aos melhores resultados obtidos para os cultivos realizados nos reatores coluna de bolhas, em comparação ao *airlift*.

Na Tabela 5.6 são apresentados parâmetros fermentativos para os cultivos realizados nos biorreatores do tipo coluna de bolhas e *airlift* de 0,5 L e de 1,8 L, em comparação com os resultados obtidos em frascos agitados. Comparando os resultados mostrados na tabela, verificou-se que os dois reatores de 0,5 L (coluna de bolhas e *airlift*) apresentaram o mesmo tempo do acúmulo máximo de lipídeos de 144 h. Já os reatores de 1,8 L, apresentaram valores de tempo do acúmulo máximo de lipídeos de 144 h (*Airlift*) e 198 h (coluna de bolhas). Observa-se que todos os reatores obtiveram tempos do acúmulo máximo de lipídeos menores, se comparados com o cultivo em frasco agitado, que foi de 200 h.

Com relação ao acúmulo de lipídeos não houve diferença relevante entre os cultivos realizados nos diferentes reatores (entre 4 e 10 g/L, sendo que o maior valor foi obtido pelo reator do tipo coluna de bolhas de 1,8 L), porém todos os reatores obtiveram quantidades menores de lipídeos, quando comparados ao cultivo em frasco agitado, tal fato pode estar relacionado ao menor valor de k_{LA} observado nos reatores (30 h^{-1}) comparado ao frasco agitado (49 h^{-1}).

Foi observado que os reatores do tipo coluna de bolhas obtiveram maiores concentrações celulares, comparadas aos reatores do tipo *airlift*, tal comportamento pode ser explicado pelo fato de que os reatores do tipo coluna de bolhas apresentaram uma agitação mais eficiente, conseguindo manter as células em suspensão durante todo o período da fermentação. Verificou-se também que o cultivo em frasco agitado obteve maior concentração celular, comparado aos cultivos realizados em todos os biorreatores.

Embora o maior tempo de acúmulo tenha sido observado pelo cultivo em frasco agitado, devido ao seu maior crescimento celular e acúmulo de lipídeos, este obteve a maior produtividade volumétrica em células e em lipídeos, se comparado aos cultivos realizados nos biorreatores. Quando comparados os dois tipos de biorreatores, foi observado uma maior produtividade em células e em lipídeos nos cultivos realizados em reatores do tipo coluna de bolhas, comparados aos reatores do tipo *airlift*.

Foi observado um fator de conversão de substrato em lipídeo ($Y_{L/S}$) maior para o cultivo realizado em frasco agitado, se comparado ao cultivo nos biorreatores. Já os reatores do tipo coluna de bolhas, foi observado que o aumento da escala acarretou em um aumento do $Y_{L/S}$. O contrário foi observado para os reatores do tipo *airlift*, onde o aumento da escala acarretou na redução do $Y_{L/S}$. O

valor da conversão de substrato em lipídeo máximo teórico é de aproximadamente 0,32 g/g (BOMMARED et al., 2015). Comparando o fator de conversão alcançado nos cultivos, foi obtida uma eficiência de aproximadamente 62,5% para os cultivos em frasco agitado, 53,1% para os reatores do tipo coluna de bolhas (1,8 L) e *airlift* (0,5 L), e cerca de 40% para os reatores do tipo coluna de bolhas (0,5 L) e *airlift* (1,8 L). Com relação a velocidade específica de crescimento, em todos os cultivos foram observados valores semelhantes, entre 0,03 e 0,039 h⁻¹.

Tabela 5.6 – Concentração celular, concentração de, lipídeos, tempo de cultivo, produtividade volumétrica em células (Q_X) e produtividade volumétrica em lipídeos (Q_L), fator de rendimento de substrato em células (Y_{X/S}), fator de conversão de substrato em lipídeos (Y_{L/S}), máxima velocidade específica de crescimento (μ_{máx}) e eficiência (η) obtidos nos cultivos realizados em frasco agitado e nos biorreatores do tipo coluna de bolhas e airlift de 0,5 L e 1,8 L.

Parâmetros	Frasco Agitado (50 mL)	Coluna de Bolhas (0,5 L)	Coluna de bolhas (1,8 L)	<i>Airlift</i> (0,5 L)	<i>Airlift</i> (1,8 L)
Tempo do acúmulo máximo de lipídeos (h)	200	144	192	144	192
Concentração celular (g/L)	29,7 ± 1,2	18,5 ± 2,5	26,0 ± 0,1	14,9 ± 7,8	15,4 ± 0,9
Concentração de lipídeos (g/L)	14,8 ± 2,5	7,7 ± 1,4	9,8 ± 0,3	4,6 ± 2,3	6,4 ± 1,1
Consumo de glicerol (g/L)	64,1	58,6	51,4	25,9	40,1
Produtividade em Células (g/L.dia)	3,6	3,1	3,3	2,5	1,9
Produtividade em Lipídeos (g/L.dia)	1,8	1,3	1,2	0,8	0,8
Y _{X/S} (g/g)	0,46	0,32	0,42	0,58	0,29
Y _{L/S} (g/g)	0,20	0,13	0,17	0,17	0,12
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,038	0,034	0,039	0,030	0,037
η (%)	62,5	40,6	53,1	53,1	37,5

Fonte: próprio autor.

