

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

VALDIMIR DOS SANTOS PEREIRA

**Influência da transferência de oxigênio na produção de lipídeos e
carotenoides por *Rhodotorula glutinis***

Lorena
2020

VALDIMIR DOS SANTOS PEREIRA

Influência da transferência de oxigênio na produção de lipídeos e carotenoides por *Rhodotorula glutinis*

Dissertação apresentado 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
2020

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)

Pereira, Valdimir dos Santos
Influência da transferência de oxigênio na
produção de lipídeos e carotenoides por *Rhodotorula*
glutinis / Valdimir dos Santos Pereira; orientador
João Paulo Alves Silva - Versão Corrigida. - Lorena,
2020.
108 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.
2020

1. Kla. 2. Coluna de bolhas. 3. Lipídeos. 4.
Carotenoides. I. Título. II. Silva, João Paulo Alves,
orient.

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, que esteve comigo desde a primeira decisão relacionada ao mestrado, que me permitiu chegar até o fim e que me ajudou de diversas formas para que essa etapa da minha vida fosse concluída;

Aos meus pais Rosa e Valdomiro, pelo esforço e pelo exemplo através dos quais pude chegar até aqui e que desde sempre me ajudaram de várias maneiras, desde as mais simples até as mais complexas, a avançar na vida;

A minha noiva e hoje esposa Danielle por sua compreensão, paciência e amor, sem os quais essa caminhada teria sido muito mais árdua;

Aos meus colegas de trabalho Ono, Juliane, Ronnie, Wanderson, Marcos, Damião, Telmo, Roberto, Junior, Tagé, Assad e outros que mesmo com suas dificuldades me ajudaram a concluir este curso;

Aos meus colegas de mestrado Wallyson, Ana, Cintia, Douglas e Raianni, pela amizade que eu achava que seria algo difícil de encontrar nessa etapa, pelas risadas que tornaram o processo mais ameno e pela companhia que tornou as coisas menos difíceis;

Ao professor João Paulo por seus ensinamentos, por sua compreensão, por sua sabedoria, por sua humildade, por sua orientação, que seria impossível resumir ao âmbito do mestrado pois me ensinou muitas coisas que levarei para a vida. Obrigado por me ensinar, não somente através de palavras e equações, mas através do exemplo o sentido de ser mestre;

Aos professores do PPG-EQ da EEL Aarão, Luiz Cláudio, Heizir, Larissa, Pedro, Messias e também a professora Maria Auxiliadora do PPG-PE;

A secretária do PPG-EQ da EEL Ana Beatriz por toda a ajuda, disponibilidade, compreensão e simpatia desde o primeiro momento em que cheguei nesta instituição;

Agradeço à FAPESP (processo 2016/06683-0) e à CNPq (processo 455260/2014-1) e a CAPES pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos aqui citados e a outros que também contribuíram para que esse trabalho fosse concluído e que com certeza não foram esquecidos: Obrigado por sua ajuda em um momento difícil e pela compreensão em uma hora turbulenta.

RESUMO

PEREIRA, V. S. **Influência da transferência de oxigênio na produção de lipídeos e carotenoides por *Rhodotorula glutinis***. 2020. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

A produção brasileira de biodiesel vem crescendo nos últimos anos devido ao aumento do teor mínimo deste produto no combustível final. O óleo de soja representa aproximadamente 70% da matéria prima utilizada para produção de biodiesel no Brasil, desta forma, a busca por novas fontes de matéria-prima que possam substituir parcialmente o óleo de soja nesta cadeia produtiva tem despertado considerável interesse, tendo os lipídeos produzidos por microrganismos oleaginosos um promissor potencial para tal finalidade. Dessa forma o presente trabalho avaliou a influência da transferência de oxigênio sobre a produção de lipídeos e carotenoides pela levedura *Rhodotorula glutinis*, em cultivos realizados em frascos agitados e biorreatores de agitação pneumática (500 mL), utilizando glicerol como fonte de carbono. Na primeira etapa do trabalho a influência da concentração de substrato (70, 95 e 125 g/L), da agitação (150, 200 e 250 rpm) e da relação entre volume de frasco e volume de meio (2,5, 3,75 e 5,0) sobre o k_La foram avaliadas visando o estabelecimento de um modelo matemático para descrição do comportamento desta variável em frascos agitados. Esse modelo foi utilizado para estabelecer as condições experimentais na segunda etapa do estudo, em que a influência do k_La (20, 30 e 40 h⁻¹) e da concentração de glicerol (70, 95 e 125 g/L) sobre a produção de carotenoides e lipídeos foram avaliadas. Nesta etapa verificou-se um aumento da produção de carotenoides e lipídeos com o aumento de ambas as variáveis, k_La e concentração inicial de substrato. Nos estudos em biorreatores de bancada, primeiramente avaliou-se a influência do tamanho de poro dos dispersores de ar (2 e 200 µm), da vazão de ar (0,25 e 1,00 vvm) e do tipo de biorreator (*Air-lift* e coluna de bolhas) sobre o k_La e o tempo de mistura. Nesta etapa verificou-se que o biorreator tipo coluna de bolhas com dispersor com poros de 2 µm permitiu alcançar os maiores valores de k_La , sendo este o conjunto utilizado na etapa seguinte de cultivos da leveduras. Nos cultivos em biorreatores avaliou-se a influência do k_La (75, 125 e 175 h⁻¹) e da concentração inicial de glicerol (70, 160 e 250 g/L) sobre a produção de carotenoides e lipídeos. Nesta etapa foram alcançadas concentrações de até 5,91 mg/L e 12,52 g/L, para carotenóides e lipídeos, respectivamente. Verificou-se ainda que as condições de cultivo que maximizam a produção de lipídeos podem não coincidir com as condições ótimas para a produção de carotenoides, e que o emprego dos modelos que descrevem o comportamento da produção de ambos os metabólitos pode ser uma ferramenta importante para estabelecer as condições de processo que atendam da melhor forma possível as necessidades pretendidas para o bioprocessos.

Palavras-chave: k_La . Coluna de bolhas. Lipídeos. Carotenoides.

ABSTRACT

PEREIRA, V. S. **Influence of oxygen transfer on lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis***. 2020. 108 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Brazilian biodiesel production has been growing in recent years due to the increase in the minimum content of this product in the final fuel. Soybean oil represents approximately 70% of the feedstock used for biodiesel production in Brazil, so the search for new sources that can partially replace it in this production chain is of considerable interest, with lipids produced by oleaginous microorganisms being a potential substitute for this purpose. Thus, the present work evaluated the influence of oxygen transfer on the production of lipids and carotenoids by the yeast *Rhodotorula glutinis*, in cultures carried out in shaken flasks and pneumatically agitated bioreactors (500 mL), using glycerol as the carbon source. In the first stage of the work, the influence of substrate concentration (70, 95 and 125 g/L), agitation frequency (150, 200 and 250 rpm) and the relationship between bottle volume and medium volume (2.5, 3.75 and 5.0) on k_La were evaluated in order to establish a mathematical model to describe the behavior of this variable in shaken flasks. This model was used to establish the experimental conditions in the second stage of the study, in which the influence of k_La (20, 30 and 40 h⁻¹) and the glycerol concentration (70, 95 and 125 g/L) on the production of carotenoids and lipids were evaluated. In this stage was an increase in the production of carotenoids and lipids with the increase of both variables, k_La and initial substrate concentration. In studies in bioreactors, the influence of two spargers with different porosities (2 and 200 μm), air flow (0.25 and 1.00 vvm) and the type of bioreactor (Air-lift and bubble column) on k_La and mixing time were evaluated. It was verified that the bubble column bioreactor equipped with a 2 μm of porosity sparger allowed to achieve the highest k_La value. In the cultivations in bioreactors, the influence of k_La (75, 125 and 175 h⁻¹) and the initial glycerol concentration (70, 160 and 250 g/L) on the production of carotenoids and lipids were evaluated. In this stage, concentrations of up to 5.91 mg/L and 12.52 g/L were reached for carotenoids and lipids, respectively. It was also verified that the culture conditions that maximize the production of lipids may not coincide with the optimal conditions for the production of carotenoids and that the use of models that describe the production behavior of both metabolites can be an important tool for establish process conditions that could enable to reach the intended needs for the bioprocess.

Key-words: k_La . Bubble-collum. Lipids. Carotenoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Levantamento realizado na plataforma Scopus sobre os países com maior número de publicações contendo o termo “Biorefinery” no período de 2009 a 2019.	20
Figura 2- Mapa com os projetos de biorrefinarias financiadas pelo <i>Bioenergy Technologies Office</i> (EUA).	21
Figura 3- Levantamento realizado na plataforma Scopus sobre o número de publicações por ano envolvendo o termo “Biorefinery” no período de 2009 a 2019.	22
Figura 4- Mecanismo genérico da reação de transesterificação de triglicerídeos. ...	23
Figura 5- Matérias primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil no período de 2009 a 2018.	23
Figura 6- Produção de biodiesel no Brasil no período de 2009 a 2018.	25
Figura 7- Produção de glicerina oriunda da produção do biodiesel nas regiões do Brasil no período de 2009 a 2018.	25
Figura 8- Volumes e receitas de exportação de glicerina bruta e glicerol no período de 2010 a 2018.	26
Figura 9- Estrutura de um triglicerídeo genérico (a), de um fosfolípídeo (b) e de um esteroide (c).	29
Figura 10- Estrutura química do β -caroteno (a) e da luteína (b).	31
Figura 11- Primeira etapa do processo de acúmulo de lipídeos por microrganismos oleaginosos.	33
Figura 12- Ilustração das vias celulares para produção de triglicerídeos.	35
Figura 13- Ilustração de um biorreator tipo tanque agitado e aerado com seus componentes.	39
Figura 14- Ilustração de um biorreator tipo coluna de bolhas, com aspensor e sentido de fluxo.	40
Figura 15- Ilustração das seções e sentidos de escoamento em um biorreator <i>Air-lift</i>	41
Figura 16- Formas construtivas dos reatores <i>Air-lift</i> : (a) Cilindros concêntricos, (b) <i>Split-Cylinder</i> e (c) Circulação externa.	42
Figura 17- Frasco Erlenmeyer de 250 mL utilizado nos ensaios de determinação experimental do k_{La} em incubadora de agitação orbital, contendo sonda (1), ponto para injeção de Ar/Nitrogênio (2) e ponto para saída de Ar/Nitrogênio (3).	46
Figura 18- Dimensões dos dispersores utilizados nos experimentos: (a) Dispersor com porosidade de 2,0 μm e (b) dispersor com porosidade de 200 μm	49
Figura 19 - Reatores de 500 mL utilizados nos experimentos: (a) <i>Air-lift</i> , (b) Coluna de bolhas, com sistema de controle de temperatura por encamisamento (1), tomada lateral para retirada de amostras (2) e sistema de injeção de ar (3).	49
Figura 20- Imagem do referencial de escala para determinação do tamanho de bolhas.	52

Figura 21- Comparação entre os níveis de aplicação do comando <i>Threshold</i> , a nitidez da imagem e a contagem de bolhas para uma fotografia do meio aerado com o dispersor de 2,0 μm com aeração de 1,00 vvm.	53
Figura 22- Gráfico de Pareto com os efeitos da Agitação (1), Relação entre VFrasco/VMeio (2), Concentração inicial de glicerol (S_0) (3) e suas interações sobre o k_{LA} em frascos agitados.	59
Figura 23- Superfície de resposta que descreve o comportamento do k_{LA} em função da agitação e da relação VFrasco/VMeio , em valores reais, com concentração de glicerol em 95 g/L, em frascos Erlenmeyer de 250 mL alocados em agitador orbital a 30°C.	61
Figura 24- Gráfico de Pareto para a análise dos efeitos do k_{LA} (1) e da concentração inicial de glicerol (S_0) (2) sobre a concentração celular ao final de 120 h de cultivo.	66
Figura 25- Gráfico de Pareto para a análise dos efeitos do k_{LA} (1) e da concentração inicial de glicerol (S_0) (2) sobre a concentração de carotenoides ao final de 120 h de cultivo.	67
Figura 26- Gráfico de Pareto para a análise dos efeitos do k_{LA} (1) e da concentração inicial de glicerol (S_0) (2) sobre a concentração de lipídeos ao final de 120 h de cultivo.	67
Figura 27- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de células alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo, em função do k_{LA} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.	70
Figura 28- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de carotenoides alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo, em função do k_{LA} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.	71
Figura 29- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de lipídeos alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo, em função do k_{LA} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.	72
Figura 30- Efeitos dos modelos de dispersor sobre o k_{LA} nos reatores <i>Air-lift</i> e Coluna de bolhas.	76
Figura 31- Efeitos dos modelos de dispersor sobre o tempo de mistura nos reatores <i>Air-lift</i> e Coluna de bolhas.	76
Figura 32- Registro fotográfico da distribuição de bolhas formado no reator coluna de bolhas pelo dispersor de 200 μm nas aerações de 0,25 vvm (a) e 1,0 vvm (b).	80
Figura 33- Registro fotográfico da distribuição de bolhas formado no reator coluna de bolhas pelo dispersor de 2,0 μm nas aerações de 0,25 vvm (a) e 1,0 vvm (b).	81
Figura 34- Gráfico de Pareto com os efeitos lineares, quadráticos e de interação dos fatores k_{LA} e concentração inicial de glicerol (S_0), sobre a concentração de células ao final de 120 h de cultivo em biorreator coluna de bolhas.	85
Figura 35- Gráfico de Pareto com os efeitos lineares, quadráticos e de interação dos fatores k_{LA} e concentração inicial de glicerol (S_0), sobre a concentração de carotenoides ao final de 120 h de cultivo em biorreator coluna de bolhas.	86
Figura 36- Gráfico de Pareto com os efeitos lineares, quadráticos e de interação dos fatores k_{LA} e concentração inicial de glicerol (S_0), sobre a concentração de lipídeos ao final de 120 h de cultivo em biorreator coluna de bolhas.	87

Figura 37- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de células alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo em biorreator coluna de bolhas, em função do k_{LA} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.....	90
Figura 38- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de carotenoides alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo em biorreator coluna de bolhas, em função do k_{LA} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.	92
Figura 39- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de lipídeos alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo em biorreator coluna de bolhas, em função do k_{LA} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.....	93
Figura 40- Evolução na concentração de lipídeos ao longo das 120 horas de cultivo do ensaio de confirmação.....	95
Figura 41- Evolução na concentração de células ao longo das 120 horas de cultivo do ensaio de confirmação.....	97
Figura 42- Evolução na concentração de carotenoides ao longo das 120 horas de cultivo do ensaio de confirmação, para um dos experimentos realizados.	98
Figura 43- Cálculo de $-\ln(1-C/C_s)$ para todos os dados obtidos durante o experimento, com concentração de glicerol em 95,0 g/L, relação V_{Frasco}/V_{Meio} em 3,75 e agitação em 200 rpm.	108
Figura 44- Cálculo de $-\ln(1-C/C_s)$ somente dos dados utilizados para estabelecimento do k_{LA} no experimento com concentração de glicerol em 95,0 g/L, relação V_{Frasco}/V_{Meio} em 3,75 e agitação em 200 rpm.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação entre as produtividades de lipídeos gerados por leveduras e microalgas em diferentes estudos.....	28
Tabela 2- Planejamento experimental 2 ³ com faces centradas e valores reais das variáveis: Agitação, Concentração de glicerol e Relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$	44
Tabela 3- Volumes de meio necessários para o ajuste da relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ em frascos Erlenmeyer de 250 mL.....	45
Tabela 4- Planejamento experimental 2 ² com réplicas em todos os experimentos e triplicata no ponto central, empregado para avaliação da influência da concentração de glicerol (S_0) e do k_{LA} sobre a produção de carotenoides e lipídeos pela levedura.	47
Tabela 5- Porosidade dos dispersores utilizados no experimento.	48
Tabela 6- Comparação da contagem de bolhas manual e a realizada pelo programa ImageJ para as fotografias referentes ao dispersor de 200 μm com aeração de 0,25 vvm em reator coluna de bolhas e solução 200 g/L de glicerol.	51
Tabela 7- Planejamento experimental 2 ² com faces centradas e triplicata no ponto central, empregado para cultivo em biorreatores tipo coluna de bolhas.	54
Tabela 8 - Planejamento experimental 2 ³ com face centrada, utilizado na avaliação da influência das variáveis: Agitação, Razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ e concentração de glicerol (S_0), sobre a resposta k_{LA} em ensaios realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL a 30°C.	58
Tabela 9- Análise de variância dos efeitos principais e de interação das variáveis Agitação (1) e razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ (2) sobre o k_{LA} em frascos agitados.	60
Tabela 10- Valores de k_{LA} obtidos experimentalmente e calculados a partir do modelo proposto e através das equações apresentadas por Reynoso-Cereceda <i>et al.</i> (2016) e Liu, Wu e Ho (2006).	63
Tabela 11- Planejamento experimental 2 ² com repetições utilizado para avaliação da influência das variáveis coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) e concentração inicial de glicerol (S_0), sobre a concentração celular, de carotenoides e lipídeos, alcançadas pela levedura <i>Rhodotorula glutinis</i> em 120 horas de cultivo....	65
Tabela 12- Análise de variância dos efeitos principais e de interação: k_{LA} (1) e concentração inicial de glicerol (S_0) (2) sobre a concentração celular da levedura ao fim das 120 horas de cultivo.....	68
Tabela 13- Análise de variância dos efeitos principais e de interação: k_{LA} (1) e concentração de glicerol (S_0) (2), sobre a produção de carotenoides ao fim das 120 horas de cultivo.	69
Tabela 14- Análise de variância dos efeitos principais e de interação: k_{LA} (1) e concentração de glicerol (S_0) (2), sobre a produção de lipídeos ao fim das 120 horas de cultivo.	69

Tabela 15- Planejamento experimental tipo Taguchi L8 com triplicata dos ensaios para avaliação da influência das variáveis aeração, porosidade do dispersor e tipo de reator sobre as respostas k_{La} e tempo de mistura.	75
Tabela 16- Valores calculados para a velocidade superficial do gás nos reatores dos tipos <i>Air-lift</i> e coluna de bolhas com aerações de 0,25 e 1,00 vvm.	79
Tabela 17- Quantificação das bolhas produzidas pelos dispersores de 200 μm e de 2,0 μm nas aerações de 0,25 e 1,00 vvm em reator do tipo coluna de bolhas.	81
Tabela 18- Distribuição do tamanho de bolhas para os dispersores de 200 μm e 2,0 μm nas aerações de 0,25 e 1,00 vvm, com limites de área estabelecidos pelo programa ImageJ.	82
Tabela 19- Resultados obtidos para a concentração de células, carotenoides e lipídeos após 120 horas de cultivo em biorreatores coluna de bolhas com volume útil de 500 mL sob as diferentes condições do planejamento experimental.	84
Tabela 20- Análise de variância dos efeitos principais, quadráticos e de interação: k_{La} (1) e concentração inicial de glicerol, S_0 (2), sobre a concentração celular ao fim das 120 horas de cultivo em um biorreator coluna de bolhas de 500 mL.	88
Tabela 21- Análise de variância dos efeitos principais, quadráticos e de interação: k_{La} (1) e concentração inicial de glicerol, S_0 (2), sobre a produção de carotenoides ao fim das 120 horas de cultivo em um biorreator coluna de bolhas de 500 mL.	89
Tabela 22- Análise de variância dos efeitos principais, quadráticos e de interação: k_{La} (1) e concentração inicial de glicerol, S_0 (2), sobre a produção de lipídeos ao fim das 120 horas de cultivo em um biorreator coluna de bolhas de 500 mL.	89
Tabela 23- Valores calculados e resultados obtidos no ensaio de confirmação para a concentração de células, carotenoides e lipídeos após 120 horas de cultivo.	95
Tabela 24- Teor mássica de lipídeos na biomassa alcançada durante diferentes etapas do presente estudo.	96
Tabela 25- Comparação entre os resultados obtidos pelas referências para cultivos realizados com leveduras do gênero <i>Rhodotorula</i> e os valores obtidos no presente estudo.	98

SUMÁRIO

1	Introdução	17
2	Objetivo	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	Revisão bibliográfica	20
3.1	Biorrefinarias e produção de biodiesel	20
3.2	Glicerol: Coproduto e substrato	24
3.3	Leveduras oleaginosas e seus metabólitos de interesse	27
3.4	Biossíntese de carotenoides e lipídeos	32
3.5	Disponibilidade de oxigênio e reatores de agitação pneumática	37
4	Materiais e Métodos	43
4.1	Microrganismo e preparação de inóculo	43
4.2	Estabelecimento de um modelo empírico para descrição do k_{La} em frascos agitados	43
4.3	Avaliação da influência da concentração de substrato e do k_{La} na produção de carotenoides e lipídeos em frascos agitados	47
4.4	Definição do biorreator e do dispersor para o cultivo	48
4.4.1	Determinação do k_{La} em biorreatores	50
4.4.2	Determinação do tempo de mistura em biorreatores	50
4.4.3	Caracterização das bolhas	50
4.5	Avaliação da influência da disponibilidade de oxigênio e da concentração de substrato sobre a produção de carotenoides e lipídeos em biorreator	54
4.6	Metodologia analítica	55
4.6.1	Concentração celular	55
4.6.2	Quantificação de lipídeos totais na biomassa	55
4.6.3	Extração e quantificação de carotenoides	56
5	Resultados e discussão	58
5.1	Estabelecimento de um modelo empírico para descrição do k_{La} em frascos agitados	58
5.2	Avaliação da influência da concentração inicial de substrato e do k_{La} na produção de carotenoides e lipídeos em frascos agitados	64
5.3	Definição do biorreator e do dispersor para o cultivo	74

5.4	Avaliação da influência da disponibilidade de oxigênio e da concentração inicial de substrato sobre a produção de carotenoides e lipídeos em biorreator	83
5.4.1	Ensaio de confirmação	94
6	Conclusões	101
	Referências.....	102
	Apêndice A – Tratamento dos dados para o cálculo de k_{La}	108

1 Introdução

Nos últimos dez anos a produção brasileira de biodiesel cresceu constantemente devido a gradual elevação de seu teor na composição do Diesel combustível. Esse aumento imposto pela atual legislação é decorrente de uma estratégia de desenvolvimento sustentável que vem sendo aplicada em vários países devido a fatos como a redução das reservas de petróleo e ao aumento da concentração de CO₂ na atmosfera terrestre, que vem sendo apontado como a causa provável de uma série de alterações ambientais observados no planeta.

O Brasil foi pioneiro no uso de combustíveis renováveis como o etanol e em um momento mais recente o biodiesel, o qual atualmente alcança uma proporção de 12% do combustível vendido nas bombas dos postos. O óleo de soja corresponde a mais de 70% da matéria prima utilizada para produção de biodiesel no Brasil, o que requer extensas áreas agrícolas para o plantio e longos períodos necessários para colheita, condições estas que são agravadas pelo risco relativo às interpéries sobre a lavoura e pela concorrência do uso da terra com a produção de alimentos.

Dessa forma a redução na participação do óleo de soja na cadeia produtiva do biodiesel no Brasil mostra-se como um fator fundamental para que esta indústria seja competitiva, sendo que uma das alternativas existentes é o uso de óleos microbianos para produção deste combustível.

Os óleos microbianos são produzidos por algumas espécies de bactérias, leveduras e microalgas e apresentam algumas vantagens em relação as culturas vegetais como, por exemplo, a ausência de sazonalidade. Atualmente muitos estudos estão voltados à produção de óleos microbianos, sendo que dentre os microrganismos produtores as leveduras apresentam algumas vantagens. Em comparação com as microalgas, por exemplo, as leveduras não necessitam de iluminação e possibilitam a obtenção de maiores concentrações de lipídeos.