Yen e Liu (2014) utilizaram a levedura *R. glutinis* para produção de lipídeos a partir de glicerol. Foram realizados cultivos em biorreator do tipo tanque agitado com volume de meio de 2 L e *airlift* com volume de meio de 3 L. Os ensaios foram

realizados a uma taxa de aeração de 1 vvm e a temperatura de 24 °C. Para o biorreator do tipo tanque agitado os autores reportaram uma concentração celular de aproximadamente 20 g/L e um acúmulo de lipídeos de aproximadamente 5 g/L em 120 h de cultivo. Já para o biorreator do tipo *airlift* foi reportado uma concentração celular de aproximadamente 15 g/L e um acúmulo de lipídeos de aproximadamente 6 g/L em 180 h de cultivo. Embora o biorreator do tipo *airlift* tenha obtido maior concentração de lipídeos, o biorreator do tipo tanque agitado conseguiu atingir uma concentração próxima em menos tempo, o que leva a uma produtividade maior no tanque agitado do que no *airlift* (1,0 g/L.dia de lipídeos para o biorreator do tipo tanque agitado e 0,80 g/L.dia no biorreator do tipo *airlift*). Comparados aos ao presente estudo, os cultivos realizados em biorreator do tipo coluna de bolhas, obteve maiores produtividades em relação aos valores reportados pelos referidos autores. Verificou-se também que os valores de produtividade para o biorreator do tipo *airlift* obtidos neste estudo, foram semelhantes aos reportados por Yen e Liu (2014).

5.3 Perfil de Ácidos Graxos

O óleo microbiano obtido nos cultivos da levedura *Rhodotorula glutinis* em biorreatores foi caracterizado quanto a seu perfil de ácidos graxos. Na Tabela 5.7 é apresentada a composição relativa de ácidos graxos para o lipídeo extraído das células ao final de 240 h de cultivo nos biorreatores do tipo coluna de bolhas e *airlift* de 500 e 1800 mL. Na tabela também é apresentado, a fim de comparação o perfil de ácidos graxos de óleo de soja comercial, principal matéria prima para a produção de biodiesel no Brasil.

De um modo geral, o óleo microbiano produzido pela levedura *Rhodotorula glutinis* apresentaram composição semelhante, independente do biorreator utilizado. Na análise do perfil de ácidos graxos verificou-se que o óleo microbiano foi constituído principalmente e ácido oleico (C18:1), ácido esteárico (C18:0), ácido linoleico (C:18:2) e ácido palmítico (C16:0). O ácido oleico foi encontrado em maior proporção, representando entre 31 e 36% do total de ácidos graxos que constituíam o lipídeo, seguido pelo ácido esteárico (C18:0), entre 18 e 25%, ácido linoleico (C18:2), entre 18 e 20%, e ácido palmítico (C16:0), entre 20 e 23%. Os ácidos

graxos de dezoito e dezesseis carbonos, correspondem a cerca de 95% do perfil de ácidos graxos de óleo microbiano.

Tabela 5.7 – Perfil de ácidos graxos dos lipídeos obtidos nos reatores e do óleo de soja.

Ácido Graxo	Coluna de Bolhas 0,5 L		Airlift 0,5 L		Coluna de Bolhas 1,8 L		Airlift 1,8 L		Óleo de soja
Láurico (C12:0)	0,1	± 0,0	0,1	± 0,0	0,1	± 0,0	-	-	-
Mirístico (C14:0)	1,1	± 0,2	1,1	± 0,0	1,3	± 0,0	1,0	± 0,0	-
Palmítico (C16:0)	20,7	± 1,2	19,7	± 0,9	23,3	± 0,1	19,9	± 0,3	11,2 ± 0,0
Palmitoléico (C16:1)	0,2	± 0,1	0,2	± 0,0	0,3	± 0,0	0,2	± 0,0	-
Esteárico (C18:0)	18,8	± 1,7	19,6	± 1,3	17,6	± 0,0	25,4	± 0,4	3,4 ± 0,0
Oleico (C18:1)	35,5	± 3,2	36,2	± 1,7	35,9	± 0,2	30,8	± 0,6	29,9 ± 0,3
Linoleico (C18:2)	19,7	± 2,7	18,6	± 1,6	18,3	± 0,0	18,1	± 0,1	54,2 ± 0,0
Araquídico (C20:0)	0,8	± 0,0	1,2	± 0,2	0,7	± 0,0	1,3	± 0,0	0,3 ± 0,0
Beênico (C22:0)	0,9	± 0,1	0,9	± 0,1	0,8	± 0,0	1,0	± 0,0	0,4 ± 0,0
Lignocérico (C24:0)	1,4	± 0,2	1,4	± 0,2	1,1	± 0,0	1,4	± 0,0	-
Total (%)	99,4		99,0		99,5		99,3		99,4

(-): Não detectado.

Fonte: próprio autor.

Comparado ao óleo de soja, verificamos que, embora a proporção entre os ácidos graxos de dezesseis e dezoito carbonos se alterem, ambos os óleos apresentam uma constituição em ácidos graxos de C18 e C16 que somados correspondem a mais de 94% de seu perfil de ácidos graxos. Esta semelhança pode ser vantajosa para aplicações do óleo microbiano, como por exemplo, para a produção de biodiesel.

Para estimar as propriedades do biodiesel produzido a partir do lipídeo microbiano foi utilizando o programa BiodieselAnalyzer© no qual foram inseridas as informações do perfil de ácidos graxos. Este programa computacional permite estimar as propriedades físico-químicas do biodiesel com base na sua constituição de ácidos graxos (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014). As propriedades do biodiesel foram também comparadas as propriedades estimadas para o biodiesel de óleo de soja e com o preconizado pela legislação vigente no Brasil e são apresentadas na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Propriedades físico-químicas previstas pelo software BiodieselAnalyzer© geradas pelo perfil de ácidos graxos obtidos pelas amostras de lipídeo produzido pela levedura *R. glutinis*, em biorreatores do tipo coluna de bolhas (CB) e Airlift (AL), e do óleo de soja, comparadas com as especificações do biodiesel padronizadas pela norma brasileira (ANP 07/2018), da União Européia (EN 14214) e dos Estados Unidos (ASTM D6751).