Outra vantagem importante das leveduras é a possibilidade de utilizar subprodutos de outros processos como fonte de carbono, como por exemplo o glicerol, que vem sendo gerado em proporções cada vez maiores, como coproduto da própria indústria do biodiesel. Dessa forma a utilização destes microrganismos para produção de óleos microbianos a partir do glicerol apresenta um aspecto estratégico para a indústria brasileira de biodiesel, sendo capaz de converter um coproduto em

matéria prima e conseqüentemente reduzir a participação do óleo de soja na cadeia produtiva, além de aumentar os ganhos do processo.

Além dos lipídeos, algumas leveduras são capazes de produzir carotenoides, que são substâncias utilizadas na indústria alimentícia, para enriquecer e dar coloração a alimentos, na indústria farmacêutica, devido a suas propriedades benéficas para o tratamento e prevenção de algumas doenças, e em outros setores como o de fabricação de rações. Dessa forma a produção de carotenoides associada à de lipídeos pode tornar esse processo mais competitivo e possibilitar o estabelecimento de plantas industriais mais viáveis.

Pelo fato da produção de lipídeos e carotenoides por leveduras se tratar de um processo aeróbio, a disponibilidade de oxigênio exerce grande influência sobre a eficiência do cultivo, sendo de fundamental importância o estabelecimento de condições adequadas, que permitam elevar a efetividade do processo para torná-lo mais competitivo em relação a outras fontes desses metabólitos.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da disponibilidade de oxigênio sobre o processo de produção de lipídeos e carotenoides por leveduras oleaginosas utilizando glicerol como substrato, aplicando como principal fator para otimização do processo o k_La .

2 Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da disponibilidade de oxigênio na produção de carotenoides e lipídeos pela levedura *Rhodotorula glutinis* NRRL-Y-12905 e estabelecer condições de cultivo que maximizem a obtenção de tais produtos em biorreatores de agitação pneumática.

2.2 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo principal deste trabalho estabeleceu-se que os seguintes objetivos específicos devem ser alcançados:

- Determinar a influência de condições operacionais sobre o k_La em frascos agitados;
- Avaliar a influência do k_La e da concentração de glicerol sobre a produção de células, carotenoides e lipídeos em cultivos realizados em frascos agitados;
- Selecionar o tipo de dispersor e reator de agitação pneumática que possibilite a maior transferência de oxigênio para o meio de cultivo;
- Estabelecer condições de k_La e concentração de glicerol para cultivos em biorreatores de agitação pneumática, que possibilitem maximizar a produção de lipídeos e carotenoides pela levedura.

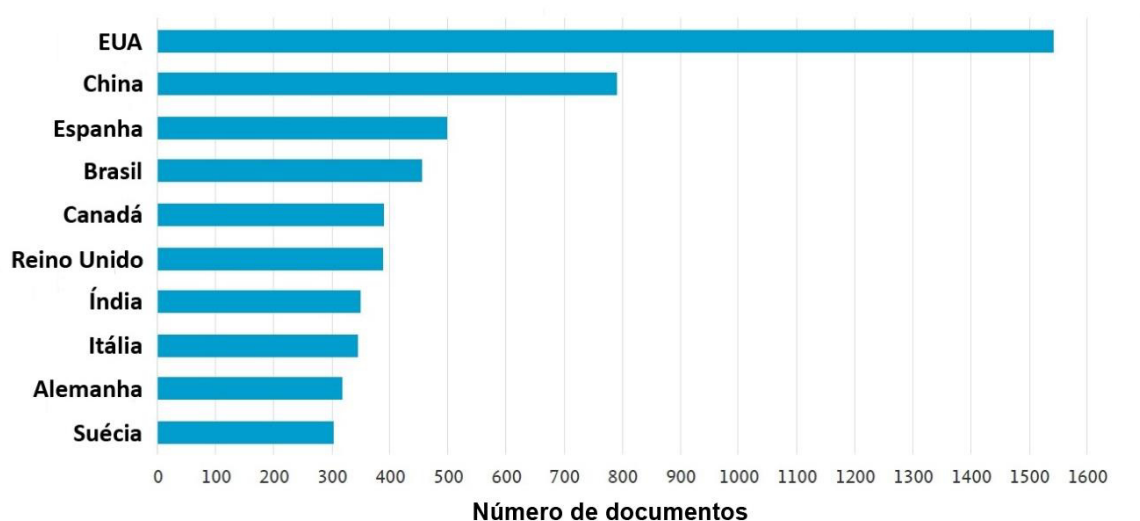
3 Revisão bibliográfica

3.1 Biorrefinarias e produção de biodiesel

A Agência Internacional de Energia (2016) define o biorrefino como o processamento sustentável de biomassa em produtos de base biológica como alimentos, produtos químicos, biocombustíveis e outros elementos, sendo que segundo EMBRAPA (2011), uma biorrefinaria utiliza em seus processos diversas rotas como as bioquímicas, microbianas, químicas e termoquímicas para converter a biomassa em tais produtos.

A EMBRAPA (2011) explica ainda que na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, as biorrefinarias compõem uma parte da agenda de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I), explicando ainda que o desenvolvimento de tais instalações pode representar um grande potencial econômico para o Brasil, citando perspectivas como a geração de empregos e a conquista de mercados externos. Reforçando o interesse em biorrefinarias de determinadas nações é apresentado na Figura 1 um levantamento dos países que apresentaram maior número de publicações com o termo “Biorefinery” no período de 2009 a 2019.

Figura 1- Levantamento realizado na plataforma Scopus sobre os países com maior número de publicações contendo o termo “Biorefinery” no período de 2009 a 2019.



Fonte: Próprio autor.

Como pode ser notado, o Brasil se encontra em uma colocação relevante no levantamento, ocupando a 4ª posição, sendo precedido somente por Estados Unidos, China e Espanha. Observa-se ainda que os Estados Unidos, que ocupam a 1ª colocação, apresentam um número de publicações que corresponde a quase o dobro da China, que é a segunda colocada.

Uma visão semelhante de potencial das biorrefinarias pode ser vista no panorama setorial 2030 do BNDES (2018) que considera que a maior promessa para o futuro do segmento industrial de papel e celulose do Brasil consiste na aplicação do conceito de biorrefinarias integradas às instalações de produção de celulose, ressaltando também que em âmbito global, empresas européias e americanas desse setor já se destacam na pesquisa relativa às biorrefinarias.

Tratando-se de investimentos em biorrefinarias pode-se destacar o divulgado pelo *Office of Energy Efficiency & Renewable Energy* (2019), que reporta que no ano de 2017 o Departamento de Energia dos Estados Unidos selecionou 8 projetos para negociação de financiamentos até um valor total de US\$ 15 milhões, visando a otimização de biorrefinarias integradas. A fonte ainda apresenta um mapa interativo com os projetos de biorrefinaria financiados pelo *Bioenergy Technologies Office*, que é apresentado na Figura 2.

Figura 2- Mapa com os projetos de biorrefinarias financiadas pelo *Bioenergy Technologies Office* (EUA).

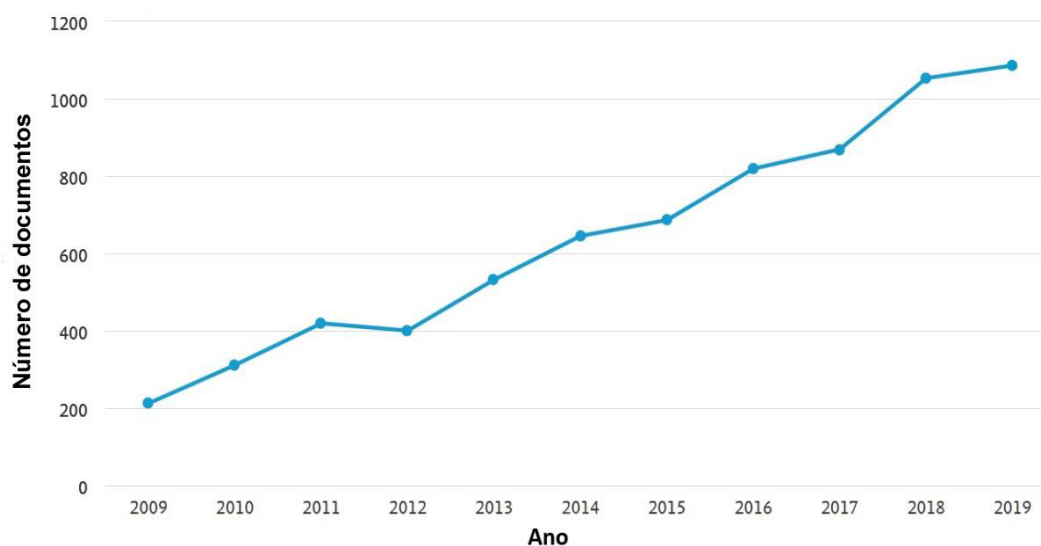


Fonte: Adaptado de *Office of Energy Efficiency & Renewable Energy* (2019).

Na Figura 2 é possível verificar que os projetos financiados pelo *Bioenergy Technologies Office* se encontram distribuídos ao longo de todo o território dos Estados Unidos e que uma parcela relevante destes já foi concluída.

As pesquisas envolvendo biorrefinarias no mundo vem crescendo nos últimos anos, como pode ser observado na Figura 3, que apresenta um levantamento do número de publicações contendo o termo “Biorefinery” no período de 2009 a 2019.

Figura 3- Levantamento realizado na plataforma Scopus sobre o número de publicações por ano envolvendo o termo “Biorefinery” no período de 2009 a 2019.



Fonte: Próprio autor.

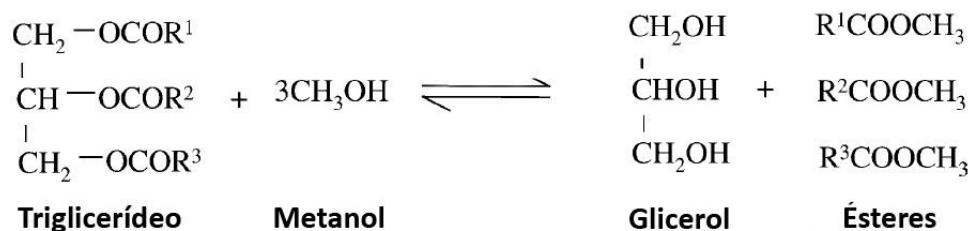
Pode-se notar o evidente crescimento na pesquisa sobre biorrefinarias nos últimos 10 anos, sendo que o número de publicações aumentou em mais de 5 vezes, subindo de aproximadamente 200 documentos em 2009 para mais de 1000 em 2019.

Em seu trabalho Severo *et al.* (2019) discorrem sobre dois grupos de biorrefinarias: As Consolidadas e as Emergentes. Os autores explicam que o primeiro grupo utiliza diretamente matérias primas como amido, açúcar, óleos vegetais e gorduras animais para produção de biocombustíveis. Tratando-se especificamente da produção de biodiesel em biorrefinarias baseadas em lipídeos o processo utilizado por essas unidades é a transesterificação de biomassa rica em óleo.

Atabani *et al.* (2012) explicam que dentre os métodos de produção de biodiesel a transesterificação é considerado o melhor, uma vez que é um processo simples e de baixo custo. Meher, Vidya Sagar e Naik (2006) explicam que a transesterificação

de triglicerídeos gera como produtos ésteres alquílicos de ácidos graxos e glicerol, sendo que durante esse processo diglicerídeos e monoglicerídeos são gerados como intermediários. Os autores apresentam ainda um mecanismo genérico dessa reação, que é apresentado na Figura 4.

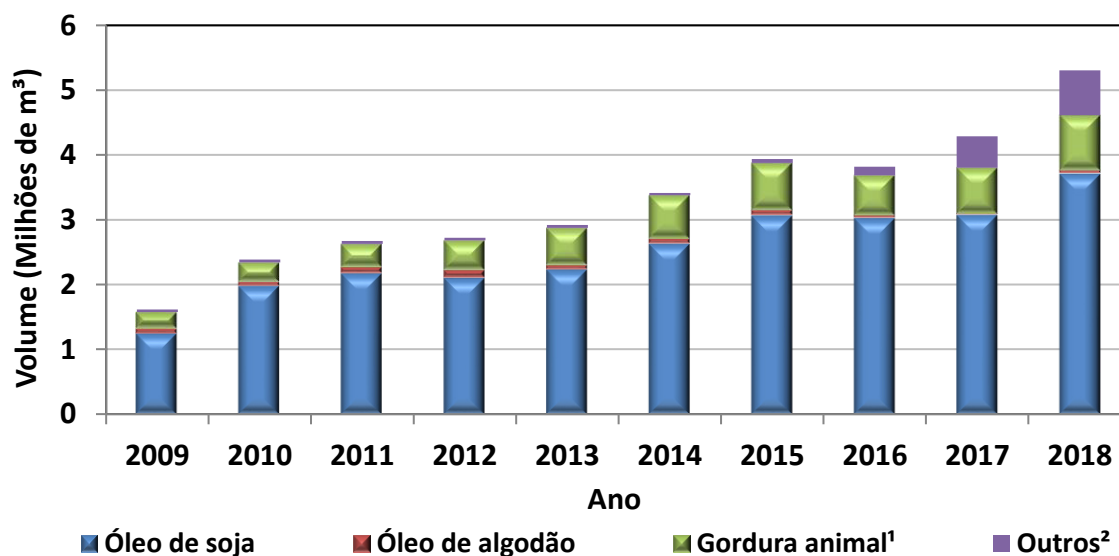
Figura 4- Mecanismo genérico da reação de transesterificação de triglicerídeos.



Fonte: Modificado de Meher, Vidya Sagar e Naik (2006).

Abordando especificamente a produção de biodiesel no Brasil a ANP (2019) expõe que a matéria prima mais utilizada para produção deste biocombustível é o óleo de soja, como pode ser observado na Figura 5, que apresenta uma relação dos tipos de matéria-prima utilizados para produção de biodiesel no período de 2009 a 2018.

Figura 5- Matérias primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil no período de 2009 a 2018.



Nota: 1 Inclui gordura bovina, de frango e de porco; 2 Inclui óleo de palma, óleo de amendoim, óleo de nabo-forrageiro, óleo de girassol, óleo de mamona, óleo de sésamo, óleo de canola, óleo de milho, óleo de fritura usado e outros materiais graxos.

Fonte: ANP (2019).

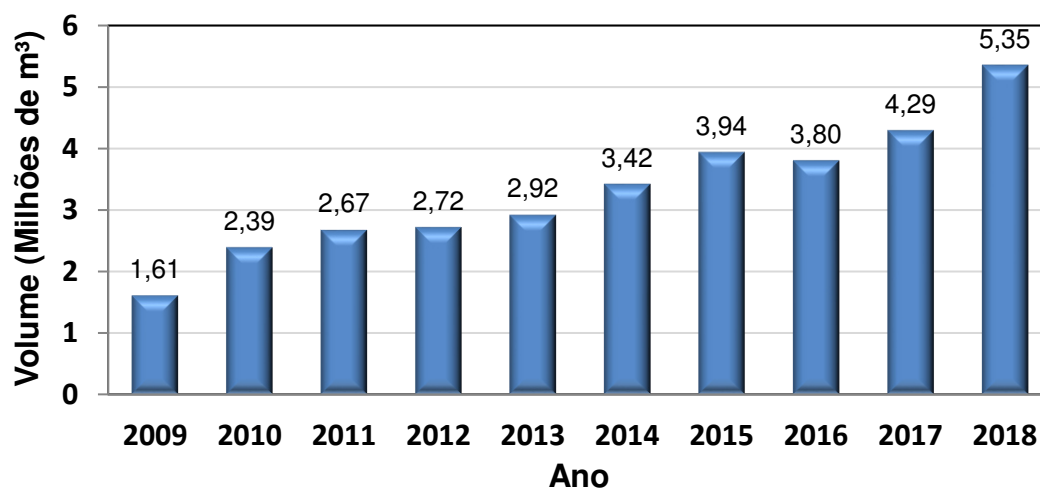
Sobre as biorrefinarias emergentes Severo *et al.* (2019) explicam que tratando-se da produção de biodiesel destacam-se como fontes de matéria prima os óleos de pinhão manso, microalgas, leveduras oleaginosas e de lodos ativados. Jin *et al.* (2015) explicam que microrganismos oleaginosos são aqueles capazes de acumular mais de 20% de seu peso seco na forma de lipídeos, principalmente como triacilglicerídeos e ácidos graxos. Os autores citam ainda que, em um levantamento bibliográfico por eles realizado, dentre as leveduras, alguns gêneros apresentam teores de lipídeos variando de 58% a 72% de seu peso seco.

Tratando-se de leveduras oleaginosas, Severo *et al.* (2019) citam que estes microrganismos são atrativos para a produção de biodiesel devido à sua capacidade de converter carboidratos em lipídeos, o que vai ao encontro do exposto por Kumar *et al.* (2017) que apresentam motivos como a alta capacidade de crescimento em biorreatores convencionais e a utilização de subprodutos industriais como meio de crescimento para justificar o interesse no uso de tais microrganismos para produção de biocombustíveis.

3.2 Glicerol: Coproduto e substrato

O glicerol é o principal coproduto do processamento do biodiesel, sendo gerado em uma proporção de 10% do volume total de biocombustível produzido (RIVALDI, 2012). No caso do Brasil a produção de biodiesel vem crescendo nos últimos anos, conforme exposto na Figura 6, que apresenta a produção deste biocombustível no país no período de 2009 a 2018, sendo que neste último ano a geração deste biocombustível foi de 5,35 milhões de m³.

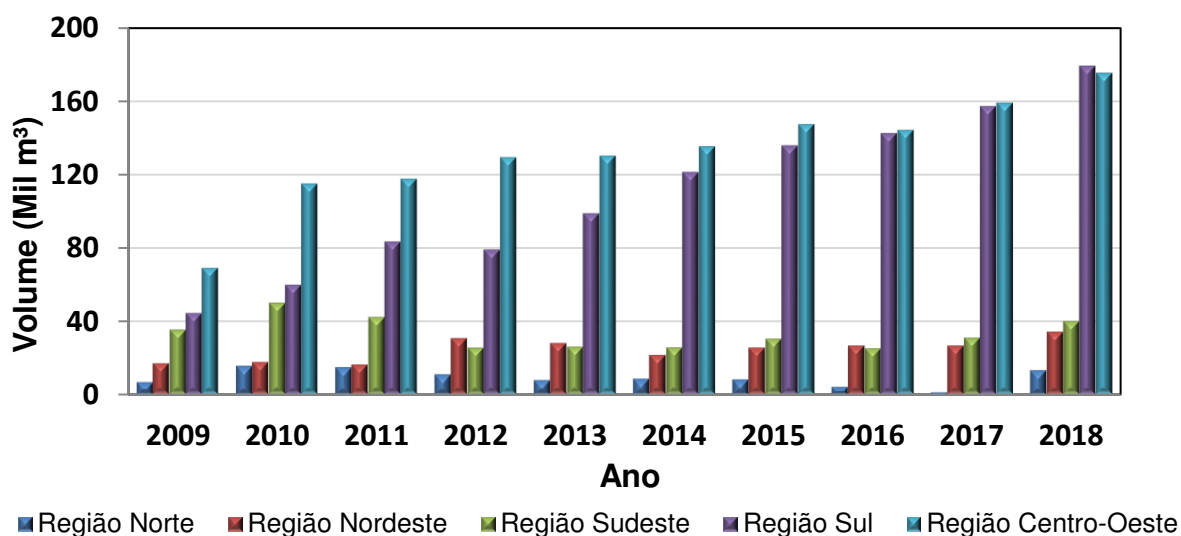
Figura 6- Produção de biodiesel no Brasil no período de 2009 a 2018.



Fonte: ANP (2019).

Conseqüentemente, a produção de glicerol, derivado da produção do biodiesel, também aumentou no mesmo período, como fica evidenciado na Figura 7 que apresenta a produção deste coproduto em sua forma não purificada, denominada glicerina, por região do Brasil entre os anos de 2009 e 2018, sendo que neste último ano a produção nacional foi de aproximadamente 440 Mil m³.

Figura 7- Produção de glicerina oriunda da produção do biodiesel nas regiões do Brasil no período de 2009 a 2018.

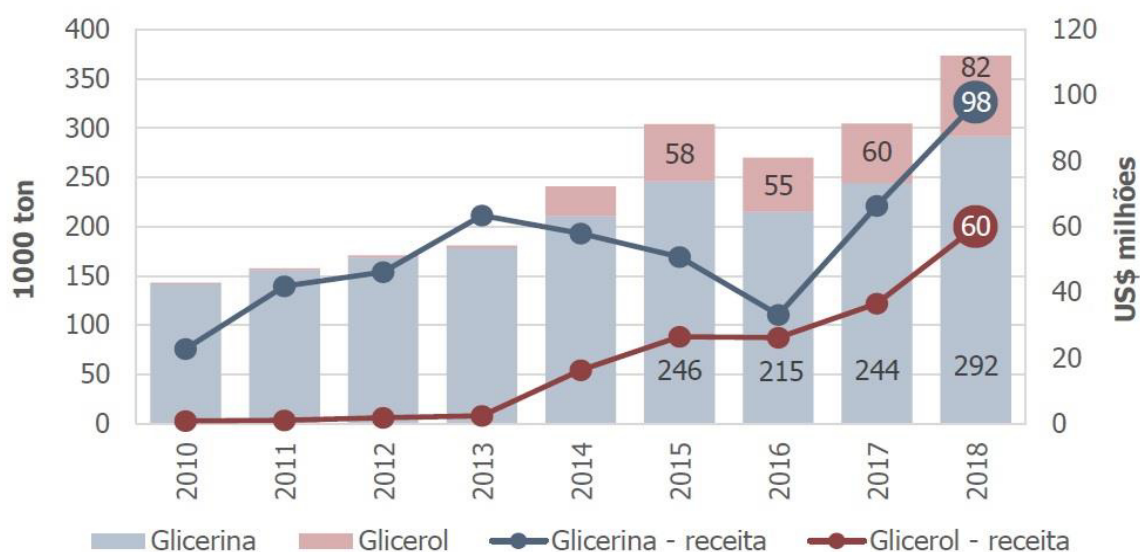


Fonte: ANP (2019).

Peiter *et al.* (2016) citam que o aumento da produção de glicerol a partir do processo de fabricação de biodiesel criou um excesso deste composto no mercado e afirmam que para evitar problemas futuros com seu acúmulo e também para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, faz-se necessário o desenvolvimento de novas aplicações para este coproduto.

Atualmente um dos destinos do glicerol gerado na produção do biodiesel no Brasil é a exportação, sendo que a EPE (2019) apresenta dados relativos às transações deste coproduto em sua forma não purificada (glicerina) e purificada (glicerol) para o ano de 2018. A fonte cita que no ano em questão foram produzidas cerca de 500 mil toneladas de glicerina, das quais 292 mil foram exportadas, sendo a China o maior consumidor. Já o glicerol somou um total de 82 mil toneladas exportadas. A tendência desse mercado pode ser vista na Figura 8, que apresenta, além dos volumes exportados, as receitas geradas com tais transações.

Figura 8- Volumes e receitas de exportação de glicerina bruta e glicerol no período de 2010 a 2018.



Fonte: EPE (2019).