Propriedade	CB 0,5 L	AL 0,5 L	CB 1,8 L	AL 1,8 L	Óleo de Soja	Brasil ANP 07/2008	UE EN 14214	EUA ASTM D6751
Índice de Saponificação - SV (mg/g)	200,43	199,75	202,52	200,27	199,87	NE	NE	NE
Massa específica - ρ (g/cm ³)	0,87	0,86	0,87	0,87	0,88	0,85 - 0,90 (20°C)	0,86 - 0,90 (15°C)	NE
Viscosidade cinemática - ν (mm ² /s)	4,03	4,05	4,04	4,12	3,65	3,0 - 6,0	3,5 - 5,0	1,9 - 6,0
Índice de Iodo - IV (g I ₂ /100 g)	67,81	66,44	65,73	61,68	125,06	NE	120 máx	NE
Ponto de névoa - CP (°C)	5,90	5,37	7,47	5,48	0,90	NE	NE	NE
Número Cetano - CN	58,28	58,68	58,46	59,67	45,47	NE	51 mín	47 mín
Estabilidade a oxidação (mín)- OS (h)	8,58	8,93	9,04	9,11	4,77	6	6	NE
Ponto de fluidez - PP (°C)	-0,42	-0,99	1,29	-0,88	-5,85	NE	Por região	NE
Ponto de Entupimento do Filtro a Frio - CFPP (°C)	35,11	37,31	31,50	47,27	-4,79	19	Por região	NE
Fator de Cadeia Longa Saturada - LCSF	16,42	17,12	15,27	20,29	3,72	NE	NE	NE
Maior Valor de Aquecimento - HHV (°C)	39,24	39,18	39,46	39,35	39,22	NE	NE	NE
Ácidos Graxos Saturados - SFA (%)	43,80	44,00	45,30	50,00	15,30	NE	NE	NE
Ácidos Graxos Mono Insaturados - MUFA (%)	35,70	36,40	36,20	31,00	29,90	NE	NE	NE
Ácidos Graxos Poli Insaturados - PUFA (%)	19,70	18,60	18,30	18,40	54,20	NE	NE	NE
Grau de Insaturação - DU	75,10	73,60	72,80	67,80	138,30	NE	NE	NE
APE - Posição Alílica	74,90	73,40	72,50	67,90	138,30	NE	NE	NE
Equivalente BAPE - Posição Bis-Alílica	21,30	21,00	19,70	21,30	54,80	NE	NE	NE

NE: Não estabelecido.

Fonte: próprio autor.

A massa específica do biodiesel é influenciada pela sua estrutura molecular, pois quanto maior for o comprimento de sua cadeia carbônica, maior é a massa específica, e quanto maior o número de insaturações menor será a massa específica. Outro fator que pode influenciar na massa específica é a presença de impurezas, tais como álcool, ou substâncias adulterantes (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). A massa específica (ρ) prevista para o biodiesel proveniente do óleo da levedura *R. glutinis*, extraído dos cultivos em biorreatores, foi em média de 0,87 g/cm³. Verificou-se que este valor é semelhante ao esperado para biodiesel de óleo de soja (0,88 g/cm³). Verificou-se ainda que este valor se adequa às normas brasileira, e da União Europeia que admitem valores de massa específica entre 0,85 e 0,90 g/cm³.

A viscosidade é um parâmetro de grande importância a ser considerado na caracterização de biodiesel. Quanto maior for a viscosidade do biodiesel, menor é a eficiência de sua atomização após a sua injeção na câmara de combustão, acarretando em maior formação de resíduos no interior do motor (KNOTHE, 2005). A viscosidade cinemática (ν) observada para o biodiesel produzido com o lipídeo microbiano foi em média de 4,06 mm/s². Apesar da viscosidade prevista para o biodiesel de óleo microbianos ser superior à do biodiesel de óleo de soja (3,65 mm/s²), o biodiesel de óleo microbiano atende as exigências previstas pelas normas brasileira, americana e europeia, que estabelecem valores de 1,9 a 6 mm/s².

A estabilidade a oxidação está ligada de forma proporcional ao grau de insaturação das moléculas do biodiesel e a posição das duplas ligações na cadeia carbônica, que varia de acordo com a matéria-prima empregada para sua produção. Quanto menor for sua estabilidade, mais chances o biodiesel tem de sofrer tanto degradação térmica quanto oxidativa, o que acarreta em formação de produtos insolúveis que acabam se depositando no interior do motor, o que pode acarretar em seu entupimento. Por estes motivos é importante que o biodiesel seja estável, pois estará sujeito a altas temperaturas e a exposição do ar, durante o funcionamento do motor (LOBÔ; FERREIRA; CRUZ, 2009). A estabilidade a oxidação (OS) esperada para o biodiesel obtido do lipídeo microbiano foi em média 8,9 h. A estabilidade a oxidação do biodiesel de óleo microbiano foi superior à do biodiesel proveniente do óleo de soja (4,77 h). Verificou-se também que este valor se encontra dentro do previsto pelas normas brasileiras e europeia, que estabelece

um valor mínimo de 6 h, diferentemente do observado para o biodiesel produzido através do óleo de soja, que apresentou um valor menor do que o estabelecido.