No entanto Peiter *et al.* (2016) explicam que a purificação da glicerina apresenta um custo excessivamente alto para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel, o que vai ao encontro do exposto por Santos (2009) que explica que o elevado custo de manipulação e tratamento de efluentes de glicerol estimulam a busca por alternativas tecnológicas para a aplicação deste produto e ressalta que a

conversão do glicerol por via biotecnológica constitui uma interessante alternativa para seu aproveitamento.

Santos (2009) cita ainda que o glicerol é encontrado naturalmente em componentes estruturais de uma série de lipídeos e que vários microrganismos podem utilizá-lo como fonte de carbono, tornando então possível a substituição de compostos tradicionais, como carboidratos, por esse composto em cultivos microbianos.

Tratando-se de meios de cultivo, Freitas *et al.* (2014) citam que a viabilidade econômica de processos de produção de biomassa microbiana é limitada pelo custo do meio de fermentação. Os autores explicam ainda que essa variável pode representar quase 30% do custo total de produção, e que em virtude disso o uso de matérias-primas alternativas, de baixo custo, torna-se uma condição de especial interesse em processos bioquímicos industriais.

O emprego do glicerol para cultivos microbianos apresenta vantagens, como as reportadas por Castelo Branco (2015), que relata que essa substância, além de ser barata e abundante, possui maior grau de redução que os açúcares, tornando possível a obtenção de produtos químicos reduzidos, como o succinato, o etanol e o xilitol, a rendimentos superiores aos obtidos com emprego de açúcares como substrato.

3.3 Leveduras oleaginosas e seus metabólitos de interesse

Borzani *et al.* (2001) citam que as leveduras são fungos e explicam que estes são seres eucariontes, heterotróficos e geralmente unicelulares, que assumem formas esféricas, elípticas ou filamentosas, com tamanhos que variam de 1 a 5 μm de diâmetro e 5 a 30 μm de comprimento. Os autores falam ainda sobre as células das leveduras, citando entre outros pontos que estas possuem uma parede celular rígida que lhes confere resistência as pressões osmóticas e mecânicas.

Adrio (2017) explica que devido a algumas características das leveduras como sua morfologia unicelular, curtos tempos de duplicação, capacidade de crescimento em uma grande variedade de matérias-primas e fácil cultivo em fermentadores tornam estes microrganismos vantajosos para produção de lipídeos perante outros como as microalgas e fungos filamentosos.

Freitas *et al.* (2014) comparam as leveduras com as microalgas em processos voltados para a produção de lipídeos e citam que as leveduras apresentam maior

produtividade tanto em biomassa quanto em teor lipídico, além de não apresentarem dependência de fatores ambientais, como luminosidade e clima. Na Tabela 1 é apresentada uma comparação entre as produtividades de lipídeos gerados por leveduras e microalgas em diferentes estudos.

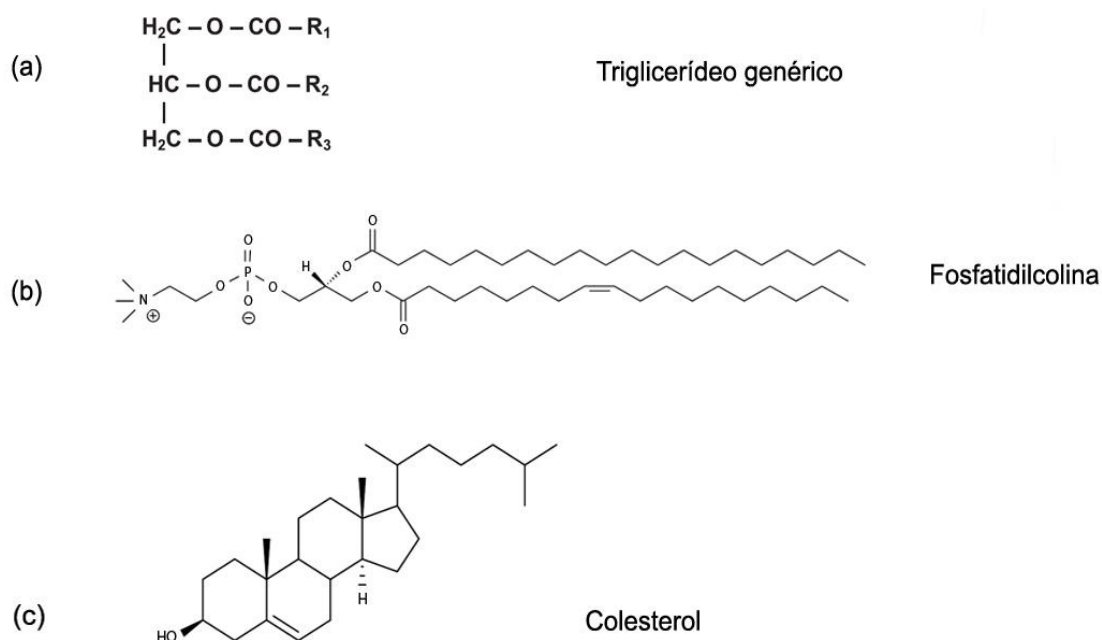
Tabela 1- Comparação entre as produtividades de lipídeos gerados por leveduras e microalgas em diferentes estudos.

Microrganismo	Espécie	Produtividade (g/L.d)	Referência
Microalga	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,011	Cao <i>et al.</i> (2017)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	0,147	Feng, Li e Zhang (2011)
Levedura	<i>Rhodotorula glutinis</i>	1,3	Ferreira (2019)
	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	0,738	Tchakouteu <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Cao *et al.* (2017); Feng, Li e Zhang (2011); Ferreira (2019); Tchakouteu *et al.* (2015).

Segundo a definição de Pelczar, Chan e Krieg (1997) o grupo dos lipídeos é constituído por substâncias orgânicas solúveis em solventes apolares e formadas majoritariamente por átomos de carbono e hidrogênio. Essas substâncias podem ser classificadas em três categorias de maior significância de acordo com suas estruturas, sendo estas os triglicerídeos, os fosfolipídeos e os esteróis. A representação estrutural de tais grupos é apresentada na Figura 9.

Figura 9- Estrutura de um triglicerídeo genérico (a), de um fosfolípídeo (b) e de um esteroide (c).



Fonte: MERTINS (2004); FERRARI *et al.*(2004); FRANÇA *et al.* (2014).

Béligon *et al.* (2015) citam que os lipídeos produzidos por microrganismos oleaginosos são armazenados como triglicerídeos, sendo seu perfil de ácidos graxos semelhante ao dos óleos vegetais. Os autores explicam que essa semelhança torna os óleos microbianos uma interessante alternativa para substituição dos óleos vegetais.

Probst *et al.* (2016) explicam que os lipídeos produzidos por leveduras oleaginosas podem ser utilizados como óleos comestíveis ou para fabricação de diversos produtos oleoquímicos. Apesar da possibilidade os autores citam que sua utilização para este último fim está em seus primeiros estágios e que os lipídeos microbianos só tem sido efetivamente comercializados no caso da produção de óleos especiais contendo ácidos graxos poliinsaturados para as indústrias de alimentos e suplementos.

Dias *et al.* (2019) falam sobre a utilização de lipídeos produzidos por leveduras para a produção de biodiesel, explicando que o custo para a produção deste biocombustível foi estimado em US\$ 2,07 por litro, enquanto o derivado de óleo de palma tem o custo de US\$ 0,66. Os autores concluem que atualmente a produção de biodiesel a partir de matéria-prima microbiana não é economicamente viável, porém citam que o biodiesel fabricado a partir desta fonte apresenta vantagens em relação

ao produzido a partir de culturas vegetais, como não necessitar de uma grande quantidade de terras cultiváveis, que poderiam ser destinadas à produção de alimentos.

Por outro lado, Soccol *et al.* (2017), estudando a produção de biodiesel microbiano utilizando caldo de cana para produção de lipídeos, citam que o combustível produzido por este processo é economicamente viável, apresentando um custo de US\$ 0,76 por litro, inferior aos US\$ 0,81 por litro estimados para o biodiesel com matéria prima de origem vegetal. Os autores explicam ainda que o rendimento por hectare do biodiesel microbiano é de 4172 L/ha de cana de açúcar, enquanto o do biodiesel produzido a partir de óleo de soja é de 661 L/ha.

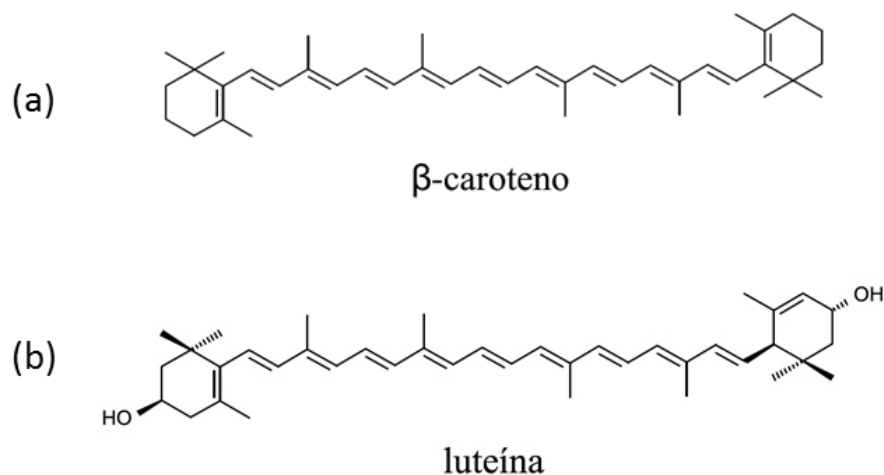
Jingyang *et al.* (2016) apresentam ainda algumas vantagens para a produção microbiana de óleos, perante a produção vegetal, como um tempo mais curto de produção e adaptabilidade do cultivo a vários recursos renováveis como a biomassa lignocelulósica e resíduos industriais.

Adrio (2017) cita alguns exemplos de leveduras oleaginosas como *Yarrowia lipolytica*, *Rhodospiridium toruloides*, *Trichosporon fermentans* e *Cryptococcus curvatus*, enquanto Dias *et al.* (2019) discorrem sobre algumas cepas de leveduras oleaginosas como *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Sporobolomyces roseus*, *Phaffia Rhodozima* e *Sporobolomyces ruberrimus* que produzem também carotenoides como β -caroteno, toruleno e astaxantina.

Os carotenoides são um grupo de compostos orgânicos, em sua maioria com quarenta carbonos. Essas substâncias se apresentam na forma de moléculas lineares, simétricas e que contém um longo sistema de duplas ligações conjugadas (SILVA *et al.*, 2010). Esse sistema de duplas ligações é responsável por características como sua alta reatividade química e absorção de luz, sendo necessárias, aproximadamente, sete duplas ligações conjugadas para que o carotenoide apresente coloração (BARBATO, 2014).

Segundo Botella-Pavía e Rodríguez-Concepción (2006) os carotenoides podem ser classificados em duas classes. A primeira são os chamados carotenos, grupo constituído por hidrocarbonetos lineares, como o β -caroteno, apresentado na Figura 10 (a). A segunda são as xantofilas, grupo constituído por derivados oxigenados dos carotenos, como a luteína, apresentada na Figura 10 (b).

Figura 10- Estrutura química do β -caroteno (a) e da luteína (b).



Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN (2008).

Os carotenoides possuem uma grande gama de aplicações industriais como, por exemplo, na indústria alimentícia, de cosméticos, farmacêutica e rações. Essas substâncias são utilizadas como corantes, agentes para o enriquecimento de alimentos e em outros processos onde sua atividade pró-vitamina A e suas funções benéficas à saúde sejam desejadas (BARBATO, 2014).

Mesquita, Teixeira e Servulo (2017) apresentam dados comerciais referentes ao período de 2010 a 2015, em que o Brasil importou um total de 861.908 kg de carotenoides, movimentando US\$ 11.859.268 e exportou 11.109 kg o que correspondeu a US\$ 505.186.

Os carotenoides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas e algas. Todavia, existe um interesse crescente em utilizar compostos produzidos naturalmente, obtidos por processos biotecnológicos, em alimentos, ao invés de compostos sintetizados quimicamente. Além da conotação natural, os produtos gerados em processos bioquímicos, podem ser obtidos em curtos espaços de tempo e em qualquer época do ano (VALDUGA *et al.*, 2009). Todavia, a principal restrição para a produção comercial de carotenoides por rotas bioquímicas é o alto custo envolvido com o processo (MALDONADE; SCAMPARINI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007).

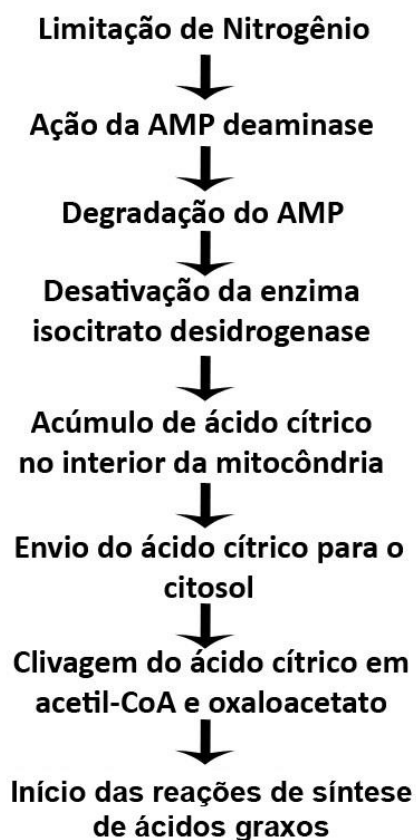
3.4 Biossíntese de carotenoides e lipídeos

Kot *et al.* (2016) explicam que, tratando-se de leveduras, a síntese de lipídeos pode ocorrer por duas vias, sendo a primeira delas a denominada “de novo” em que sacarídeos ou glicerol são os substratos utilizados para a produção de lipídeos. A segunda via é chamada “ex novo” e nesta compostos hidrofóbicos servem como substrato.

Papanikolaou e Aggelis (2011) citam que os lipídeos microbianos produzidos na via “ex novo” apresentam menores quantidades de triglicerídeos em comparação aos produzidos pela via “de novo”. Os autores explicam ainda que esta última via é um processo bioquímico anabólico em que o acetil-CoA emitido pelo metabolismo celular intermediário gera ácidos graxos, que são então esterificados com glicerol gerando lipídeos e que as reações envolvidas podem ser divididas em duas partes distintas: o metabolismo celular intermediário e a biossíntese de triglicerídeos. Entretanto, Severo *et al.* (2019) expõem que o mecanismo de acumulação de lipídeos nos microrganismos oleaginosos ainda não foi bem elucidado. Os autores explicam ainda que esse processo é semelhante na maioria das espécies, o que vai ao encontro do exposto por Rossi *et al.* (2011) que relatam que a via bioquímica da síntese lipídica não é muito diferente entre os organismos eucarióticos e que não apresenta diferenças entre os fungos oleaginosos e não oleaginosos.

Apesar disso, Papanikolaou e Aggelis (2011) esclarecem que o acúmulo de lipídeos pela via “de novo” já foi completamente elucidado na condição em que o nitrogênio extracelular é um fator limitante para o crescimento. Segundo os autores a primeira etapa desse processo pode ser descrita de forma simplificada de acordo com o apresentado na Figura 11.

Figura 11- Primeira etapa do processo de acúmulo de lipídeos por microrganismos oleaginosos.



Fonte: Adaptado de Papanikolaou; Aggelis (2011).

Jin *et al.* (2015) e Papanikolaou e Aggelis (2011) explicam o processo de acúmulo de lipídeos nos microrganismos oleaginosos, que é iniciado quando ocorre a limitação de um dos nutrientes do meio, tipicamente o nitrogênio. Sob restrição deste elemento, necessário para síntese de material celular, a enzima AMP deaminase é regulada positivamente e decompõe o Adenosina Monofosfato (AMP) intracelular para liberar amônia para as células privadas de nitrogênio.

O AMP é cofator da enzima isocitrato desidrogenase e a redução da concentração do primeiro composto gera como consequência a perda da atividade da enzima, cuja função é transformar o ácido isocítrico em α -cetoglutarato no ciclo de Krebs. O ciclo é então interrompido em ácido isocítrico, que é acumulado no interior da mitocôndria, gerando por equilíbrio ácido cítrico. Quando a concentração deste último atinge um valor crítico no interior da mitocôndria, ocorre a transferência deste composto para o citosol.

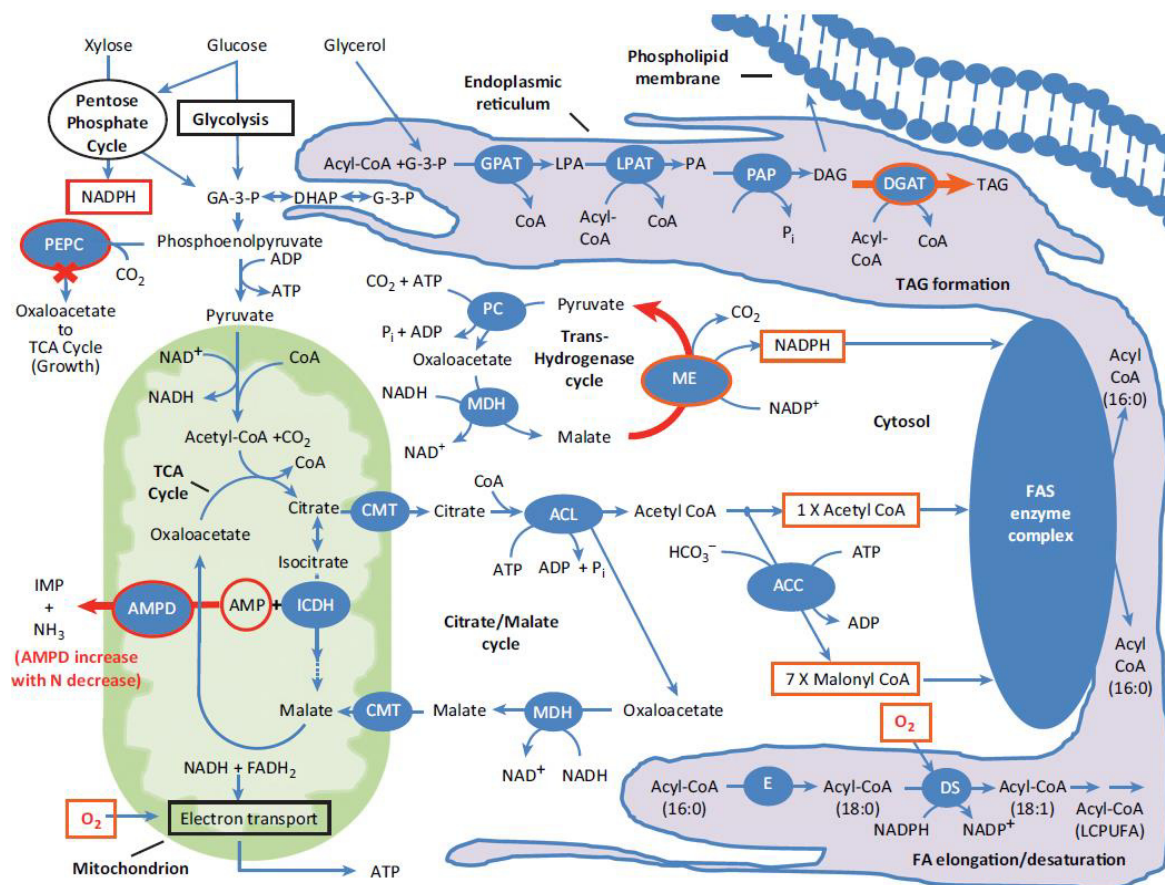
O ácido cítrico é então clivado pela ATP-citrato liase (ATP-CL), que converte este composto em acetil-CoA e oxaloacetato. Este último composto é convertido em malato, que pode ser translocado para a mitocôndria ou convertido em piruvato com a produção de NADPH e CO₂, enquanto o acetil-CoA gerará os ácidos graxos celulares. Neste ponto encerram-se as reações classificadas por Papanikolaou e Aggelis (2011) como pertencentes a primeira etapa do acúmulo de lipídeos, denominada metabolismo celular intermediário.

Papanikolaou e Aggelis (2011) explicam que na segunda etapa do processo de acúmulo de lipídeos por microrganismos oleaginosos a primeira reação a ocorrer é a conversão do acetil-CoA em malonil-CoA, catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase, ressaltando que essa reação é considerada a etapa restritiva da biossíntese de ácidos graxos. Após a geração de malonil-CoA, um complexo multienzimático de enzimas de síntese de ácidos graxos converte malonil-CoA, acetil-CoA e NADPH em ésteres acil-CoA.

Os autores explicam que para que os lipídeos sejam armazenados na forma de triglicerídeos, as moléculas formadas na etapa anterior são enviadas para a denominada via de acilação de fosfato α -glicerol. A primeira reação a ocorrer é a acilação do glicerol-3-fosfato na posição sn-1, pela enzima G-3-P aciltransferase, gerando 1-acil-G-3-P, denominado ácido lisofosfatídico (LPA). Esta molécula por sua vez sofre uma nova acilação, catalisada pela enzima aciltransferase de ácido lisofosfatídico, que atua na posição sn-2, gerando uma molécula de ácido fosfatídico (PA).

Papanikolaou e Aggelis (2011) citam que o ácido fosfatídico é então desfosforilado pela ação da enzima fosfo-hidrolase de ácido fosfatídico, formando diacilglicerol, que finalmente é acilado e convertido em triacilglicerol pela ação da enzima diacilglicerol aciltransferase ou pela fosfolipídio diacilglicerol aciltransferase. As reações citadas por Papanikolaou e Aggelis (2011) são apresentadas na Figura 12, que apresenta uma ilustração das vias de produção de triglicerídeos.

Figura 12- Ilustração das vias celulares para produção de triglicerídeos.



Fonte: Jin *et al.* (2015).

Os carotenoides são produzidos naturalmente por plantas em tecidos fotossintéticos e não fotossintéticos, atuando em atividades como a captação de luz, foto-proteção, precursão de componentes voláteis e corantes, conferindo as cores amarela, laranja e vermelha a muitos vegetais (KOTIKOVA *et al.* 2016; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004). Os microrganismos também são capazes de produzir carotenoides, sejam estes fotossintetizantes, como algas e cianobactérias, ou não fotossintetizantes, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (CABRAL, 2010).

Os animais e seres humanos não são capazes de produzir carotenoides, entretanto esses compostos tem importante papel na saúde humana, uma vez que existem indícios de que tais substâncias protegem as células contra espécies reativas de oxigênio e radicais livres, previnem a degradação da retina, queimaduras solares, câncer de fígado, melhoram o sistema imunológico e possuem atividade pró-vitamina A (KOTIKOVA *et al.* 2016).

Mata-Gómez *et al.* (2014) explicam que a rota biossintética de produção de carotenoides por leveduras envolve basicamente 3 etapas. A primeira delas se inicia com a conversão de acetil-CoA em 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), catalisada pela enzima HMG-CoA sintase. O HMG-CoA é convertido em ácido mevalônico, que posteriormente é fosforilado e descarboxilado, sendo convertido em isopentenil pirofosfato (IPP).

Na segunda etapa descrita por Mata-Gómez *et al.* (2014) o isopentenil pirofosfato é isomerizado, formando dimetilail pirofosfato (DMAPP). Através da ação da enzima prenil transferase três moléculas de IPP são ligadas ao DMAPP, formando uma molécula de geranyl geranyl pirofosfato (GGPP). Ocorre então a união de duas moléculas de GGPP para a formação de fitoeno, a primeira molécula de 40 carbonos dessa via, que posteriormente é dessaturado para formar licopeno.

Segundo Mata-Gómez *et al.* (2014) na terceira etapa da via ocorrem as reações necessárias para a formação dos diversos tipos de carotenoides a partir da molécula de licopeno, o que vai ao encontro ao exposto por Avalos e Limón (2015) que explicam que a partir desse modelo básico, diferentes modificações podem ser realizadas, resultando nos diversos tipos de carotenóides encontrados na natureza.

Tratando-se da produção de lipídeos, Rossi *et al.* (2011) citam que o acúmulo deste metabólito em leveduras oleaginosas ocorre quando um dos nutrientes do meio fica limitado e a fonte de carbono está em excesso, destacando que a limitação de nitrogênio é a condição mais eficiente para induzir a lipogênese.

Existem ainda outros fatores que podem influenciar no acúmulo de lipídeos por leveduras como, por exemplo, a disponibilidade de oxigênio, a temperatura e o pH. A faixa de trabalho escolhida para essas duas últimas variáveis pode afetar o metabólito produzido pelo microrganismo, sendo que uma faixa ótima para o controle de temperatura fica entre 20 e 30 °C (BENTO, 2017).

Silva (2014a) explica que uma das condições mais importantes para a produção de lipídeos e carotenoides por leveduras é a relação entre carbono e nitrogênio (C/N). O autor apresenta resultados em que uma alta relação C/N, ou seja, a restrição de nitrogênio, favoreceu a formação de lipídeos. A produção de carotenoides em tais condições também foi elevada em alguns dos dados apresentados, todavia o autor ressalta que os resultados obtidos são dependentes da cepa de microrganismo utilizada.

Yen *et al.* (2015) avaliaram os efeitos do tipo de fornecimento de substrato realizada em um biorreator *Air-lift* de 50 L sobre a produção de lipídeos e carotenoides pela levedura *Rhodotorula glutinis*. Esse fator está diretamente relacionado a inibição por substrato e os resultados apresentados pelos autores demonstraram que uma injeção pontual de todo o volume de glicerol gerou as maiores produções de ambos os metabólitos de interesse.

Mata-Gómez *et al.* (2014) ressaltam também algumas das variáveis que influenciam a produção de carotenoides como a incidência de luz, que apresenta efeito positivo sobre a produção deste metabólito, a presença de íons metálicos, como Fe, Zn e Co, e a disponibilidade de oxigênio.

3.5 Disponibilidade de oxigênio e reatores de agitação pneumática

Garcia-Ochoa e Gomez (2009) explicam que a maioria dos processos microbianos industriais é aeróbia e que nesses cultivos o oxigênio é uma importante substância utilizada pelos microrganismos para o crescimento, manutenção e produção de metabólitos, citando ainda que a escassez de oxigênio afeta o desempenho de tais processos.

Schimidell *et al.* (2001) explicam a função bioquímica do oxigênio em cultivos microbianos citando que este elemento é o último a aceitar elétrons ao final da cadeia respiratória, sendo então reduzido a água e permitindo que ocorram reações como a reoxidação de coenzimas que participam da glicólise e do ciclo de Krebs. Os autores citam também que o oxigênio participa das reações que permitem o armazenamento de energia pela conversão de moléculas de ADP para ATP, que serão posteriormente utilizadas em atividades celulares como a síntese de moléculas, o surgimento de novas células e o processo de proliferação da biomassa microbiana.

Schimidell *et al.* (2001) ainda explicam que um cultivo eficiente, que ocorre com elevadas velocidades de crescimento celular, está atrelado não somente a altas velocidades de consumo de carbono, necessário para que exista abundância de elétrons para serem transportados na cadeia respiratória, mas também a necessidade de oxigênio com a finalidade de aceitar tais elétrons ao final desta cadeia. Os autores afirmam ainda que a extensão de um processo descontínuo aeróbio e conseqüentemente a obtenção de elevadas concentrações do produto desejado

dependem da capacidade do sistema de transferir O₂ para o meio e explicam que em algumas situações a capacidade de transferência de oxigênio pode ser o fator que definirá as condições operacionais de um processo.

Cerri (2009) expõe que a transferência de oxigênio é um dos fatores mais críticos em processos aeróbios, explicando que quando requerido pelos microrganismos, esse elemento se torna frequentemente um fator limitante, uma vez que sua solubilidade em água é muito baixa. Corroborando com esta última afirmação Stuaní (2015) cita que em condições típicas de processos aeróbios (pressão ambiente e temperatura de 30 °C) a concentração de oxigênio saturado em água destilada é de 7,5 mg/L, o que, segundo Cerri (2009), pode ser consumido em alguns segundos em cultivos com altas concentrações celulares.

Garcia-Ochoa e Gomez (2009), além de afirmarem sobre a importância de garantir um adequado fornecimento de oxigênio para o meio de cultivo, citam que a estimativa da taxa de transferência de oxigênio é de fundamental importância para a seleção, projeto e ampliação de biorreatores. A taxa de transferência de oxigênio em biorreatores é caracterizada pelo k_La , que é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio. Essa variável pode ser calculada partindo-se da seguinte fórmula (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995):

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C_s}\right) = -k_L a \cdot t$$

Em que:

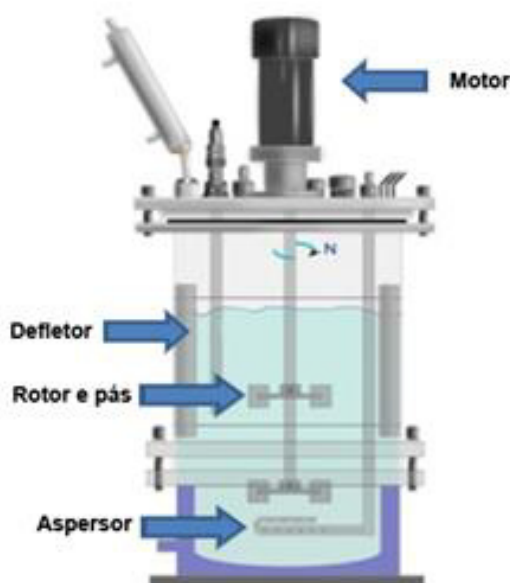
- C: Concentração de O₂ no meio em mmol.L⁻¹;
- C_s: Solubilidade do O₂ no meio, na temperatura avaliada, em mmol.L⁻¹;
- k_La : Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em h⁻¹;
- t: Tempo em h.

Moutafchieva *et al.* (2013) citam que os valores de k_La são afetados por muitos fatores como características geométricas do reator, propriedades do meio e a concentração celular do microrganismo. Os autores ainda citam que a determinação do k_La em um biorreator é essencial para estabelecer sua eficiência de aeração e quantificar os efeitos das variáveis de operação no suprimento de oxigênio.

Nos bioprocessos aeróbios a agitação e a aeração são as variáveis utilizadas para fornecer a quantidade necessária de oxigênio aos meios de cultivo, possibilitando que as demandas celulares e a produção de metabólitos de interesse sejam alcançadas (MENDES, 2016). Najafpour (2007) cita a aeração e a agitação dentre algumas das variáveis das quais depende o desempenho de um biorreator e explica que este equipamento é a parte central de qualquer processo bioquímico no qual enzimas, microrganismos, células animais ou vegetais são utilizados. O autor discorre sobre o assunto e fala principalmente sobre três tipos de biorreatores: Tanque agitado, coluna de bolhas e *Air-lift*.

Thomasi (2010) explica que os biorreatores tipo tanque agitado são equipamentos onde a agitação é realizada por impelidores ligados a um eixo giratório e aerados pela parte inferior do biorreator, citando ainda que a agitação é responsável por funções como promover a transferência de calor, massa e homogeneização. Najafpour (2007) cita algumas das características desse tipo de reator como um menor custo de aquisição, de operação e o fato de que o agitador pode ser acionado pela parte superior ou inferior do equipamento. O autor também explica que esses reatores são equipados com defletores para impedir a formação de vórtices e melhorar a mistura do meio. Uma representação de um reator tipo tanque agitado é apresentada na Figura 13.

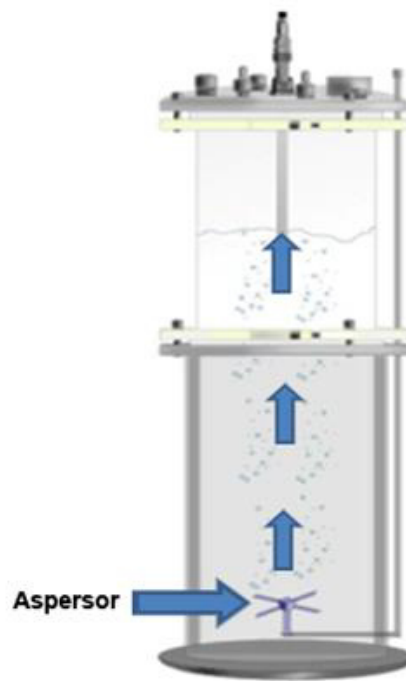
Figura 13- Ilustração de um biorreator tipo tanque agitado e aerado com seus componentes.



Kantarci, Borak e Ulgen (2005) citam que os reatores tipo coluna de bolhas são basicamente recipientes cilíndricos com um aspersor de gás na parte inferior, que dispersa o gás na forma de bolhas no meio, sendo que Najafpour (2007) explica que a hidrodinâmica e a transferência de massa nesse modelo de biorreator dependem do tamanho das bolhas e de como elas são liberadas do aspersor.

Algumas das vantagens dos reatores coluna de bolhas são citadas por Kantarci, Borak e Ulgen (2005), como suas excelentes características de transferência de calor e massa, pouca manutenção e baixos custos operacionais. Os autores explicam ainda que esses equipamentos são utilizados em indústrias como a petroquímica, bioquímica, metalúrgica e química. Uma representação de um biorreator tipo coluna de bolhas é apresentada na Figura 14.

Figura 14- Ilustração de um biorreator tipo coluna de bolhas, com aspersor e sentido de fluxo.

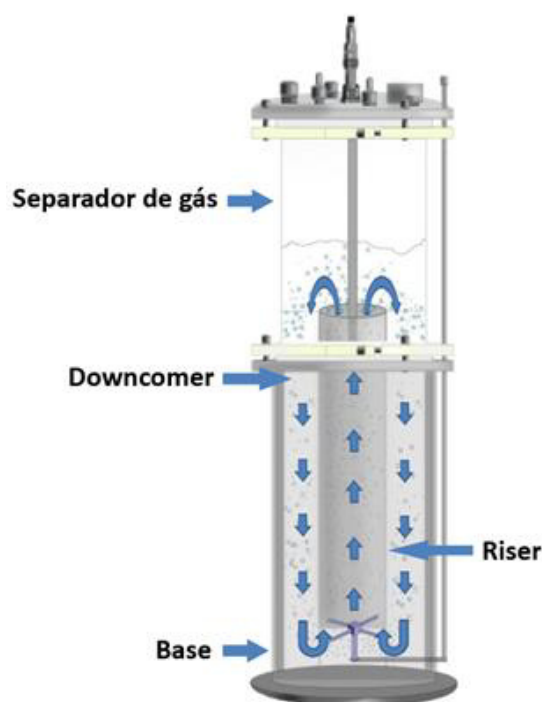


Fonte: Modificado de Mendes (2016).

Os biorreatores *Air-lift* são equipamentos pneumáticos, em que o meio de cultivo é movido de baixo para cima por bolhas de ar injetadas no fundo do equipamento e retorna de cima para baixo por uma região distinta. Nesse tipo de biorreator a dispersão gás-líquido é realizada pelo próprio ar que entra pelo aspersor (CERRI, 2009).

Kadic e Heindel (2014) discorrem sobre a forma construtiva dos biorreatores tipo *Air-lift*. Os autores citam que esses equipamentos são compostos por 4 seções básicas, sendo estas: A região de subida, também chamada de *Riser*; o separador de gás; a região de descida, também denominada de *Downcomer* e a base do reator. A Figura 15 apresenta uma ilustração dessas seções, bem como o sentido de fluxo em cada uma delas.

Figura 15- Ilustração das seções e sentidos de escoamento em um biorreator *Air-lift*.



Fonte: Modificado de Mendes (2016).

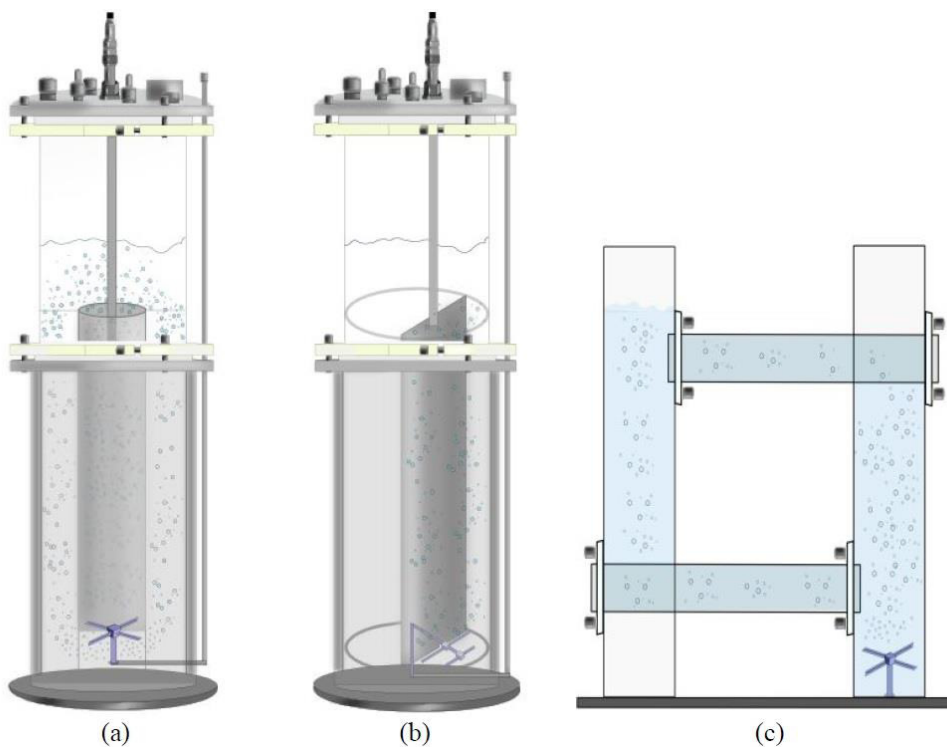
Mendes (2016) explica que o escoamento nos biorreatores *Air-lift*, inicia-se com a aspensão de gás na base do reator. Após a aspensão, a dispersão gás-líquido mantém um escoamento ascendente no *Riser* em virtude da redução da densidade do meio pela presença de uma alta quantidade de gás. O líquido segue em regime ascendente até chegar na região do separador de gás, onde haverá a liberação da maior parte do gás retido, aumentando a densidade do meio e levando-o a um escoamento descendente pelo *Downcomer* até retornar a base do biorreator e reiniciar a circulação. O autor cita ainda que as seções do *Riser* e do *Downcomer* apresentam densidades distintas e que essa diferença é a força motriz para a circulação da fase

líquida no biorreator, explicando que quanto maior for a diferença entre as retenções gasosas do *Riser* e do *Downcomer*, maior será a velocidade de circulação do líquido.

As principais vantagens dos biorreatores tipo *Air-lift* são citadas por Thomasi (2010), sendo estas a boa aeração e homogeneização do meio de cultura e pouco dano mecânico ao material em cultivo. O autor explica ainda que essa classe de equipamentos promove uma alta transferência de oxigênio associada a um baixo consumo de potência e baixas tensões de cisalhamento.

Mendes (2016) explica ainda que os reatores *Air-lift* podem ser classificados de acordo com sua forma construtiva entre reatores de circulação interna e de circulação externa. O autor explica que o primeiro grupo de equipamentos apresenta um anteparo em sua coluna principal, que é responsável por criar os canais que possibilitam o escoamento do meio. Os anteparos mais comumente utilizados são cilindros, nos denominados *Air-lift* de cilindros concêntricos, e as placas nos chamados *Air-lift* tipo *split-cylinder*. Já o segundo grupo de reatores é construído pela união de dois dutos verticais separados por 2 tubos horizontais. Exemplos das três formas construtivas de reatores *Air-lift* são representados na Figura 16.

Figura 16- Formas construtivas dos reatores *Air-lift*: (a) Cilindros concêntricos, (b) *Split-Cylinder* e (c) Circulação externa.



Fonte: Mendes (2016).

4 Materiais e Métodos

4.1 Microrganismo e preparação de inóculo

O microrganismo utilizado neste estudo foi a levedura *Rhodotorula glutinis* NRRL-Y-12905, cedida pelo 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 primeiramente repicou-se a levedura em um tubo de ensaio contendo um meio composto por ágar, glicose, peptona, extrato de levedura e extrato de malte e a mesma foi mantida a 30 °C por 24 h para possibilitar o crescimento celular. Após 24 horas a levedura foi transferida para o meio de crescimento que apresentava a seguinte composição: Glicerol (30,0 g/L), extrato de levedura (3,0 g/L), MgSO₄.7 H₂O (1,0 g/L), KH₂PO₄ (20,0 g/L) e (NH₄)₂HPO₄ (3,0 g/L). Para estabelecer a concentração de glicerol desejada foi utilizado como reagente glicerina bidestilada P.A. com teor mínimo de glicerol de 99,5%.

O meio de crescimento foi disposto em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de volume de meio, que foram mantidos em uma incubadora de agitação orbital da fabricante Cienlab, modelo CE-725/R por 48 horas, a 30 °C e 200 rpm. Após este período o volume dos frascos Erlenmeyer foi coletado em um único frasco previamente esterilizado, para homogeneização e posteriormente transferido para os meios de cultivo como inóculo, buscando uma concentração celular inicial de 0,5 g/L.

4.2 Estabelecimento de um modelo empírico para descrição do k_La em frascos agitados

Nessa etapa buscou-se definir um modelo para descrição do k_La em frascos agitados em função das seguintes variáveis: Agitação, Concentração de glicerol (S_0) e Relação Volume de frasco/Volume de meio. Foram realizados ensaios de acordo com um planejamento experimental 2³, com faces centradas e repetição no ponto central, apresentado na Tabela 2.

Tabela 2- Planejamento experimental 2³ com faces centradas e valores reais das variáveis: Agitação, Concentração de glicerol e Relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$.

Ensaio	Agitação (rpm)	$V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$	S_0 (g/L)
1	150	2,5	70
2	250	2,5	70
3	150	5,0	70
4	250	5,0	70
5	150	2,5	120
6	250	2,5	120
7	150	5,0	120
8	250	5,0	120
9	150	3,75	95
10	250	3,75	95
11	200	2,5	95
12	200	5,0	95
13	200	3,75	70
14	200	3,75	120
15	200	3,75	95
16	200	3,75	95
17	200	3,75	95

Fonte: Próprio autor.

A concentração de glicerol foi estabelecida utilizando como reagente glicerina bidestilada P.A. com teor mínimo de glicerol de 99,5%. Além de glicerol, a fase líquida apresentava em sua composição os seguintes componentes: Extrato de levedura (3,0 g/L), $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (1,0 g/L), KH_2PO_4 (20,0 g/L) e $(NH_4)_2HPO_4$ (3,0 g/L). Os meios foram alocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, mantendo-se os volumes descritos na Tabela 3, visando obter as relações $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ desejadas.

Tabela 3- Volumes de meio necessários para o ajuste da relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ em frascos Erlenmeyer de 250 mL.

Relação desejada	Volume de meio (mL)
2,50	100,0
3,75	66,7
5,00	50,0

Fonte: Próprio autor.

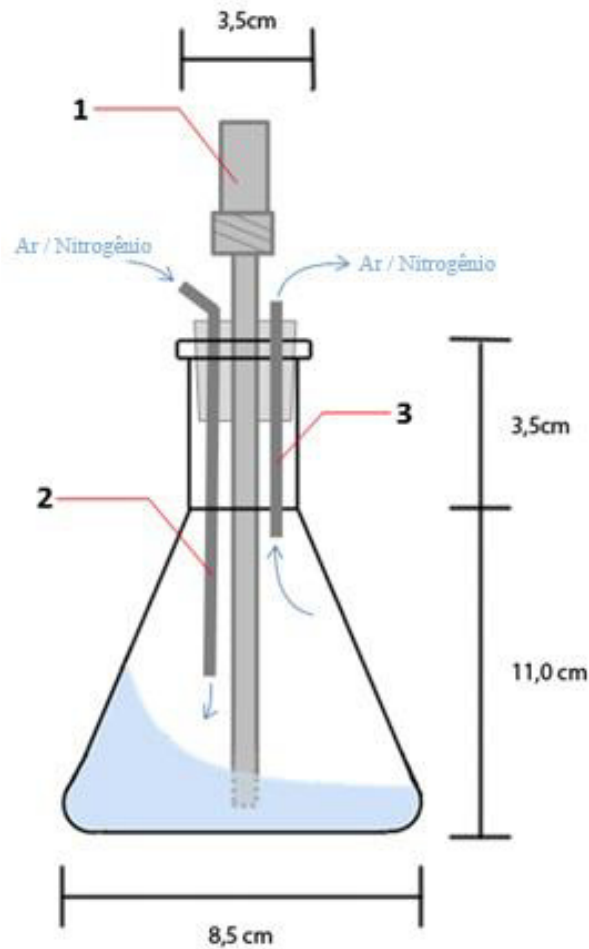
Para determinação do k_{La} aplicou-se o método estático proposto por Wise (1951). Para este propósito uma sonda de oxigênio dissolvido da fabricante Knick, modelo SE 706, foi calibrada à pressão atmosférica conforme orientações do manual do fabricante e utilizada para medição durante os experimentos.

O cálculo de k_{La} foi realizado 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.

Os frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo os meios, já com as relações $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ ajustadas, foram colocados em uma incubadora de agitação orbital da fabricante Cienlab, modelo CE-725/R, com temperatura de 30 °C para proporcionar a agitação necessária para cada experimento, sendo que o equipamento utilizado permitiu um raio de agitação de 14 mm.

O ensaio foi realizado de forma que cada frasco, com seu volume de meio já ajustado, foi tampado com uma rolha que comportava a sonda de oxigênio dissolvido e outros elementos utilizados no experimento, conforme a ilustração apresentada na Figura 21, que exibe também as medidas do frasco Erlenmeyer utilizado.

Figura 17- Frasco Erlenmeyer de 250 mL utilizado nos ensaios de determinação experimental do k_La em incubadora de agitação orbital, contendo sonda (1), ponto para injeção de Ar/Nitrogênio (2) e ponto para saída de Ar/Nitrogênio (3).



Fonte: Próprio autor.

A sonda (1) foi imersa no meio de cultivo, a agitação foi então iniciada e posteriormente o N_2 foi injetado no frasco Erlenmeyer pelo tubo (2) visando expulsar o O_2 do sistema através do tubo (3). A redução da concentração de O_2 no meio foi acompanhada através dos sinais da sonda exibidos no medidor e quando essa variável assumia valores menores que 2,0% o levantamento de dados era iniciado.

Encerrava-se então a injeção de N_2 , injetava-se ar atmosférico pelo tubo (2) sob agitação e armazenava-se os valores da porcentagem de O_2 no meio, mensurados pela sonda, até que essa variável assumisse valores próximos a saturação, quando a medição era então encerrada. Os valores da porcentagem de O_2 foram obtidos a cada segundo durante o tempo de medição e posteriormente utilizados no cálculo do k_La .