O ponto de entupimento do filtro a frio (CFPP) é relacionado a temperatura mínima na qual o biodiesel pode causar entupimento e problemas nos motores, este valor é baseado na quantidade de ácidos graxos de cadeia longa (a partir de 16 carbonos) (JIRU et al., 2018). O valor médio estimado deste parâmetro para o biodiesel de óleo microbiano foi de 37 °C, valor este superior ao obtido para óleo de soja (-4,79 °C), e que excede o permitido pela norma brasileira, a qual estabelece uma temperatura de entupimento do filtro a frio de 16 °C. Embora não se adeque a norma, este parâmetro pode ser melhorado com a adição de surfactantes e anticongelantes, ou ainda pela composição de blendas com biodiesel provenientes de outras fontes lipídicas. Para reduzir o CFPP Fortunato e Flumignan (2016) avaliaram a adição de surfactantes (TritonX100) e anticongelantes (etilenoglicol). Em seus estudos estes autores reportam reduções do valor de CFPP de 12 °C para -5 °C quando adicionaram ao biodiesel de sebo bovino 2% de surfactante Triton X100 juntamente com 1% de anticongelante etilenoglicol. Já Girardi et al. (2017) verificou que ao se misturar o biodiesel com o diesel comum, para formação de blendas, há uma redução do CFPP. Utilizando uma mistura de 80% (v/v) de biodiesel de óleo de girassol usado e 20% (v/v) de diesel (B80), o autor reporta uma redução de -7 °C para -10 °C com relação ao CFPP do biodiesel de óleo de girassol usado. Os autores reportaram ainda que para a blenda de óleo de soja usado, e 20% (v/v) de diesel (B80), houve uma redução do CFPP de -7 °C para -14 °C comparado ao biodiesel de óleo de soja usado original.

O número de cetano (CN) é um indicador adimensional da velocidade de combustão de um combustível para uma boa performance da máquina, ele determina o comportamento da combustão do biodiesel, como por exemplo o tempo de atraso da ignição, que é o tempo entre a injeção e ignição. Altos valores de CN ajudam a garantir boas propriedades de arranque a frio e minimiza a formação de fumaça branca (JIRU et al, 2018). Para esta propriedade foi previsto um valor médio de 58, que supera o valor estimado para o biodiesel proveniente do óleo de soja (45). A legislação Brasileira não estabelece limites para este parâmetro, mas ele está de acordo com o exigido pela norma americana e europeia que estabelecem valores mínimos de 47 e 51, respectivamente, alcançando valores mais adequados que o biodiesel de óleo de soja.

O índice de iodo (IV) é um parâmetro importante, que mede o grau de insaturação, pois como visto, este altera não só a viscosidade e a massa específica, mas como também afeta a estabilidade oxidativa do biodiesel (LOBÔ; FERREIRA; CRUZ, 2009). O índice de iodo estimado para o biodiesel a partir do perfil de ácidos graxos da amostra de lipídeos extraída da levedura foi em média de 65 g de I₂ por 100 g de amostra. Foi verificado que este valor é menor que o estimado para o óleo de soja (cerca de 125 g de I₂ por 100 g de amostra). Este parâmetro se encontra dentro do padronizado pela norma europeia que estabelece um valor limite de 120 g de I₂ por 100 g de amostra, diferentemente do valor estimado para o biodiesel proveniente do óleo de soja, que está acima do especificado.

Outros parâmetros não especificados pela legislação, mas normalmente avaliados como indicativos da qualidade do biodiesel são: o ponto de fluidez (PP), o ponto de névoa (CP) e o índice de saponificação (SV).

Outras duas propriedades são importantes para avaliar a aplicabilidade do combustível em regiões de clima frio, além do já mencionado ponto de entupimento do filtro a frio, são o ponto de fluidez (PP) e o ponto de névoa (CP). O PP é definido como a temperatura em que o combustível perde a sua fluidez, e o ponto de névoa (CP) é a temperatura em que é observada a formação dos primeiros cristais do combustível, quando este é resfriado. Estes fatores também são afetados pelo comprimento da cadeia de carbonos presentes nos ácidos graxos e pelo seu grau de insaturação (LOBÔ; FERREIRA; CRUZ, 2009). O ponto de fluidez e o ponto de névoa estimado para o biodiesel proveniente dos lipídeos extraídos pela levedura foi em média de -0,25 e 6,05 °C, respectivamente, valores maiores do que previsto para o biodiesel de óleo de soja (-5,85 e 0,9 °C, respectivamente).

Quanto maior for a proporção de ácidos graxos de cadeias curtas, maiores são os valores de índice de saponificação (SV), o que sugere baixos níveis de impurezas (JIRU et al., 2018). Para o biodiesel proveniente dos lipídeos obtidos nos biorreatores pela levedura *R. glutinis*, foi estimado um valor médio de 200 mg KOH/g, valor semelhante ao estimado para o biodiesel de óleo de soja.

Com a estimativa dessas propriedades físico-químicas do biodiesel de óleo microbiano obtido pela levedura *R. glutinis*, verifica-se o biodiesel é capaz de atender a grande parte das exigências, adequando-se aos parâmetros especificados pelas normas. Desta forma, este óleo microbiano pode ser uma alternativa para produção de biocombustíveis, complementando o biodiesel de

soja. Além da produção de biodiesel, os lipídeos microbianos podem apresentar outras aplicações, tais como produção de biosurfactantes, que podem ser utilizados para indústria farmacêutica e alimentícia (AMARAL et al. 2010). De um modo geral os lipídeos microbianos têm uma gama de aplicações. Uma biorrefinaria baseada em lipídeos poderia produzir diversos produtos para vários setores industriais. Estes lipídeos podem passar por hidrólise, gerando ácidos graxos livres e glicerol, os ácidos graxos podem ser convertidos em emulsificantes, lubrificantes, surfactantes, aditivos para plástico, antioxidantes, biodiesel, polímeros, solventes biodegradáveis, fragrâncias, farmacêuticos, agroquímicos, petroquímicos, entre outros (JIN et al., 2015).

6. Conclusões

Na etapa de otimização das condições de cultivo foi verificado que, para o acúmulo de lipídeos, dentro da região de estudo, as variáveis concentração inicial de glicerol (S_0) e pH apresentaram comportamento quadrático, com valores de máxima produção de lipídeos em concentração inicial de glicerol (S_0) de 140 g/L e um pH de 6,5. Já a razão molar entre carbono e nitrogênio (C/N) apresentou um comportamento linear positivo, atingindo o maior acúmulo de lipídeos em razão C/N de 100. Não sendo observado efeito significativo da concentração de inóculo sobre o acúmulo de lipídeos, dentro da faixa de variação estudada.

A análise estatística apontou que a máxima produção de lipídeos pela levedura *R. glutinis*, em frascos agitados, foi prevista para cultivos realizados com concentração inicial de glicerol de 140 g/L, razão C/N de 100 e pH de 6,5. Os cultivos realizados nestas condições apresentaram concentração celular de cerca de 30 ± 1 g/L após 200 h de cultivo, alcançando neste mesmo período um acúmulo de lipídeos de aproximadamente 15 ± 3 g/L, valores estes dentro da faixa de variação prevista pelo modelo.

Na etapa de ampliação de escala em biorreatores de agitação pneumática verificou-se que, de modo geral, os cultivos realizados em biorreatores alcançaram acúmulos de lipídeos inferiores aos obtidos em frascos agitados. Tal comportamento estar relacionado provavelmente a diferença nas condições de transferência de oxigênio, uma vez que o valor de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio alcançado nos biorreatores (máximo de 30 h^{-1}) foi inferior ao obtido em frascos agitados (49 h^{-1}).

Os cultivos realizados em biorreatores coluna de bolhas, comparados aos conduzidos em reatores *airlift* em condições semelhantes de transferência de oxigênio (k_{LA} próximo 30 h^{-1}), proporcionaram um maior acúmulo de lipídeos a levedura, o que está provavelmente ligado a melhor condição de mistura observada para os reatores coluna de bolha durante os cultivos. Desta forma, a ampliação de escala do processo obtenção de lipídeos microbianos deve ser acompanhada de uma análise mais detalhada das condições de transferência de oxigênio e da caracterização do comportamento fluidodinâmico dos biorreatores.

O óleo microbiano extraído da biomassa celular ao fim do cultivo foi constituído predominantemente por ácidos graxos de dezesseis e dezoito carbonos com diferentes graus de insaturação, os quais corresponderam a cerca de 95% de sua composição. O teor total de ácidos graxos de dezesseis e dezoito carbonos do óleo microbiano foi semelhante ao encontrado no óleo de soja, o que pode possibilitar o emprego do deste óleo para finalidades semelhantes às do óleo de soja.

A estimativa das propriedades do biodiesel de óleo microbiano, realizada com base no perfil de ácidos graxos, mostrou que, apesar de muitas de suas características assemelharem-se às do biodiesel de óleo de soja, sua aplicação pode requerer o uso de aditivos ou a composição de blendas, para atender integralmente a legislação vigente.

De modo geral, a produção de lipídeos por leveduras oleaginosas mostra-se como uma alternativa para aproveitamento do glicerol, subproduto da produção de biodiesel, suprimindo parte da sua demanda de lipídeos, além de possibilitar a obtenção de outros produtos tais como proteínas e carotenoides, sendo desta forma um potencial ponto de integração tecnológica com as atuais usinas de biodiesel, e um passo estratégico para o desenvolvimento de biorrefinarias baseadas em lipídeos

Referências

- AL-MASHHADANI, M. K.H.; WILKINSON, S. J.; ZIMMERMAN, W. B. Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport process. **Chemical Engineering Science**, v. 137, n. 1, p. 243-253, 2015.
- ALVES, F. **Modelagem e Simulação de Biorreator operando com fungos *Trametes versicolor* para produção de enzima lactase**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Mauá, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2010.
- AMARAL, P. F. F. et al. Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application. In: SEM, R. (Ed.) *Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Springer, 2010. p. 236-249.
- AMARETTI, A. et al. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2010.
- ANAND, P.; SAXENA, R. K. A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. **New Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 199–205, 2012.
- AOCS. **American Oil Chemists' Society Official Methods and Recommended Practices of AOCS**. 5th ed. AOCS Press, 2004.
- APHA. **Standard Methods for the Examination of water and wastewater**. 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC. 1998.
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26, p.56-62, 2006.
- AVAGYAN, A. B. A contribution to global sustainable development: Inclusion of microalgae and their biomass in production and bio cycles. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 10, n. 4, p. 313–317, 2008.
- BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: Um Breve Histórico E Aplicação Em Sínteses Estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306–319, 2011.
- BELTRAN, G. et al. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 169–177, 2008.
- BENTO, T. F. DA S. R. **Produção de lipídeos microbianos por leveduras empregando glicerol como principal fonte de carbono**. 2017. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

BEOPOULOS, A. et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 6, p. 375–387, 2009.

BEOPOULOS, A.; CHARDOT, T.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 692–696, 2009.

BLAKEY, S.; RYE, L.; WILSON, C. W. Aviation gas turbine alternative fuels: A review. **Proceedings of the Combustion Institute**, v. 33, n. 2, p. 2863–2885, 2011.

BLIGH, E.; DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BOMMAREDDY, R. R. et al. Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 36-48, 2015.

BORGES, M. E.; DÍAZ, L. Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2839–2849, 2012.

BRAUNWALD, T. et al. Effect of different C/N-ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 6581–6588, 2013.