Os valores de k_{La} encontrados e as condições experimentais foram inseridos no programa Statistica® para realização da análise de variância e de outros estudos estatísticos.

4.3 Avaliação da influência da concentração de substrato e do k_{La} na produção de carotenoides e lipídeos em frascos agitados

Para avaliar a influência da concentração de glicerol e do k_{La} sobre a produção de carotenoides e lipídeos pela levedura foi elaborado o planejamento experimental descrito na Tabela 4.

Tabela 4- Planejamento experimental 2^2 com réplicas em todos os experimentos e triplicata no ponto central, empregado para avaliação da influência da concentração de glicerol (S_0) e do k_{La} sobre a produção de carotenoides e lipídeos pela levedura.

Ensaio	k_{La} (h^{-1})	S_0 (g/L)
1	20	70
2	20	70
3	40	70
4	40	70
5	20	120
6	20	120
7	40	120
8	40	120
9	30	95
10	30	95
11	30	95

Fonte: Próprio autor.

Para estabelecer a concentração de glicerol desejada foi utilizado como reagente glicerina bidestilada P.A. com teor mínimo de glicerol de 99,5%. Além do glicerol, outros componentes foram adicionados ao meio de cultivo, sendo que os compostos utilizados e suas concentrações foram ajustadas da seguinte forma:

Extrato de levedura (3,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L), KH_2PO_4 (20,0 g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (3,0 g/L).

O k_{La} foi ajustado de acordo com o volume de meio adicionado nos frascos Erlenmeyer de 250 mL, utilizando para isso a equação obtida na primeira fase desse trabalho. A equação foi aplicada fixando-se os valores de k_{La} desejados, conforme Tabela 4, bem como estabelecendo-se a agitação em um valor fixo de 250 rpm. Dessa forma obteve-se como resultado a relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ necessária para cada um dos experimentos.

Após inoculados, os meios de cultivo permaneceram sob agitação constante de 250 rpm e temperatura de 30 °C em uma incubadora de agitação orbital da fabricante Cienlab, modelo CE-725/R, por 120 h, ao final das quais executou-se os procedimentos analíticos referentes à quantificação da concentração de células, lipídeos e carotenoides.

4.4 Definição do biorreator e do dispersor para o cultivo

O desempenho de dois tipos de biorreatores de agitação pneumática de 500 mL e de dois tipos de dispersores foi avaliado nesta fase, utilizando-se como critério para seleção os equipamentos que permitissem a obtenção de um maior k_{La} e de um menor tempo de mistura sob as mesmas condições operacionais.

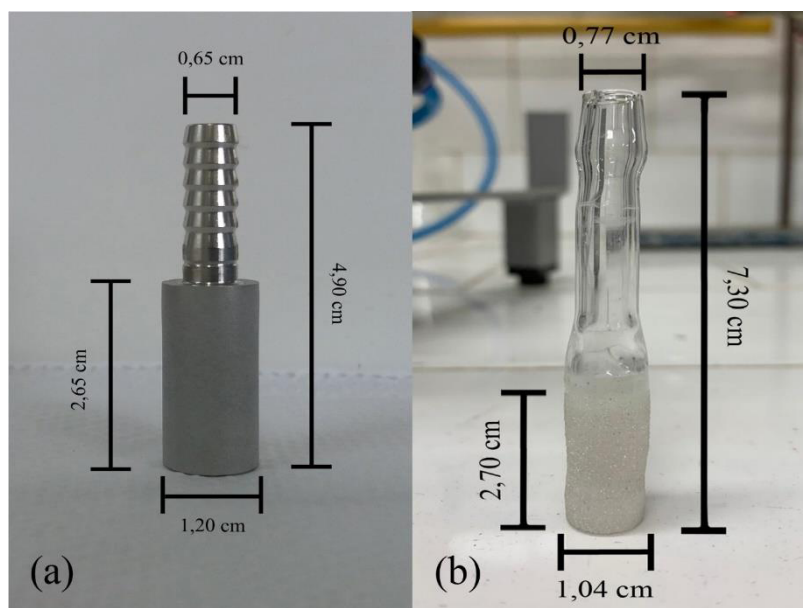
As porosidades dos dispersores utilizados encontram-se descritas na Tabela 5, bem como as características construtivas dos dispersores e dos biorreatores utilizados encontram-se nas Figuras 18 e 19.

Tabela 5- Porosidade dos dispersores utilizados no experimento.

Dispersor	Porosidade
1	$\cong 200 \mu\text{m}$
2	2,0 μm

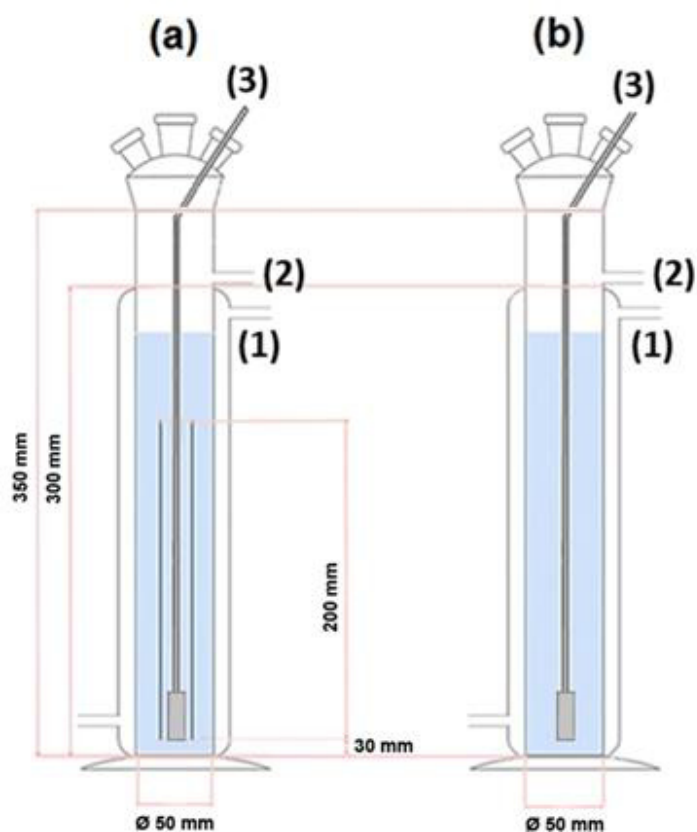
Fonte: Próprio autor.

Figura 18- Dimensões dos dispersores utilizados nos experimentos: (a) Dispersor com porosidade de $2,0\ \mu\text{m}$ e (b) dispersor com porosidade de $200\ \mu\text{m}$.



Fonte: Próprio autor.

Figura 19 - Reatores de 500 mL utilizados nos experimentos: (a) *Air-lift*, (b) Coluna de bolhas, com sistema de controle de temperatura por encamisamento (1), tomada lateral para retirada de amostras (2) e sistema de injeção de ar (3).



Fonte: Próprio autor.

4.4.1 Determinação do k_{La} em biorreatores

O k_{La} foi avaliado nos diferentes equipamentos utilizando-se aerações de 0,25 e 1,0 vvm, em experimentos realizados em triplicata utilizando uma metodologia semelhante à aplicada em frascos agitados. Com o reator montado, a sonda foi inserida no meio de cultivo e então N_2 foi injetado pelo tubo do dispersor para expulsar o O_2 do meio. A redução da concentração de O_2 no meio foi acompanhada até que assumisse valores inferiores a 2%, sendo que nesse momento a injeção de N_2 era encerrada, ar era admitido no tubo do dispersor e o armazenamento de dados era iniciado. Os dados foram coletados até que a variável assumisse valores próximos a saturação em intervalos de 1 segundo durante o tempo de medição e posteriormente utilizados para calcular o k_{La} .

4.4.2 Determinação do tempo de mistura em biorreatores

A determinação do tempo de mistura foi realizada através de um ensaio do tipo pulso de pH, de forma semelhante à metodologia aplicada por Cerri (2009). O procedimento foi iniciado com a montagem da estrutura operacional dos reatores de agitação pneumática.

Para realização do ensaio a aeração foi estabelecida e foi injetada no meio uma solução de NaOH 0,2 mol/L, visando criar uma oscilação no pH do sistema. Um sensor de pH da fabricante Knick, modelo SE 555, foi utilizado para medir e registrar os valores dessa variável até sua estabilização, que foi considerada alcançada quando o valor do pH no meio assumiu a proporção de 95% do valor final desta variável. Os dados obtidos foram posteriormente analisados para estabelecimento do tempo de mistura.

4.4.3 Caracterização das bolhas

A quantificação e determinação do tamanho das bolhas foi feita através de análise de imagens, por método baseado no utilizado por Almeida, Barreto e Couto (2019). A estrutura operacional do reator foi montada e seu conteúdo foi preenchido com uma solução de 200 g/L de glicerol.

Foram estabelecidas aerações de 0,25 e 1,00 vvm nos reatores utilizando cada um dos dispersores testados e quando o fluxo de gás pelo meio possibilitou a formação de um regime de bolhas homogêneo foram retiradas três fotografias do líquido aerado em cada uma das condições operacionais, ajustando previamente a sensibilidade a luz da câmera (ajuste ISO) em 1600. As fotografias foram então submetidas a análise através do programa ImageJ com utilização da metodologia aplicada por Almeida, Barreto e Couto (2019).

As fotografias foram abertas no programa, posteriormente utilizou-se o comando *Image, Type, 8-bit*, seguido do comando *Image, Adjust, Threshold* com ajuste de 0 a 149 e coloração branco e preto. Utilizou-se então o comando *Process, Binary, Fill Holes*, seguido de *Process, Binary, Watershed*. Por fim a contagem de bolhas foi realizada através do comando *Analyse, Analyse Particles*, estabelecendo um limite de tamanho de 195 pixels² ao infinito, circularidade de 0 a 1 e mantendo selecionados os itens *Summarize* e *Show Results*.

O programa gerou a janela *Summarize* que apresenta em seu campo *Count* o número de bolhas levantado na fotografia em questão. Já na janela *Results* os comandos *Results* e *Distribution* foram aplicados visando obter o tamanho das bolhas, sendo que na janela gerada por essa ação o parâmetro área foi mantido e foram solicitadas 10 faixas de escalonamento para quantificação das bolhas. Uma nova janela com os resultados na forma de gráfico foi gerada, sendo então aplicado o comando *List* visando obter os resultados na forma de uma listagem.

Para averiguar o erro relacionado à contagem realizada pelo programa as bolhas geradas nas fotografias referentes ao dispersor de 200 µm com aeração de 0,25 vvm foram contadas manualmente e comparadas com os valores do ImageJ, sendo os resultados apresentados na Tabela 6.

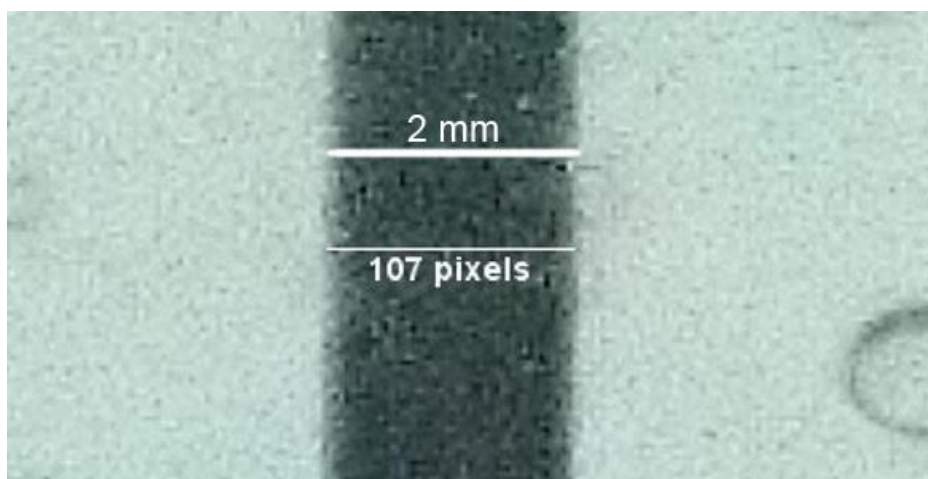
Tabela 6- Comparação da contagem de bolhas manual e a realizada pelo programa ImageJ para as fotografias referentes ao dispersor de 200 µm com aeração de 0,25 vvm em reator coluna de bolhas e solução 200 g/L de glicerol.

Contagem	Fotografia 1	Fotografia 2	Fotografia 3
Manual	378	397	377
ImageJ	372	411	388
Erro (%)	1,6	3,5	2,9

Fonte: Próprio autor.

É possível notar que o maior valor de erro encontrado foi de 3,5%, o que se apresenta em uma margem aceitável dada a quantidade de bolhas envolvidas. Já para averiguação da área das bolhas foi utilizado um referencial de tamanho conhecido, conforme apresentado na Figura 20.

Figura 20- Imagem do referencial de escala para determinação do tamanho de bolhas.



Fonte: Próprio autor.

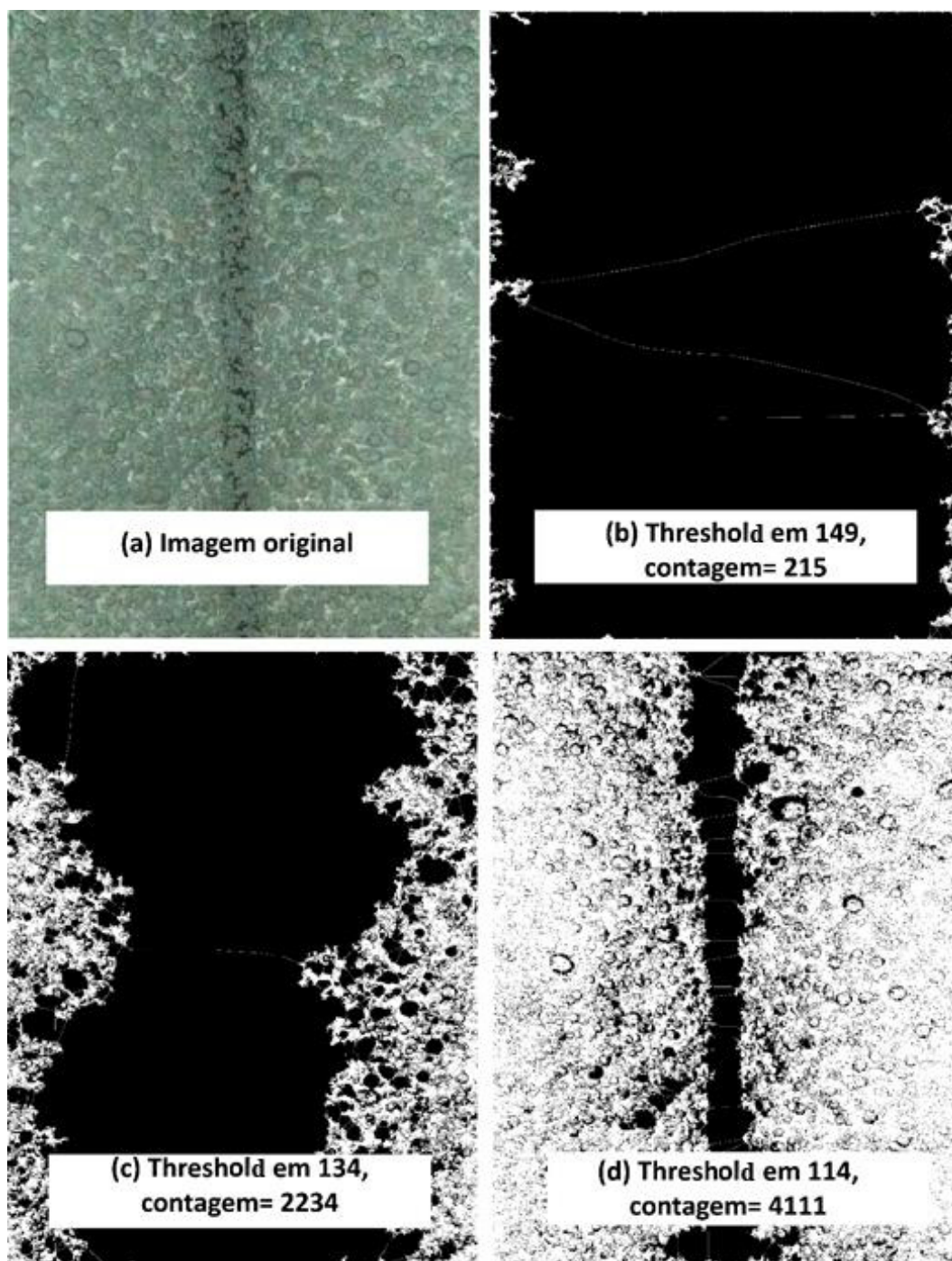
O referencial utilizado tem largura de 2,0 mm e teve essa mesma dimensão estabelecida no programa ImageJ, com objetivo de relacionar a medida real com a medida em pixels, gerando o resultado apresentado na Figura 20, de 107 pixels. Dessa forma uma área de 4 mm² corresponde na fotografia em questão a uma área de 11.449 pixels², sendo esta a razão de conversão utilizada para o cálculo da área das bolhas nesta figura. O processo foi repetido para cada figura analisada, uma vez que pequenas variações durante a execução das fotografias poderiam gerar um erro considerável no dimensionamento final das bolhas.

A dimensão mínima aplicada no comando *Analyse Particles* foi estabelecida com valor de 60 pixels² para o caso do dispersor de 2,0 µm e 195 pixels² para o caso do equipamento de 200 µm. Esses valores foram obtidos através da análise das bolhas em cada imagem, sendo que as menores bolhas visualizadas foram medidas e os menores valores observados foram utilizados como limite mínimo para tal comando.

Tratando-se do comando *Threshold*, os valores ajustados para o dispersor de 2,0 µm foram reduzidos de 0 a 149 para 0 a 134 com a aeração de 0,25 vvm e 0 a 114 com a aeração de 1,00 vvm. Essa mudança foi devida ao fato de que quando

submetida ao tratamento no programa o contorno das bolhas, geradas em maior quantidade e menor dimensão, formou manchas maiores que não permitiram a real contagem das mesmas, conforme apresentado na Figura 21.

Figura 21- Comparação entre os níveis de aplicação do comando *Threshold*, a nitidez da imagem e a contagem de bolhas para uma fotografia do meio aerado com o dispersor de 2,0 μm com aeração de 1,00 vvm.



Fonte: Próprio autor.

4.5 Avaliação da influência da disponibilidade de oxigênio e da concentração de substrato sobre a produção de carotenoides e lipídeos em biorreator

O conjunto biorreator e dispersor selecionado na etapa anterior foi utilizado para avaliar a influência da disponibilidade de oxigênio e da concentração inicial de glicerol (S_0) sobre a produção de lipídeos e carotenoides pela levedura. Os cultivos foram realizados durante 120 horas, com a temperatura controlada em 30 °C e com as variáveis estudadas ajustadas conforme o planejamento apresentado na Tabela 7.

Tabela 7- Planejamento experimental 2^2 com faces centradas e triplicata no ponto central, empregado para cultivo em biorreatores tipo coluna de bolhas.

Ensaio	k_{La} (h^{-1})	S_0 (g/L)
1	175	250
2	175	160
3	175	70
4	75	250
5	75	160
6	75	70
7	125	250
8	125	70
9	125	160
10	125	160
11	125	160

Fonte: Próprio autor.

O k_{La} foi ajustado em 175 h^{-1} por meio de uma aeração de 1,9 vvm e a concentração de glicerol foi estabelecida utilizando como reagente glicerina bidestilada P.A. com teor mínimo de glicerol de 99,5%. Amostras do meio de cultivo foram retiradas a cada 24 horas visando determinar a concentração celular, bem como a de lipídeos produzidos pela levedura, enquanto a concentração de carotenoides foi determinada ao final do tempo de cultivo.

Após a execução do planejamento experimental da Tabela 7, um ensaio de confirmação foi executado em triplicata, visando averiguar a repetitividade e

adequação à margem de erro dos experimentos. As condições experimentais foram estabelecidas com base nos resultados do cultivo em biorreatores, fixando-se o valor de k_{La} em 125 h^{-1} e utilizando a equação empírica de produção de lipídeos, obtida na presente etapa, para calcular a concentração inicial de glicerol necessária para atingir uma produção de lipídeos próxima aos maiores valores obtidos neste planejamento.

4.6 Metodologia analítica

4.6.1 Concentração celular

A concentração celular nos meios de cultivo foi determinada por espectrofotometria, com uso de um equipamento BEL Engineering S.R.L., modelo UV-M51. Alíquotas de 1 mL dos meios de cultivo foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos, diluídas e suas absorvâncias foram estabelecidas a 600 nm, utilizando água destilada como branco.

A concentração celular foi obtida através da relação entre peso seco e absorvância, determinada através de uma curva de calibração previamente estabelecida para a levedura em questão, conforme metodologia utilizada por Ferreira (2019).

4.6.2 Quantificação de lipídeos totais na biomassa

A quantificação de lipídeos foi realizada aplicando-se a metodologia proposta por Ferreira (2019), que consiste na retirada de uma alíquota de 1 mL do meio de cultivo, a qual foi centrifugada e teve seu sobrenadante descartado. Adicionou-se então 1 mL de metanol e 2 g de pérolas de vidro, com 0,5 mm de diâmetro e submeteu-se a amostra a agitação em vortex por 1 minuto, seguida de imersão em banho de gelo, também por 1 minuto, repetindo esta sequência até um total de 4 vezes para cada amostra.

Adicionou-se então 2 mL de clorofórmio e agitou-se a amostra durante 1 h a 200 rpm, após os quais foram adicionados 1 mL de solução de cloreto de potássio 0,88% e 0,8 mL de água destilada. Centrifugou-se então a amostra a 1500 g por

10 min, coletou-se uma alíquota de 1 mL da fase orgânica separada, a qual foi alocada em um vial previamente pesado.

Os vials contendo as amostras foram levados a estufa com temperatura de 80 °C por 72 horas para promover a evaporação do solvente. Após esse tempo os vials foram pesados e o valor obtido a partir da diferença entre seu peso inicial e final representou a massa de lipídeos produzidos pela levedura.

4.6.3 Extração e quantificação de carotenoides

A quantificação de carotenoides foi realizada através da retirada de uma alíquota de 10 mL do meio de cultivo, a qual foi centrifugada a 1500 g por 10 minutos e teve seu sobrenadante descartado. Adicionou-se então 5 mL de água destilada e submeteu-se as células a agitação em vortex por 1 minuto, visando retirar possíveis componentes do meio de cultivo ainda presentes.

As células lavadas foram submetidas a uma nova etapa de centrifugação sob as mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi novamente descartado. Adicionaram-se então 3 mL de solução de acetona e éter de petróleo na proporção volumétrica de 1:1 e 2 g de pérolas de vidro, com 0,5 mm de diâmetro, para então submeter as células a agitação em vortex durante 1 minuto, visando a extração dos carotenoides produzidos.

Após esta etapa a amostra foi novamente centrifugada a 1500 g por 10 min, o sobrenadante foi reservado e repetiu-se a etapa de adição de solução de acetona e éter de petróleo seguida de agitação e centrifugação por 2 vezes, de forma que ao final da extração foram utilizados 10 mL de solução de acetona e éter de petróleo.

A levedura *Rhodotorula glutinis* é capaz de sintetizar β -caroteno, toruleno e torularodina (KOT *et al.*, 2016), sendo o β -caroteno o carotenoide majoritariamente produzido (PERRIER; DUBREUCQ; GALZY, 1995). Dessa forma, a concentração de carotenoides foi determinada com base na quantificação deste composto ao fim do tempo de cultivo, aplicando para isso a metodologia utilizada por Nellis, Correia e Spoto (2017) e Andrade *et al.* (2016).