BRAZ, D. S. **Produção de combustível de aviação em biorrefinarias anexas a fábricas kraft de celulose de eucalipto: avaliação técnico - econômica, de ciclo de vida e tomada de decisão por múltiplos critérios**. 2018. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

ÇALIK, P. et al. Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 22–23, p. 5075–5083, 2004.

CARVALHO, A. K. F. **Síntese de biodiesel por transesterificação pela rota etílica: Comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos**. 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

CHAPMAN, L. Transport and climate change: a review. **Journal of Transport Geography**, v. 15, n. 5, p. 354–367, 2007.

CHAPMAN, K. D.; DYER, J. M.; MULLEN, R. T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 2, p. 215–226, 2012.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294–306, 2007.

CHRISTOPHE, G. et al. Recent developments in microbial oils production: A possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 29–46, 2012.

CORDEIRO, C. S. et al. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 477–486, 2011.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776–792, 2009.

DAI, C.-C. et al. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 18, p. 2130–2134, 2007.

DEGALEESAN, S.; DUDUKOVIC, M.; PAN, Y. Experimental study of gas-induced liquid-flow structures in bubble columns. **AIChE Journal**, v. 47, n. 9, p. 1913–1931, 2001.

DOBROWOLSKI, A. et al. Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 237–243, 2016.

DONG, T. et al. Direct quantification of fatty acids in wet microalgal and yeast biomass via a rapid in situ fatty acid methyl ester derivatization approach. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 10237-10247, 2015.

EASTERLING, E. R. et al. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 356–361, 2009.

EPE – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis—Ano 2017. Rio de Janeiro: EPE, 2018a.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Effect of Nitrogen Source on Lipid Accumulation in Oleaginous Yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 130, n. 1984, p. 1693–1704, 1984.

FAKAS, S. et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 4, p. 573–580, 2009.

FORTUNATO, G. R.; FLUMIGNAN, D. L. Estudo do melhoramento do ponto de entupimento de filtro a frio do biodiesel de sebo a partir da adição de agentes surfactantes e anticongelantes usando planejamento de experimentos. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 6, n. 1, p. 55-61, 2017.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel De Microalgas: Avanços E Desafios. **Quimica Nova**, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013.

GARAY, L. A.; BOUNDY-MILLS, K. L.; GERMAN, J. B. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: A mechanistic approach and future perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 13, p. 2709–2727, 2014.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153–176, 2009.

HSIAO, T. et al. Development of a low capital investment reactor system: application for plant cell suspension culture. **Biotechnology progress**, v. 15, n. 1, p. 114–22, 1999.

JENA, U. et al. Oleaginous yeast platform for producing biofuels via co-solvent hydrothermal liquefaction. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 167, 2015.

JIN, M. et al. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 43-54, 2015.

JIRU, T. M. et al. Production of single cell oil from cane molasses by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodosporidium kratochvilovae*) SY89 as a biodiesel feedstock. **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 91-97, 2018.

JOHNSON, V. et al. Effect of pH on Lipid Accumulation by an Oleaginous Yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 382–384, 1992.

KADIC, E.; HEINDEL, T. J. **An Introduction to Bioreactor Hydrodynamics and Gas-Liquid Mass Transfer**. New Jersey: Wiley, 2014.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O. Bubble column reactors. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2263–2283, 2005.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 1, p. 1059-1070, 2005.

KONG, W. B. et al. Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 62–69, 2013.

KOT, A. M. et al. Effect of initial pH of medium with potato wastewater and glycerol on protein, lipid and carotenoid biosynthesis by *Rhodotorula glutinis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 25-31, 2017.

- KRAISINTU, P.; YONGMANITCHAI, W.; LIMTONG, S. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. **Kasetsart Journal - Natural Science**, v. 44, n. 3, p. 436–445, 2010.
- KUNDIYANA, D. K.; HUHNKE, R. L.; WILKINS, M. R. Syngas fermentation in a 100-L pilot scale fermentor: Design and process considerations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 5, p. 492–498, 2010.
- LI, Y.; ZHAO, Z. K.; BAI, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 312–317, 2007.
- LIANG, M. H.; JIANG, J. G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 395–408, 2013.
- LIANG, Y. et al. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7581–7586, 2010.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 7, p. 1043–1049, 2009.
- LIU, J. et al. Bioconversion of mixed volatile fatty acids into microbial lipids by *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 645–651, 2017.
- LOBÔ, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.
- LUO, H. et al. A pH control strategy for increased β -carotene production during batch fermentation by recombinant industrial wine yeast. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 195–200, 2013.
- MANOWATTANA, A. et al. Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol into lipids and carotenoids by an oleaginous red yeast *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 in airlift bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 1, p. 59-66, 2018.
- MAYAKI, I. A. et al. **Sustainable Bioenergy Development in UEMOA Member Countries**, 2008. Disponível em: http://www.globalproblems-globalsolutions-files.org/gpgs_files/pdf/UNF_Bioenergy/UNF_Bioenergy_full_report.pdf. Acesso em: 17 jan. 2019.
- MCCLURE, D. D. et al. Experimental investigation into the impact of sparger design on bubble columns at high superficial velocities. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 106, n. 1, p. 205-213, 2016.