O procedimento foi realizado pela determinação da absorvância da amostra em um espectrofotômetro BEL Engineering S.R.L, modelo UV-M51, utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm, referente à faixa de absorção do β -caroteno e

solução de acetona e éter de petróleo como branco. A concentração final foi determinada a partir da equação 1 (NELLIS; CORREIA; SPOTO, 2017 e ANDRADE *et al.*, 2016).

$$C_{cart} = 100 \cdot \frac{A \cdot V \cdot 10^4}{a_{1cm}^{1\%} \cdot m} \quad (1)$$

Em que:

- C_{cart} : É a concentração de carotenoides em $\mu\text{g}/100\text{g}$ de biomassa;
- A : É a absorvância medida;
- V : É o volume final da amostra em mL;
- m : É a massa final da amostra em g;
- $a_{1cm}^{1\%}$: É o coeficiente de absorção do betacaroteno em éter de petróleo, que assume o valor de 2592.

5 Resultados e discussão

5.1 Estabelecimento de um modelo empírico para descrição do k_{La} em frascos agitados

Na Tabela 8 são apresentados os resultados dos ensaios do planejamento experimental 2³ com face centrada, utilizado na avaliação da influência das variáveis: Agitação, Relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ e concentração de glicerol, sobre a resposta coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

Tabela 8 - Planejamento experimental 2³ com face centrada, utilizado na avaliação da influência das variáveis: Agitação, Razão $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ e concentração de glicerol (S_0), sobre a resposta k_{La} em ensaios realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL a 30°C.

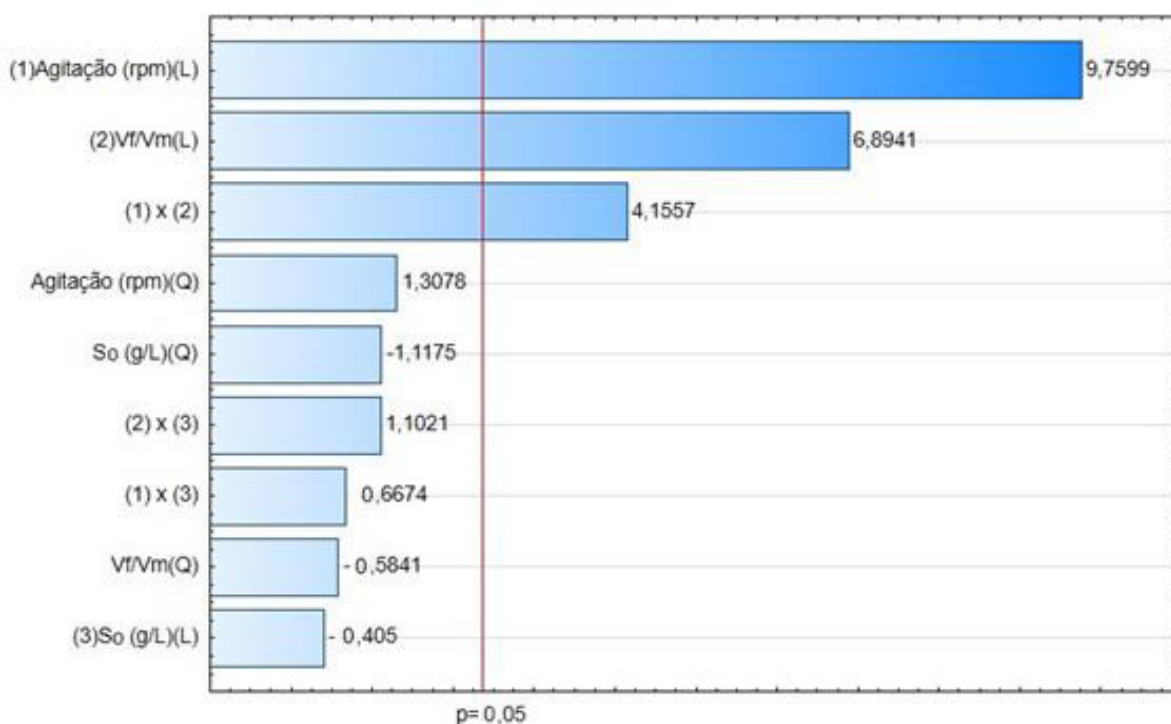
Ensaio	Variáveis			Resposta
	Agitação (rpm)	Relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$	S_0 (g/L)	k_{La} (h ⁻¹)
1	150	2,50	70	9,7
2	250	2,50	70	22,2
3	150	5,00	70	16,00
4	250	5,00	70	38,4
5	150	2,50	120	10,7
6	250	2,50	120	17,9
7	150	5,00	120	13,6
8	250	5,00	120	47,0
9	150	3,75	95	16,3
10	250	3,75	95	35,2
11	200	2,50	95	16,0
12	200	5,00	95	28,4
13	200	3,75	70	24,6
14	200	3,75	120	17,8
15	200	3,75	95	21,9
16	200	3,75	95	20,6
17	200	3,75	95	23,9

Fonte: Próprio autor.

Observa-se que os valores de k_{LA} variaram entre 9,7 e 47,0 h^{-1} o que demonstra que as variáveis estudadas apresentam influência sobre a resposta observada. De forma geral, maiores valores de k_{LA} foram alcançados quando foram empregadas maiores frequências de agitação e uma maior relação entre $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$.

Para compreensão mais detalhada dos efeitos das variáveis sobre a resposta, os dados obtidos foram tratados estatisticamente, sendo apresentado na Figura 22 o gráfico de Pareto para o estudo realizado. Na análise do gráfico de Pareto são considerados significativos os efeitos que apresentam um valor de " t " calculado, representado pelas barras azuis na figura, superior ao valor de " t " tabelado, representado pela linha vermelha no gráfico.

Figura 22- Gráfico de Pareto com os efeitos da Agitação (1), Relação entre $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ (2), Concentração inicial de glicerol (S_0) (3) e suas interações sobre o k_{LA} em frascos agitados.



Fonte: Próprio autor.

Na análise do gráfico de Pareto verificou-se que a Agitação (1), a relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ (2) e a interação entre essas variáveis (1) x (2) apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre o k_{LA} a um nível de confiança de 95%, enquanto

a concentração de glicerol (3) e suas interações com as demais variáveis não apresentaram efeitos significativos sobre essa resposta.

Com base nas variáveis que apresentaram efeito significativo foi proposto um modelo matemático para descrição do comportamento do k_La , em função dos valores reais de tais fatores, o qual é apresentado na equação 2.

$$k_La(h^{-1}) = 18,515 - 0,081 * Agitação - 9,063 * Vf/Vm + 0,072 * Agitação * Vf/Vm \quad (2)$$

Para avaliar o grau de ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto foi realizada uma análise de variância, apresentada na Tabela 9. Esta análise demonstrou que o modelo foi capaz de explicar 91,8% da variação experimental observada. Desta forma o modelo foi considerado adequado para ser representado na forma de uma superfície de resposta.

Tabela 9- Análise de variância dos efeitos principais e de interação das variáveis Agitação (1) e razão V_{Frasco}/V_{Meio} (2) sobre o k_La em frascos agitados.

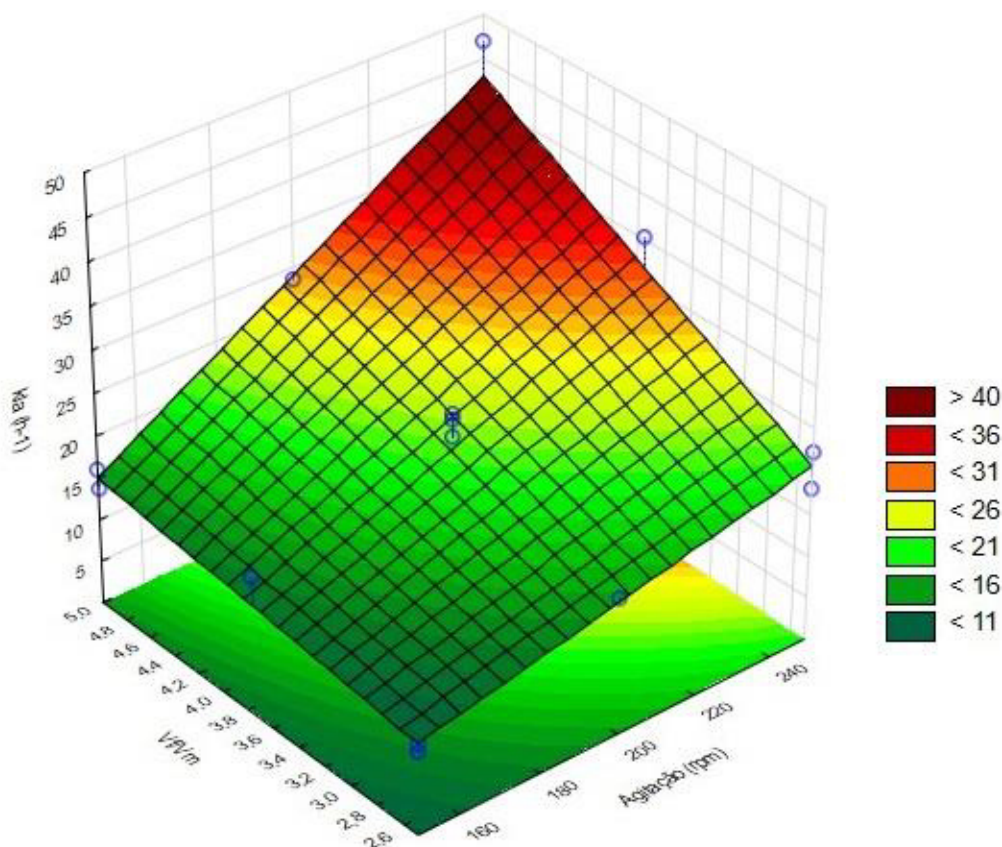
Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	P
(1) Agitação	894,4	1	894,4	< 0,000001 *
(2) V_{Frasco}/V_{Meio}	446,3	1	446,3	0,000006 *
(1) x (2)	162,2	1	162,2	0,000672 *
Residual	107,1	13	8,2	
Total	1610,0	16		
Variação explicada pelas variáveis significativas:			91,8%	
Máxima variação explicável:			93,3%	

* Significativo a 95% de confiança.

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 23 é apresentado o gráfico de superfície de resposta que representa o valor de k_{La} alcançado em função da agitação e da relação entre V_{Frasco}/V_{Meio} em frascos agitados.

Figura 23- Superfície de resposta que descreve o comportamento do k_{La} em função da agitação e da relação V_{Frasco}/V_{Meio} , em valores reais, com concentração de glicerol em 95 g/L, em frascos Erlenmeyer de 250 mL alocados em agitador orbital a 30°C.



Fonte: Próprio autor.

Na análise da superfície de resposta verificou-se que tanto o aumento da frequência de agitação, quanto da relação entre V_{Frasco}/V_{Meio} , proporcionaram um aumento dos valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio. Dentro da região de variação estudada o maior valor de k_{La} , que equivale a $47,0 h^{-1}$, foi obtido no ponto onde ambas as variáveis se apresentavam no nível mais alto, ou seja, agitação de 250 rpm e relação V_{Frasco}/V_{Meio} em 5,0.

Verificou-se ainda que o modelo apresentou comportamento linear, demonstrando que maiores valores de k_{La} podem ser obtidos com o aumento da agitação e da relação entre V_{Frasco}/V_{Meio} . Contudo, a avaliação de condições de agitação em

maiores frequências de rotação não pode ser realizada devido a limitações físicas do equipamento, que permite o ajuste até 250 rpm, bem como a maioria dos agitadores disponíveis no mercado. Optou-se também por não utilizar relações $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ superiores a 5, pois os volumes de líquido no frasco Erlenmeyer seriam insuficientes para uma medição adequada do $k_L a$.

Os resultados obtidos no presente estudo foram comparados com os valores de $k_L a$ previstos pelos modelos propostos por Reynoso-Cereceda *et al.* (2016) e Liu, Wu e Ho (2006), que são apresentados respectivamente nas equações 3 e 4.

$$k_L a = 3212 \cdot 10^{-4} * d^{1,92} * n^{1,16} * d_0^{0,38} * V^{-0,83} \quad (3)$$

Em que:

- $k_L a$: É o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em h^{-1} ;
- d : É o diâmetro de frasco em m;
- n : É a frequência de agitação em s^{-1} ;
- d_0 : É o diâmetro de agitação em cm;
- V : É o volume de meio em m^3 .

$$k_L a = 0,141 \cdot N^{0,88} \cdot \left(\frac{V_l}{V_o}\right)^{-0,80} \quad (4)$$

Em que:

- $k_L a$: É o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em h^{-1} ;
- N : É a frequência de agitação em min^{-1} ;
- V_l : É o volume de meio em mL;
- V_o : É o volume de frasco em mL.

Na Tabela 10 são apresentados alguns dos dados obtidos experimentalmente para o $k_L a$, bem como os valores calculados através dos modelos apresentados nas equações 3 e 4 e pelo obtido no presente trabalho para as mesmas condições operacionais.

Tabela 10- Valores de k_{LA} obtidos experimentalmente e calculados a partir do modelo proposto e através das equações apresentadas por Reynoso-Cereceda *et al.* (2016) e Liu, Wu e Ho (2006).

k_{LA} (h ⁻¹) Experimental	k_{LA} calculado (h ⁻¹)		
	Modelo Proposto	Reynoso-Cereceda <i>et al.</i> (2016)	Liu, Wu e Ho (2006)
9,7	10,71	19,43	24,13
16,0	15,05	34,53	42,01
16,0	15,66	27,12	31,08
22,2	20,61	35,13	37,82
28,4	29,00	48,21	54,11
38,4	42,95	62,46	65,85

Fonte: Próprio autor.

Observa-se que os valores de k_{LA} obtidos experimentalmente apresentam diferença dos calculados usando as equações apresentadas pelos autores mencionados. Todavia essa diferença pode ser justificada pela composição do meio experimental, uma vez que Reynoso-Cereceda *et al.* (2016) realizaram suas medidas em água deionizada, adicionando Na₂SO₃ e CoCl₂ para retirar o oxigênio dissolvido no início do experimento, enquanto Liu, Wu e Ho (2006) executaram as medidas em um meio composto por 25 g/L de glicose, 3,0 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1,5 g/L de KH₂PO₄, 1,5 g/L de MgSO₄·7H₂O, 1,5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de licor de maceração de milho.

A influência da composição do meio nos valores de k_{LA} pode ser observada comparando os resultados obtidos entre as equações de ambos os autores que mesmo aplicadas com os mesmos conjuntos de dados, apresentaram diferentes resultados. A diferença observada também demonstra a importância de estabelecer os valores de k_{LA} para as condições específicas utilizadas no cultivo, visando obter um melhor dimensionamento dessa variável.

No caso do presente trabalho estima-se que a influência da composição do meio no k_{LA} seja justificada sumariamente pela presença do glicerol, que apresenta viscosidade e densidade superior à da água e que foi adicionado, em sua menor proporção, na concentração de 70 g/L, o que pode ter dificultado a dissolução do oxigênio no meio em questão.

Já o modelo e a superfície de resposta obtidos a partir dos dados experimentais apresentaram grande proximidade com as variações implementadas no experimento e dessa forma conclui-se que a determinação experimental nos equipamentos utilizados para o cultivo é a alternativa mais adequada para estabelecer as condições operacionais capazes de proporcionar os valores de k_La desejados, os quais foram necessários para a próxima etapa deste estudo, em que se avaliou a influência desta variável sobre o crescimento celular e a produção de carotenoides e lipídeos pela levedura.

5.2 Avaliação da influência da concentração inicial de substrato e do k_La na produção de carotenoides e lipídeos em frascos agitados

Os ensaios realizados nessa etapa foram executados segundo um planejamento fatorial 2^2 , com uma réplica de cada condição experimental e uma triplicata no ponto central, visando avaliar a influência das variáveis concentração inicial de glicerol e k_La sobre o crescimento celular e a produção de carotenoides e lipídeos pela levedura. Na Tabela 11 são apresentados os resultados obtidos para a concentração celular, assim como a produção de carotenoides e lipídeos, para o tempo de 120 horas de cultivo, realizado sob as diferentes condições do planejamento experimental.

Tabela 11- Planejamento experimental 2² com repetições utilizado para avaliação da influência das variáveis coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) e concentração inicial de glicerol (S_0), sobre a concentração celular, de carotenoides e lipídeos, alcançadas pela levedura *Rhodotorula glutinis* em 120 horas de cultivo.

Ensaio	Variáveis		Respostas		
	k_{La}	S_0	Células	Carotenoides	Lipídeos
	(h ⁻¹)	(g/L)	(g/L)	(mg/L)	(g/L)
1	20	70	24,4	1,24	4,4
2	20	70	21,9	1,17	5,4
3	40	70	25,9	1,30	4,2
4	40	70	24,3	1,65	4,0
5	20	120	24,0	1,38	6,2
6	20	120	22,3	1,19	5,2
7	40	120	33,4	1,82	7,8
8	40	120	29,0	1,97	8,0
9	30	95	26,1	1,37	6,8
10	30	95	26,7	1,37	6,2
11	30	95	26,8	1,35	5,8

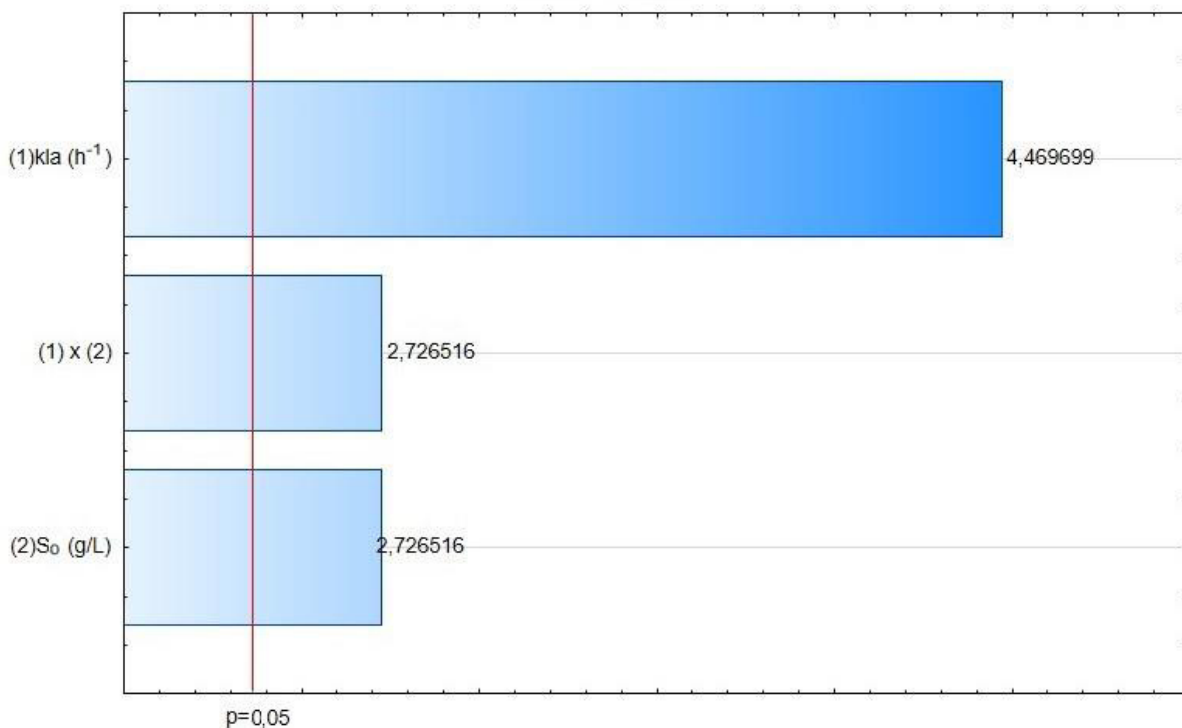
Fonte: Próprio autor.

É possível notar que as concentrações de células, carotenoides e lipídeos variaram, de 21,9 a 33,4 g/L, 1,17 a 1,97 mg/L e de 4,0 a 8,0 g/L, respectivamente. As variações observadas para as respostas do planejamento evidenciam que, dentro da região avaliada, as variáveis estudadas apresentam influência sobre as respostas observadas. As maiores concentrações de lipídeos (8,0 g/L), carotenoides (1,97 mg/L) e células (33,4 g/L) foram alcançadas nos ensaios em que os maiores valores de k_{La} e S_0 foram empregados, demonstrando assim a influência positiva destas variáveis sobre as respostas observadas.

Para melhor compreender a influência de cada variável no processo, os dados obtidos foram submetidos a uma análise estatística, através da elaboração de gráficos de Pareto. Nesta análise os efeitos do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (1) e da concentração inicial de glicerol (S_0) (2) sobre as respostas concentração celular, de carotenoides e lipídeos foram avaliados a um nível de confiança de 95%.

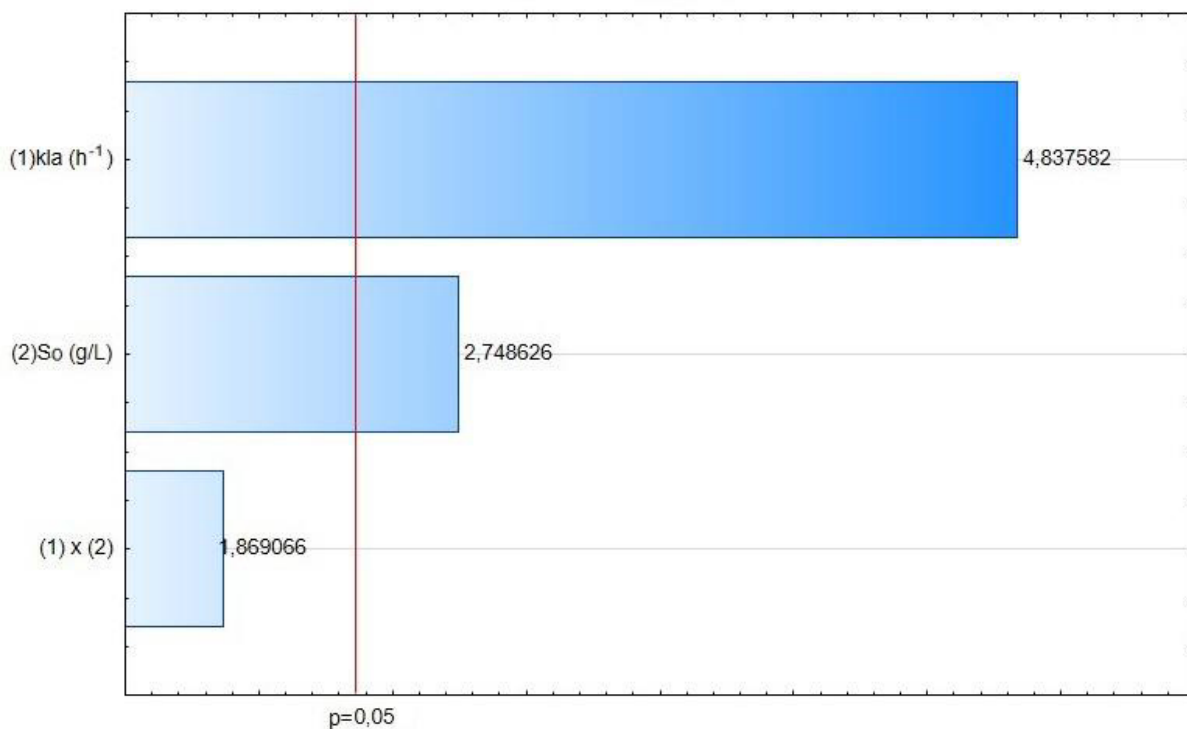
No gráfico de Pareto apresentado na Figura 24 observa-se que ambas as variáveis k_{La} e concentração inicial de glicerol, assim como seu termo de interação apresentaram efeito significativo sobre a concentração celular. No caso da concentração de carotenoides, cujo gráfico de Pareto está representado na Figura 25 apenas os efeitos principais do k_{La} e da concentração inicial de glicerol apresentaram efeito significativo sobre esta resposta, não sendo significativo o termo de interação. No caso da concentração de lipídeos, na análise do gráfico de Pareto da Figura 26, foi considerado significativo, no mesmo nível de confiança, a variável principal concentração de glicerol e o termo de interação entre k_{La} e concentração inicial de glicerol.

Figura 24- Gráfico de Pareto para a análise dos efeitos do k_{La} (1) e da concentração inicial de glicerol (S_0) (2) sobre a concentração celular ao final de 120 h de cultivo.



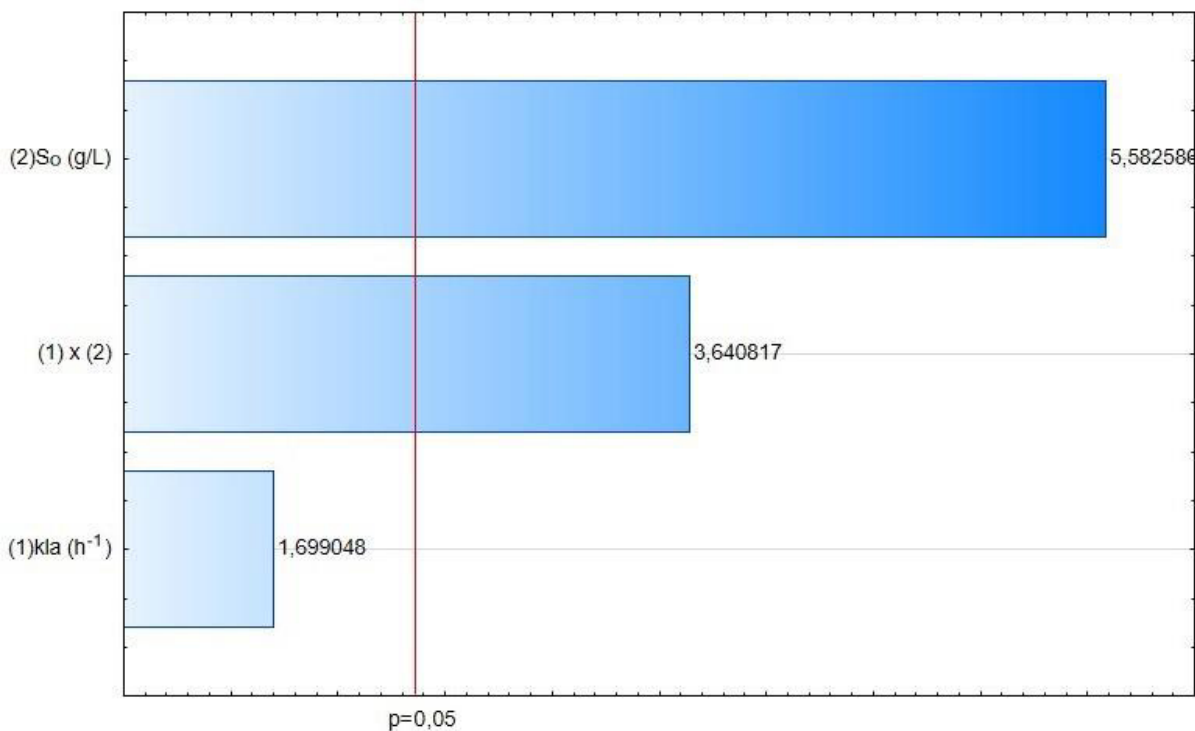
Fonte: Próprio autor.

Figura 25- Gráfico de Pareto para a análise dos efeitos do k_{La} (1) e da concentração inicial de glicerol (S_0) (2) sobre a concentração de carotenoides ao final de 120 h de cultivo.



Fonte: Próprio autor.

Figura 26- Gráfico de Pareto para a análise dos efeitos do k_{La} (1) e da concentração inicial de glicerol (S_0) (2) sobre a concentração de lipídeos ao final de 120 h de cultivo.



Fonte: Próprio autor.

A partir das variáveis significativas foram propostos modelos para descrever o comportamento das respostas concentração celular (Equação 5), concentração de carotenoides (Equação 6) e concentração de lipídeos (Equação 7), com base na concentração de glicerol e no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, para ensaios realizados em frascos agitados. Nestas equações as respostas são descritas em função dos valores reais do k_{La} (h^{-1}) e da concentração inicial de glicerol no meio de cultivo (g/L).

$$\text{Conc. Células (g/L)} = 29,98 - 0,33 * k_{La} - 0,12 * S_0 + 0,01 * k_{La} * S_0 \quad (5)$$

$$\text{Conc. Carotenoides (mg/L)} = 1,27 - 0,01 * k_{La} - 0,05 \times 10^{-4} * S_0 \quad (6)$$

$$\text{Conc. Lipídeos (g/L)} = 8,95 - 0,25 * k_{La} - 0,04 * S_0 - 0,003 * k_{La} * S_0 \quad (7)$$

Ressalta-se que no caso da Equação 7, referente a concentração de lipídeos, que o k_{La} foi mantido no modelo devido ao fato de seu termo de interação com a concentração inicial de glicerol, (1) x (2), ser estatisticamente significativo. Para avaliar o grau de ajuste dos dados experimentais aos modelos propostos foram realizadas análises de variância (ANOVA), as quais são apresentadas nas Tabelas 12, 13 e 14, para as respostas concentração celular, concentração de carotenoides e de lipídeos, respectivamente.

Tabela 12- Análise de variância dos efeitos principais e de interação: k_{La} (1) e concentração inicial de glicerol (S_0) (2) sobre a concentração celular da levedura ao fim das 120 horas de cultivo.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	p
(1) k_{La}	50,00	1	50,00	0,002902 *
(2) S_0	18,60	1	18,60	0,029487 *
(1) x (2)	18,60	1	18,60	0,029487 *
Residual	17,52	7	2,50	
Total	104,73	10		
Variação explicada pelas variáveis significativas:			76,10%	
Máxima variação explicável:			83,27%	

* Significativo a 95% de confiança.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 13- Análise de variância dos efeitos principais e de interação: k_{La} (1) e concentração de glicerol (S_0) (2), sobre a produção de carotenoides ao fim das 120 horas de cultivo.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	<i>p</i>
(1) k_{La}	0,3872	1	0,3872	0,001883 *
(2) S_0	0,1250	1	0,1250	0,028561 *
(1) x (2)	0,0578	1	0,0578	0,103820
Residual	0,1158	7	0,0165	
Total	0,6858	10		
Variação explicada pelas variáveis significativas:		75,86%		
Máxima variação explicável:		83,11%		

* Significativo a 95% de confiança.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 14- Análise de variância dos efeitos principais e de interação: k_{La} (1) e concentração de glicerol (S_0) (2), sobre a produção de lipídeos ao fim das 120 horas de cultivo.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	<i>p</i>
(1) k_{La}	0,98	1	0,98	0,133113
(2) S_0	10,58	1	10,58	0,000831 *
(1) x (2)	4,50	1	4,50	0,008278 *
Residual	2,38	7	0,34	
Total	18,44	10		
Variação explicada pelas variáveis significativas:		81,59%		
Máxima variação explicável:		87,11%		

* Significativo a 95% de confiança.

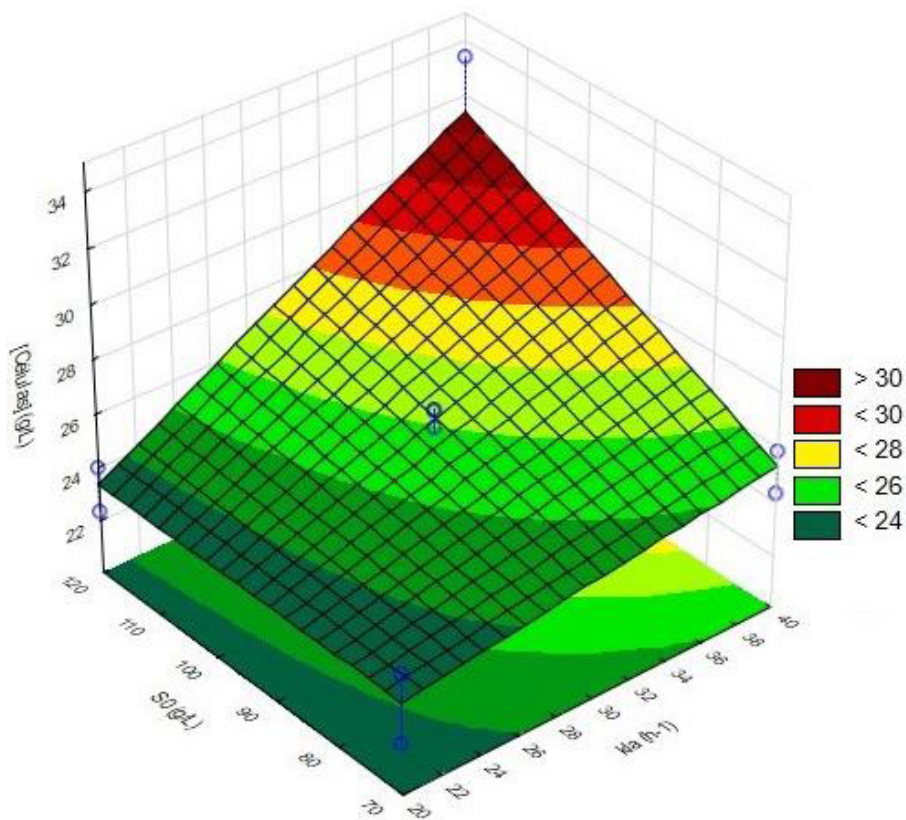
Fonte: Próprio autor.

Nas análises de variância constatou-se que os modelos apresentaram uma variação explicada pelas variáveis significativas de pelo menos 76% e uma máxima variação explicável maior que 83%. Esses resultados demonstram que os modelos foram capazes de explicar um mínimo de 76% da variação observada nos resultados do planejamento experimental, podendo chegar a um máximo de até 83% no caso das concentrações de células e carotenoides e a 87% no caso da concentração de

lipídeos. Dessa forma, os modelos foram considerados adequados para serem representados na forma de superfícies de resposta.

A Figura 27 apresenta a representação gráfica da superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração celular com 120 h de cultivo em função das variáveis k_{La} e S_0 . Verifica-se nesta figura que, dentro da região de estudo avaliada, a maior concentração celular alcançada foi de cerca de 33 g/L, a qual foi obtida com concentração inicial de glicerol de 120 g/L e k_{La} de 40 h⁻¹. Verificou-se ainda que para valores de k_{La} de 20 h⁻¹, a variação da concentração inicial de glicerol teve pouca influência na concentração final de células, a qual permaneceu próxima a 23 g/L. Este comportamento demonstra o efeito da interação entre k_{La} e S_0 , evidenciando que o ajuste concomitante destas variáveis é de grande importância para a otimização do processo.

Figura 27- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de células alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo, em função do k_{La} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.

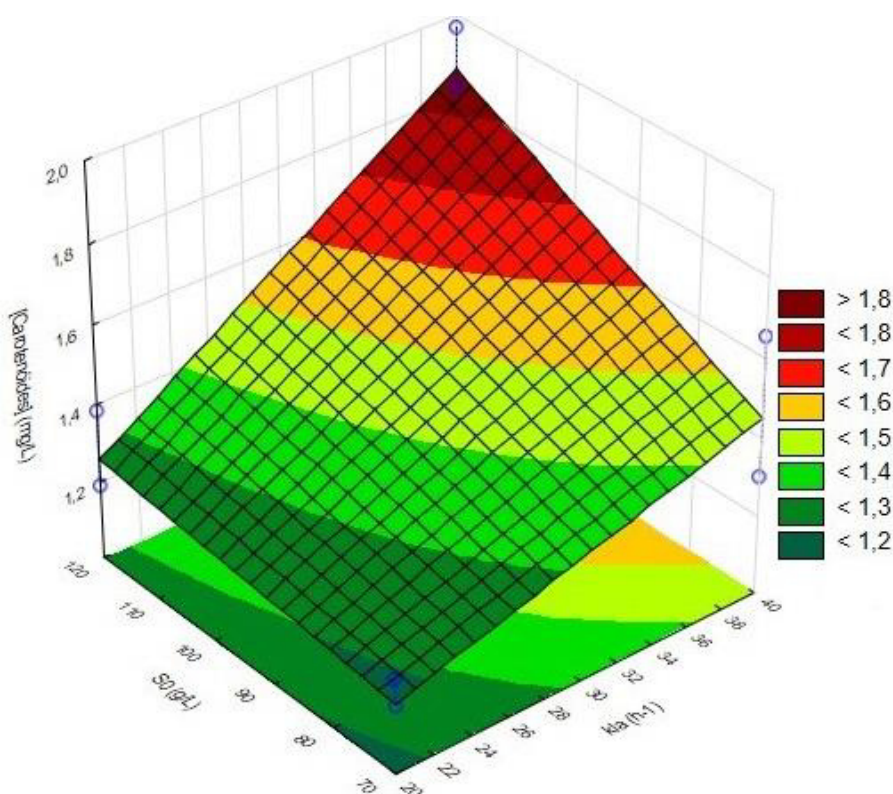


Fonte: Próprio autor.

O comportamento observado para a concentração celular pode indicar que para menores valores de k_{LA} , o oxigênio foi o fator limitante, restringindo o crescimento celular, independente da concentração de glicerol disponível. Quando a disponibilidade de oxigênio foi mantida em seu nível mais elevado ($k_{LA} = 40 \text{ h}^{-1}$), o aumento da concentração de glicerol levou a um aumento na concentração celular final de cerca de 24 para 36 g/L, o que representa uma elevação de aproximadamente 50% na produção de biomassa celular.

Na Figura 28 está apresentada a superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração final de carotenoides em função das variáveis k_{LA} e concentração inicial de glicerol. Verifica-se que a influência da concentração inicial de glicerol sobre a produção de carotenoides foi dependente do nível de disponibilidade de oxigênio. Quando o k_{LA} foi mantido em seu menor nível ($k_{LA} = 20 \text{ h}^{-1}$), a variação da concentração de glicerol teve pouca influência sobre a produção de carotenoides, a qual permaneceu próxima a 1,2 mg/L. Por outro lado, quando o k_{LA} foi mantido em seu maior nível ($k_{LA} = 40 \text{ h}^{-1}$), o aumento da concentração de glicerol levou a um aumento de 43% na concentração de carotenoides (de 1,4 para 2,0 mg/L).

Figura 28- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de carotenoides alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo, em função do k_{LA} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.

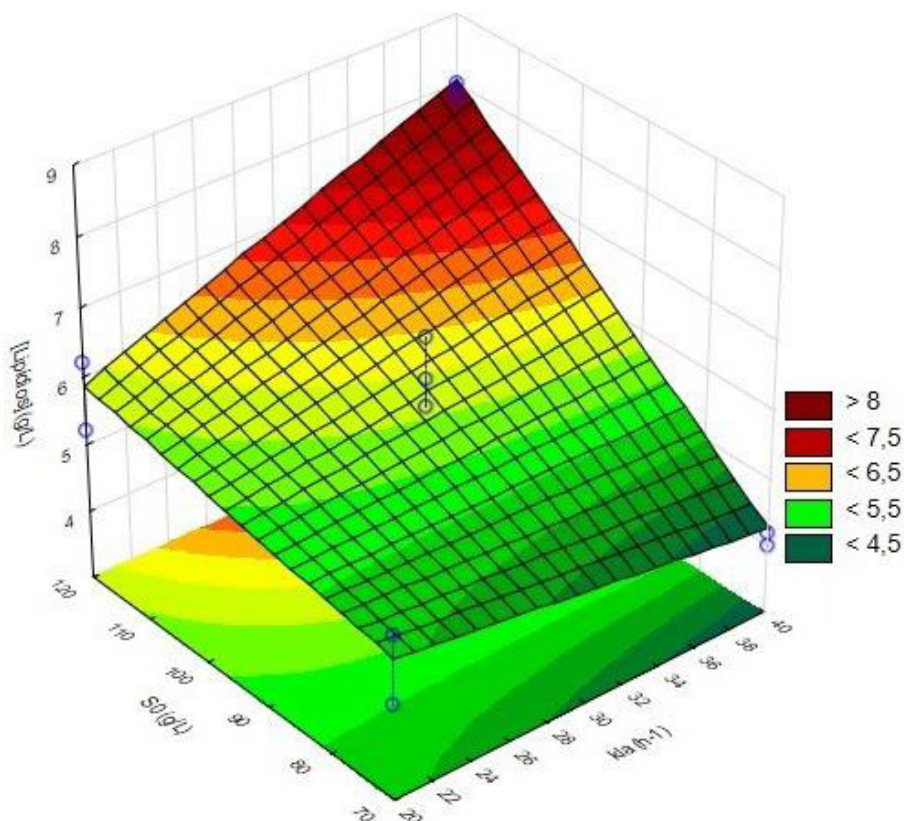


Fonte: Próprio autor.

De forma semelhante ao observado para a concentração celular, tanto o aumento da concentração inicial de glicerol, quanto o aumento do k_{La} levaram à maior produção de carotenoides pela levedura, sendo que a maior concentração deste metabólito, cerca de 2,0 mg/L em 120 horas, foi alcançada para cultivos realizados com uma concentração inicial de glicerol de 120 g/L e k_{La} de 40 h⁻¹.

Na Figura 29 é apresentada a superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração final de lipídeos em função das variáveis k_{La} e concentração inicial de glicerol. Pode-se observar que quando a concentração de glicerol foi mantida em 70 g/L, a elevação do k_{La} de 20 h⁻¹ para 40 h⁻¹ resultou em uma redução da concentração de lipídeos de 6 para 3 g/L. Esse comportamento pode ser explicado pelo uso da fonte de carbono para suprir as demandas do crescimento celular ao invés do acúmulo dos lipídeos de reserva, o que tornou-se possível devido à maior disponibilidade de oxigênio no meio. Tal hipótese é corroborada pelo comportamento observado na Figura 27, na qual a concentração celular aumenta com a elevação do k_{La} para cultivos realizados com concentração inicial de glicerol de 70 g/L.

Figura 29- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de lipídeos alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo, em função do k_{La} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.



Quando o valor de k_{LA} foi mantido em 20 h^{-1} e a concentração de glicerol foi elevada observou-se um aumento na produção de lipídeos de aproximadamente 20%, o que é um resultado esperado devido ao fato de que o acúmulo deste metabólito é favorecido pelo excesso da fonte de carbono. Ressalta-se também que quando a concentração inicial de glicerol foi mantida em 120 g/L , o aumento do k_{LA} de 20 h^{-1} para 40 h^{-1} resultou em um aumento da concentração de lipídeos de $6,0$ para $8,0 \text{ g/L}$, o que representa uma elevação de aproximadamente 33%.

De forma geral a tendência apresentada na Figura 29 evidencia que a elevação de ambas as variáveis estudadas, k_{LA} e S_0 , favorece o acúmulo de lipídeos, sendo que a maior concentração deste metabólito, $8,0 \text{ g/L}$, foi obtida no ensaio em que ambas as variáveis foram ajustadas na condição mais elevada.

Dentro da região estudada todos os modelos apresentaram um comportamento linear. De um modo geral, na análise das superfícies de resposta verificou-se que a elevação da concentração de glicerol, assim como do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, levou a um aumento das três respostas avaliadas.

Os efeitos do k_{LA} sobre a concentração celular e a produção de lipídeos observados corroboram com o descrito por Bento (2017), que avaliou a influência da aeração sobre a concentração de células e lipídeos da levedura *Rhodotorula glutinis*, tendo como principais variáveis de estudo a agitação e a relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$, sendo que no presente trabalho estas foram as variáveis que apresentaram maior influência sobre o k_{LA} e conseqüentemente sobre a transferência de oxigênio para o meio.

Bento (2017) cita que os maiores valores de concentração de células e lipídeos, $39,44 \text{ g/L}$ e $4,45 \text{ g/L}$ respectivamente, foram alcançadas para o tempo de 120 h de cultivo, nos experimentos em que empregou-se uma agitação de 250 rpm e uma relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ de $5,0$ e sugere que maiores valores podem ser obtidos proporcionando maiores níveis de aeração para o cultivo. Essa avaliação é semelhante à tendência observada no presente trabalho, ressaltando-se que apesar de o k_{LA} não ter apresentado efeito significativo sobre a produção de lipídeos, sua interação com a concentração inicial de glicerol se mostrou significativa, sendo então necessária sua elevação para maior produção do metabólito.

Já os efeitos do k_{LA} sobre a produção de carotenoides apresentam-se de acordo com observado no trabalho de Aksu e Eren (2007). Os autores constataram a elevação da produção de carotenoides pela levedura *Rhodotorula glutinis* de

63,4 mg/L, em um meio sem aeração, para 96,2 mg/L quando foi estabelecida uma aeração de 1,2 vvm.

Todavia os efeitos do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio sobre a produção de carotenoides devem ser melhor avaliados, uma vez que Silva (2014b), ao analisar a influência da agitação sobre a produção deste metabólito observou que sua produção foi maior em valores intermediários da variável estudada. O autor avaliou a produção de carotenoides com uma frequência de agitação de 120, 150 e 180 rpm, encontrando a maior produção (63,02 µg/g) em 72 h de cultivo e 150 rpm. Esses dados sugerem que após determinado nível de disponibilidade de oxigênio, a elevação desta variável não acarreta um aumento da produção de carotenoides, sendo necessário então ampliar os limites de estudo do k_{LA} para avaliar essa questão.

De modo geral, a tendência verificada em todas as superfícies de resposta sugere que maiores concentrações celulares, de carotenoides e lipídeos podem ser obtidas com cultivos realizados com concentrações de glicerol superiores a 120 g/L e coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio superior a 40 h⁻¹. Apesar da possibilidade de se prosseguir com os experimentos em frascos agitados aumentando-se a concentração de glicerol, o mesmo não poderia ser feito com o k_{LA} . Desta forma, optou-se por prosseguir o estudo em biorreatores de bancada, primeiramente realizando uma avaliação para selecionar o equipamento capaz de fornecer valores de k_{LA} adequados ao objetivo desse estudo.