- MIYAMOTO, K.; WABLE, O.; BENEMANN, J. R. Vertical tubular reactor for microalgae cultivation. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 10, p. 703–708, 1988.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A. DA; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639–648, 2009.
- MUNCH, G. et al. Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. **Bioresource Technology**, v. 185, n. 1, p. 49–55, 2015.
- OLIVEIRA, B. C. **Complexidade em biorrefinarias**. 2016. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- PAGLIARO, M. et al. From glycerol to value-added products. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 24, p. 4434–4440, 2007.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 5, p. 542–547, 2003.
- PEREIRA, C. M. P. et al. Biodiesel derived from microalgae: Advances and perspectives. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013–2018, 2013.
- PÍPOLO, A. E. et al. Teores de óleo e proteína em soja: fatores envolvidos e qualidade para a indústria. **Comunicado Técnico 86**, p. 1–15, 2015.
- RATTRAY, J. B. M.; SCHIBECI, A.; KIDBY, D. K. Lipids of Yeasts. **Bacteriological Reviews**, v. 39, n. 3, p. 197–231, 1975.
- RIBEIRO, C. P.; LAGE, P. L. C. Experimental study on bubble size distributions in a direct-contact evaporator. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 1, p. 69–81, 2004.
- 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, n. 1, p. 210–218, 2011.
- SILVA, J. P. A. et al. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 259–265, 2012.
- SITEPU, I. R. et al. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 360–369, 2013.

SITEPU, I. R. et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1336–1360, 2014.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2. ed. Amsterdam: Pergamon, 1995.

SUN, M. L. et al. Engineering *Yarrowia lipolytica* for efficient γ -linolenic acid production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 172–180, 2017.

TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. BiodieselAnalyzer©: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal 2**, v. 2, p. 55–57, 2014.

TAPIA, E. V. et al. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. **AMB Express**, v. 2, p. 64, 2012.

TCHAKOUTEU, S. S. et al. Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: Strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 911–927, 2015.

WISE, W. S. The measurement of the aeration of culture media. **Journal of General Microbiology**, v. 5, p. 167–177, 1951.

XU, J. et al. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, n. 1, p. 30–36, 2012.

YEN, H. W.; LIU, Y. X. Application of airlift bioreactor for the cultivation of aerobic oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with different aeration rates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 195–198, 2014.

YOO, C. et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. S71–S74, 2010.

ZHANG, J. et al. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1906–1911, 2011.

ZHANG, K. et al. Effect of photoautotrophic and heteroautotrophic conditions on growth and lipid production in *Chlorella vulgaris* cultured in industrial wastewater with the yeast *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Applied Phycology**, p. 1–6, 2017.

ZHANG, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 149–153, 2014.

ZHAO, X. et al. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 5, p. 405–412, 2008.

ZHAO, X. et al. Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospordium toruloides* Y4. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 581–585, 2010.

ZHU, Z. et al. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospordium toruloides*. **Nature Communications**, v. 3, p. 1112, 2012.

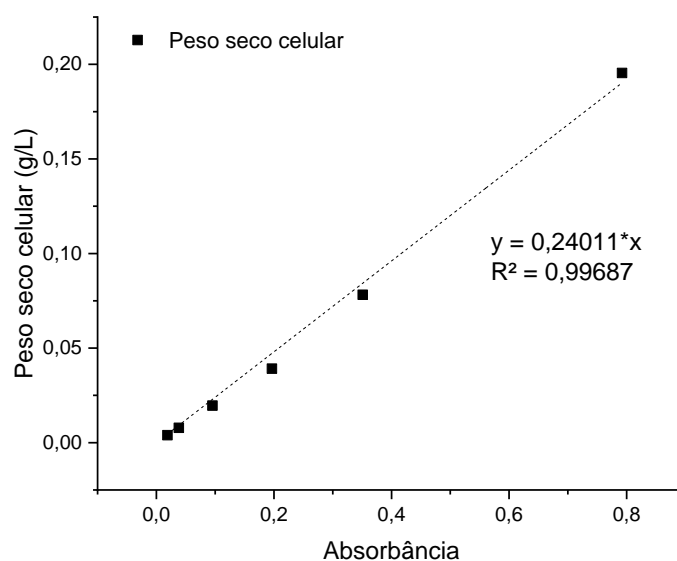
APÊNDICE

APÊNDICE A - Adequação de metodologias analíticas

A.1 – Curva de calibração para determinação da concentração celular da levedura *Rhodotorula glutinis* por espectrofotometria

Para a determinação da concentração celular ao longo do cultivo foi utilizada a técnica de espectrofotometria de densidade óptica (D.O.) onde a absorbância da suspensão celular, medida à 600 nm, é relacionada a concentração celular obtida através do peso seco celular obtida por gravimetria. A curva de calibração é apresentada na Figura A.1.

Figura A.1 – Concentração celular em função da absorbância em um comprimento de onda de 600 nm.



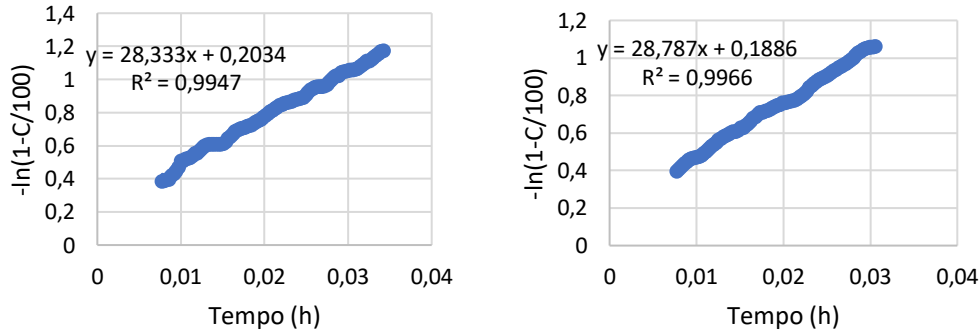
Fonte: próprio autor.

APÊNDICE B - Caracterização do Biorreator

B.1 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La)

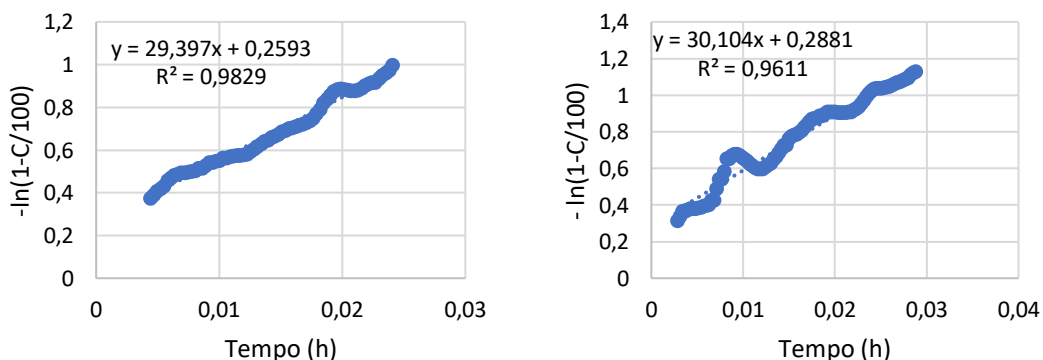
Através de uma sonda polarográfica foi registrado o perfil da concentração de oxigênio presente no meio pelo tempo. Através do ajuste linear utilizando a equação $-\ln(1 - C_{O_2}/100) = k_La \cdot t$ é possível determinar o coeficiente de transferência volumétrico de oxigênio pela inclinação da reta. As medições foram realizadas em duplicatas, com taxa de aeração de 0,1 vvm, e são apresentadas na Figura B.1, para o biorreator do tipo coluna de bolhas de 0,5 L, Figura B.2 para o biorreator do tipo coluna de bolhas de 1,8 L, Figura B.3 para o biorreator airlift de 0,5 L e pela Figura B.4 para o biorreator airlift de 1,8 L.

Figura B.1 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para o biorreator do tipo coluna de bolhas com o volume útil de 0,5 L, com aeração de 0,1 vvm.



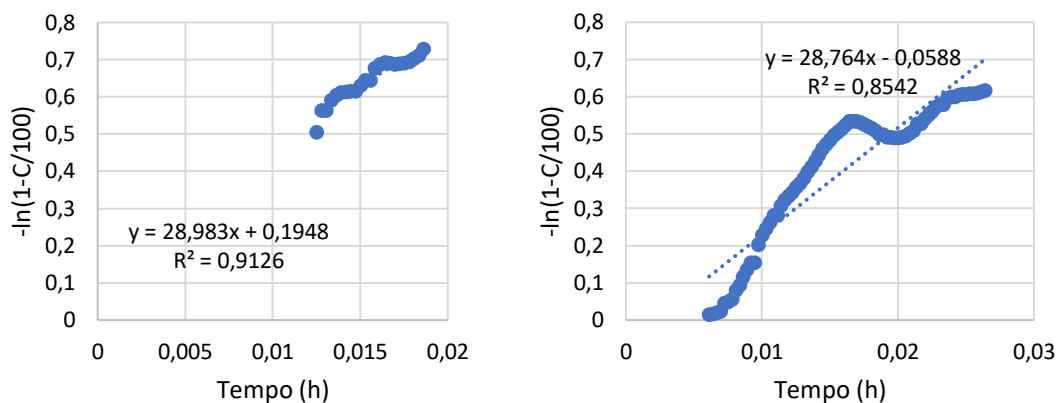
Fonte: próprio autor.

Figura B.2 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para o biorreator do tipo coluna de bolhas com o volume útil de 1,8 L, com aeração de 0,1 vvm.



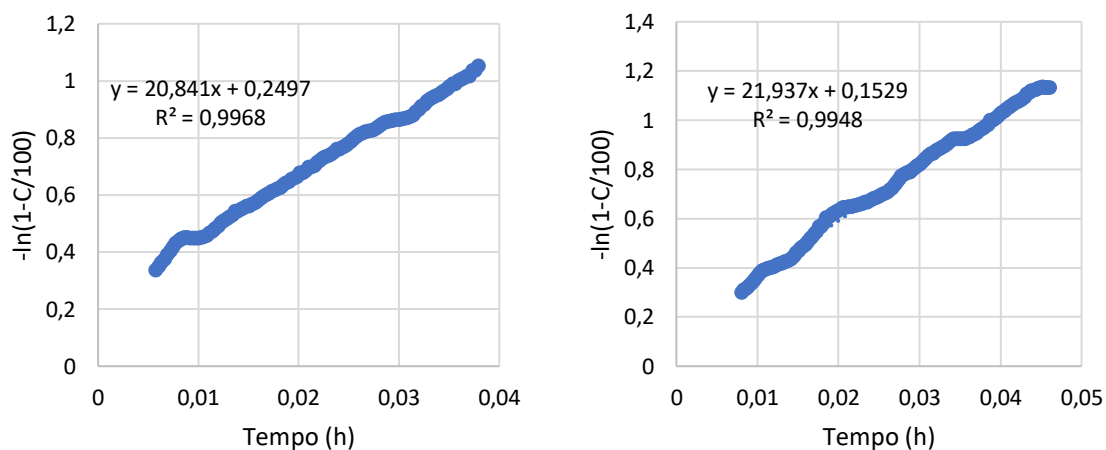
Fonte: próprio autor.

Figura B.3 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para o biorreator do tipo airlift com o volume útil de 0,5 L, com aeração de 0,1 vvm.



Fonte: próprio autor.

Figura B.4 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para o biorreator do tipo airlift com o volume útil de 1,8 L, com aeração de 0,1 vvm.



Fonte: próprio autor.