5.3 Definição do biorreator e do dispersor para o cultivo

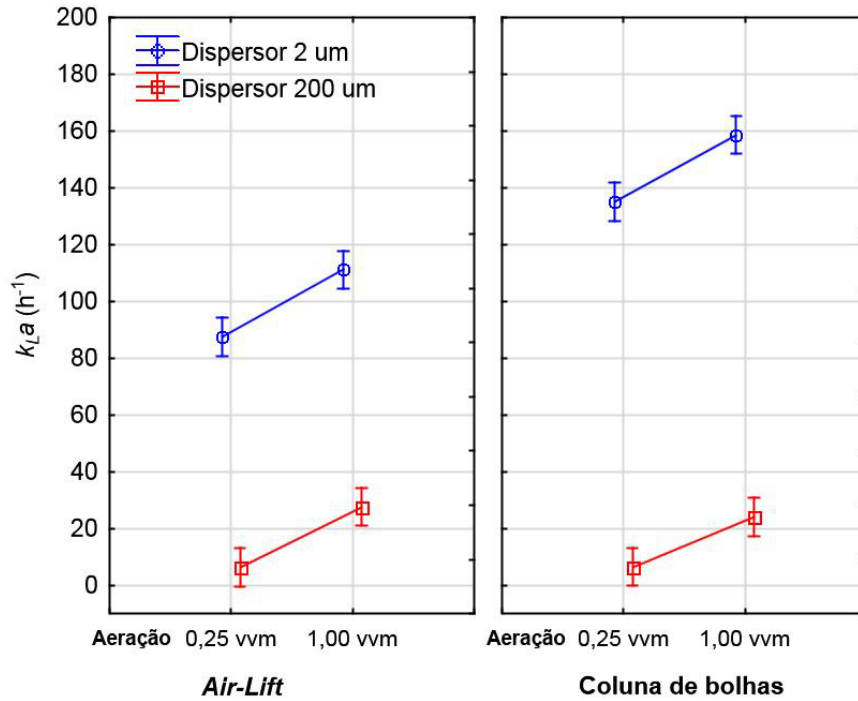
Os experimentos necessários para a seleção do modelo de reator e do dispersor, visando proporcionar condições de cultivo de elevado k_{LA} foram realizados segundo um planejamento experimental do tipo Taguchi L8. Todos os experimentos foram executados em triplicata, com dois níveis das variáveis aeração (0,25 e 1,0 vvm), tipo de reator (coluna de bolhas e *Air-lift*) e porosidade do dispersor (2,0 e 200 µm). Os resultados obtidos para os valores de k_{LA} e de tempo de mistura nessas condições são apresentados na Tabela 15, sendo também expostos nas Figuras 30 e 31 os efeitos dos fatores analisados sobre as variáveis resposta.

Tabela 15- Planejamento experimental tipo Taguchi L8 com triplicata dos ensaios para avaliação da influência das variáveis aeração, porosidade do dispersor e tipo de reator sobre as respostas k_{La} e tempo de mistura.

Ensaio	Variáveis						Respostas	
	Reator		Porosidade do dispersor		Aeração		k_{La} (h ⁻¹)	Tempo de mistura (s)
	Tipo	Nível	(μ m)	Nível	(vvm)	Nível		
1	Col. de bolhas	1	2	1	0,25	1	132,5	10
	Col. de bolhas	1	2	1	0,25	1	147,0	8
	Col. de bolhas	1	2	1	0,25	1	126,0	7
2	Col. de bolhas	1	2	1	1,00	2	169,6	5
	Col. de bolhas	1	2	1	1,00	2	154,7	3
	Col. de bolhas	1	2	1	1,00	2	151,7	6
3	<i>Air-Lift</i>	2	2	1	0,25	1	89,0	4
	<i>Air-Lift</i>	2	2	1	0,25	1	80,8	4
	<i>Air-Lift</i>	2	2	1	0,25	1	92,6	4
4	<i>Air-Lift</i>	2	2	1	1,00	2	109,6	3
	<i>Air-Lift</i>	2	2	1	1,00	2	114,8	3
	<i>Air-Lift</i>	2	2	1	1,00	2	109,0	2
5	Col. de bolhas	1	200	2	0,25	1	6,4	7
	Col. de bolhas	1	200	2	0,25	1	7,0	7
	Col. de bolhas	1	200	2	0,25	1	5,8	8
6	Col. de bolhas	1	200	2	1,00	2	23,5	3
	Col. de bolhas	1	200	2	1,00	2	24,4	3
	Col. de bolhas	1	200	2	1,00	2	24,1	6
7	<i>Air-Lift</i>	2	200	2	0,25	1	6,6	4
	<i>Air-Lift</i>	2	200	2	0,25	1	5,8	4
	<i>Air-Lift</i>	2	200	2	0,25	1	6,4	4
8	<i>Air-Lift</i>	2	200	2	1,00	2	27,1	3
	<i>Air-Lift</i>	2	200	2	1,00	2	27,6	3
	<i>Air-Lift</i>	2	200	2	1,00	2	28,1	3

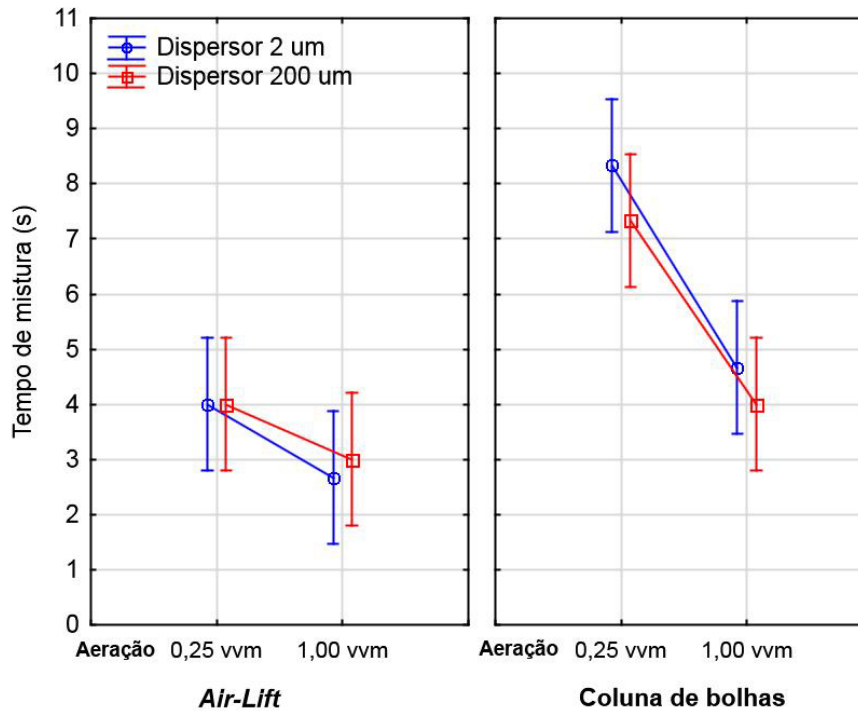
Fonte: Próprio autor.

Figura 30- Efeitos dos modelos de dispersor sobre o $k_{L,a}$ nos reatores *Air-lift* e Coluna de bolhas.



Fonte: Próprio autor.

Figura 31- Efeitos dos modelos de dispersor sobre o tempo de mistura nos reatores *Air-lift* e Coluna de bolhas.



Fonte: Próprio autor.

Avaliando os resultados apresentados na Tabela 15 verificou-se que os maiores valores de k_{LA} , cerca de 160 h^{-1} , foram obtidos com uso do dispersor de $2,0 \mu\text{m}$, no reator coluna de bolhas e com uma aeração de $1,0 \text{ vvm}$. Verificou-se ainda que, mesmo com a menor aeração avaliada ($0,25 \text{ vvm}$), o reator coluna de bolhas com dispersor de $2,0 \mu\text{m}$, proporcionaram valores de k_{LA} de cerca de 135 h^{-1} , ou seja, superiores aos alcançados nas demais condições que empregaram o reator *Air-lift* ou o dispersor de $200 \mu\text{m}$. De forma geral, quando utilizado o dispersor de $2,0 \mu\text{m}$ os valores encontrados no reator coluna de bolhas são em média superiores aos medidos no reator *Air-lift* em $42,7\%$, no caso da aeração de $0,25 \text{ vvm}$, e $54,5\%$ com a aeração de $1,00 \text{ vvm}$.

Com o uso do dispersor de $200 \mu\text{m}$, não houve diferença relevante entre os valores de k_{LA} observados comparando os reatores coluna de bolhas e *Air-lift*, quando a mesma aeração é aplicada. Com a aeração de $0,25 \text{ vvm}$ os valores de k_{LA} de ambos os reatores permaneceram próximos a 6 h^{-1} . Comportamento semelhante também foi observado para a aeração de $1,00 \text{ vvm}$, na qual os valores de k_{LA} ficaram próximos a 26 h^{-1} para ambos os modelos de reatores.

Na Figura 30 é apresentado o gráfico dos efeitos dos fatores estudados sobre o k_{LA} , em que é possível notar que o tipo de dispersor apresentou maior influência sobre o k_{LA} . Na Figura 30 é possível notar ainda que os maiores valores de k_{LA} são obtidos quando o dispersor de $2,0 \mu\text{m}$ é utilizado, sendo que no caso do reator coluna de bolhas, o valor médio de k_{LA} obtido com o uso do dispersor de $2,0 \mu\text{m}$ na aeração de $0,25 \text{ vvm}$ (135 h^{-1}) é cerca de 20 vezes superior ao valor obtido com o dispersor de $200 \mu\text{m}$ (6 h^{-1}) na mesma condição. Já na aeração de $1,00 \text{ vvm}$ o dispersor de $2,0 \mu\text{m}$ apresentou um k_{LA} de 160 h^{-1} , que é 7 vezes superior aos 26 h^{-1} obtidos com o dispersor de $200 \mu\text{m}$. Um comportamento semelhante também é observado no reator *Air-lift*, que com a aeração de $0,25 \text{ vvm}$ apresentou um k_{LA} de 6 h^{-1} com o dispersor de $200 \mu\text{m}$, ao passo que com o dispersor de $2,0 \mu\text{m}$, apresentou um k_{LA} de 90 h^{-1} , cerca de 15 vezes superior.

Analisando a Figura 30 é possível ainda notar que o modelo de biorreator não apresentou um efeito significativo sobre o valor de k_{LA} quando associado ao dispersor de $200 \mu\text{m}$, uma vez que os valores para essa resposta permaneceram em uma faixa semelhante, de aproximadamente 6 a 26 h^{-1} (respectivamente a $0,25$ e $1,0 \text{ vvm}$) em ambos os modelos. Já para a condição em que o dispersor de $2,0 \mu\text{m}$ foi utilizado, o reator coluna de bolhas apresentou maiores valores de k_{LA} , atingindo uma faixa de

aproximadamente 135 a 160 h⁻¹, enquanto no reator *Air-lift* os valores obtidos foram próximos a faixa de 90 a 110 h⁻¹.

No caso da aeração, observa-se que esse fator apresentou um efeito semelhante em todas as condições experimentais, permitindo que o k_La se elevasse em aproximadamente 20 h⁻¹ quando a aeração foi aumentada de 0,25 para 1,0 vvm. Esse efeito pode ser observado pela inclinação semelhante entre as retas ilustradas na Figura 30, o que sugere uma taxa de elevação semelhante em todos os casos.

Como segundo fator de avaliação, o tempo de mistura de cada reator foi mensurado utilizando ambos os dispersores com as aerações ajustadas em 0,25 vvm e 1,00 vvm. Comparando os dados apresentados na Figura 31 observa-se que os valores de tempo de mistura no reator *Air-lift* foram menores que os do coluna de bolhas. Quando utilizado o dispersor de 2,0 μm com a aeração de 0,25 vvm o tempo de mistura do *Air-lift* (4 s) foi cerca de 50% menor que os obtidos no coluna de bolhas (8 s), e 40% menor com 1,00 vvm de aeração (3 e 5 s, respectivamente). No caso do dispersor de 200 μm o reator *Air-lift* também apresentou tempos de mistura inferiores ao coluna de bolhas, sendo que essa variável assumiu valores 45% menores no caso da aeração de 0,25 vvm e 25% menores com a aeração ajustada em 1,00 vvm.

Analisando os dados apresentados na Figura 31 é possível notar que tratando-se do modelo de biorreator o *Air-lift* apresentou os menores valores de tempo de mistura, sendo este o fator de maior influência sobre esta resposta. O tipo de dispersor utilizado não apresentou um efeito significativo sobre o tempo de mistura, o que pode ser observado pela semelhança dos efeitos observados para ambos os modelos de biorreator. Já o aumento da aeração permitiu a obtenção de menores valores da variável resposta em todos os experimentos, sendo que este comportamento pode ser observado de forma mais evidente quando o reator coluna de bolhas foi utilizado.

Para melhor entender a influência do modelo de biorreator sobre o k_La e o tempo de mistura é necessário comparar também a velocidade superficial do gás em cada regime de operação. A velocidade superficial do gás é o quociente entre a vazão volumétrica de gás injetada no equipamento e a área da seção transversal da região de subida. A relação entre essa variável e o k_La é explicada por Krishna e Van Baten (2003), que citam que em uma mesma velocidade superficial de gás, o k_La nos biorreatores tipo *Air-lift* é significativamente menor que nos coluna de bolhas. Já no caso do tempo de mistura Buwa e Ranade (2008) e McCluere *et al.* (2017) mostram em seus trabalhos que, respectivamente, os reatores coluna de bolhas e *Air-lift* tem

seu tempo de mistura dependente da velocidade superficial do gás, apresentando comportamento inversamente proporcional a esta variável. Os valores assumidos pela velocidade superficial do gás em cada condição experimental do presente trabalho são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16- Valores calculados para a velocidade superficial do gás nos reatores dos tipos *Air-lift* e coluna de bolhas com aerações de 0,25 e 1,00 vvm.

Tipo de biorreator	Velocidade Superficial do gás (cm/min)	
	0,25 vvm	1,00 vvm
<i>Air-lift</i>	20,29	81,17
Coluna de bolhas	6,37	25,47

Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos experimentalmente podem ser explicados pelo fato de que mesmo com a velocidade superficial do gás no reator *Air-lift* sendo aproximadamente 3,2 vezes maior que a do coluna de bolhas, nas mesmas condições experimentais, a diferença não foi suficiente para que o k_{LA} deste equipamento superasse o valor do segundo dentro da região estudada.

O comportamento do k_{LA} perante a variação na velocidade superficial do gás pode ser observado nos resultados apresentados por Krishna e Van Baten (2003) que expõem dados, apresentados aqui de forma aproximada, em que uma variação na velocidade superficial do gás de 120 cm/min para 180 cm/min, gera uma elevação do k_{LA} de um reator coluna de bolhas de 72 h⁻¹ para 136,8 h⁻¹ enquanto em um reator *Air-lift* a mesma mudança gera uma alteração no k_{LA} de 14,4 h⁻¹ para 21,6 h⁻¹.

Nos dados apresentados por Krishna e Van Baten (2003) é possível notar que os valores assumidos pelo k_{LA} no reator coluna de bolhas são pelo menos 5 vezes maiores que no *Air-lift* em uma mesma velocidade superficial do gás. Pode-se também verificar que o menor valor de k_{LA} observado no reator coluna de bolhas é superior ao maior valor obtido no *Air-lift*, o que vai ao encontro do comportamento observado no presente trabalho.

Tratando-se do tempo de mistura, os menores valores obtidos, referentes ao reator *Air-lift* são justificados pela maior velocidade superficial do gás alcançada nesse reator em comparação ao coluna de bolhas. Os resultados observados vão ao encontro ao exposto por Buwa e Ranade (2008), que apresentam dados, expostos

aqui de forma aproximada, em que o tempo de mistura em um reator coluna de bolhas foi reduzido de 17 para 10 s quando a velocidade superficial do gás foi elevada de 18 para 42 cm/min.

Levando em consideração os fatores mensurados, k_{LA} e tempo de mistura, optou-se por utilizar na próxima etapa deste trabalho o reator coluna de bolhas, uma vez que este permitiu alcançar valores mais altos de k_{LA} que é a variável principal deste estudo. Apesar deste reator apresentar um tempo de mistura maior que o *Air-lift* o valor obtido para esta variável com 1 vvm de aeração é 1 segundo superior ao tempo do *Air-lift*, enquanto na aeração de 0,25 vvm é $3,3 \pm 0,58$ segundos maior, valor este que não foi considerado suficientemente alto para gerar efeitos significativos nos resultados do cultivo.

Tratando-se dos dispersores, os efeitos observados no k_{LA} em relação aos 2 tipos de equipamentos testados podem ser explicados pelas diferentes configurações de bolhas geradas por cada um deles nas condições experimentais, sendo que tais condições podem ser observadas nas Figuras 32 e 33 que apresentam as fotografias retiradas das bolhas formadas pelos dispersores testados em cada condição de aeração.

Figura 32- Registro fotográfico da distribuição de bolhas formado no reator coluna de bolhas pelo dispersor de 200 μm nas aerações de 0,25 vvm (a) e 1,0 vvm (b).

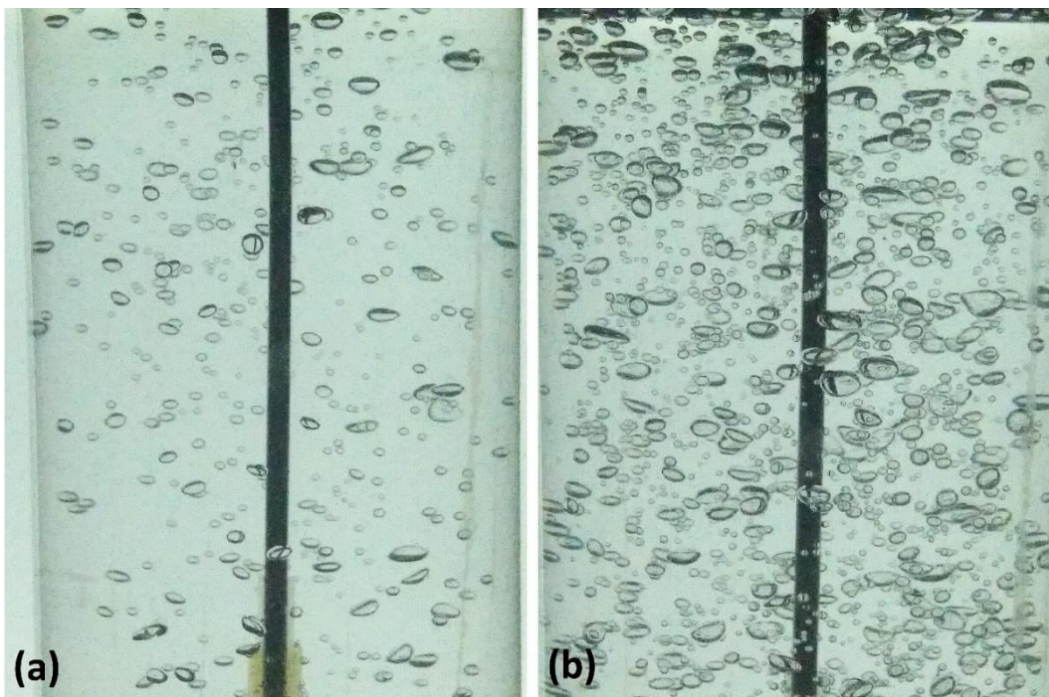
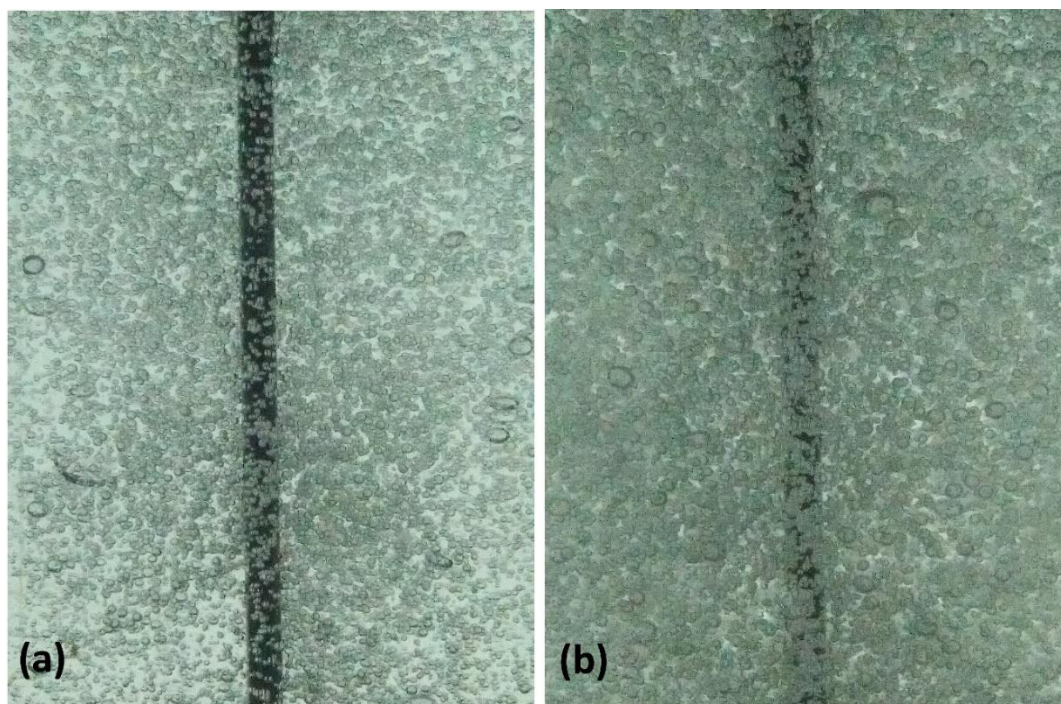


Figura 33- Registro fotográfico da distribuição de bolhas formado no reator coluna de bolhas pelo dispersor de 2,0 μm nas aerações de 0,25 vvm (a) e 1,0 vvm (b).



Fonte: Próprio autor.

Por análise qualitativa dos regimes apresentados nas Figuras 32 e 33 é possível notar que tratando-se da mesma condição de aeração, o dispersor de 200 μm gerou bolhas maiores, porém em menor quantidade que o dispersor de 2,0 μm . Pode-se também observar que, analisando um mesmo dispersor, o aumento da aeração de 0,25 para 1,0 vvm causou uma elevação na quantidade de bolhas geradas. Para fundamentar tal afirmação é apresentada na Tabela 17 a quantificação das bolhas em ambas as condições de aeração para os dispersores testados.

Tabela 17- Quantificação das bolhas produzidas pelos dispersores de 200 μm e de 2,0 μm nas aerações de 0,25 e 1,00 vvm em reator do tipo coluna de bolhas.

Dispersor	Aeração (vvm)	Medida	Medida	Medida	Média	Desvio
		1	2	3		
200 μm	0,25	372	411	388	390,33	19,60
	1,00	1.384	1.329	1.226	1.313,00	80,21
2,0 μm	0,25	3.774	3.377	3.367	3.506,00	232,15
	1,00	3.943	4.111	3.631	3.895,00	243,57

Fonte: Próprio autor.

É possível constatar que o dispersor de 2,0 μm gerou uma quantidade superior de bolhas que o dispersor de 200 μm , sendo que quando compara-se ambos os equipamentos com aeração de 1 vvm pode-se notar que o dispersor de 2,0 μm gerou uma quantidade de bolhas que corresponde a quase 3 vezes o valor gerado pelo equipamento de 200 μm . Tratando-se de um mesmo dispersor com diferentes aerações verifica-se que o incremento na aeração do equipamento de 200 μm causou um efeito mais expressivo que no de 2,0 μm . Deve-se porém observar que os valores de desvio encontrados para este último equipamento são consideráveis, sendo sua dimensão a principal justificativa para a menor elevação do número de bolhas do dispersor de 2,0 μm . Na Tabela 18 é apresentada a distribuição de tamanho de bolhas para as diferentes condições experimentais executadas.

Tabela 18- Distribuição do tamanho de bolhas para os dispersores de 200 μm e 2,0 μm nas aerações de 0,25 e 1,00 vvm, com limites de área estabelecidos pelo programa ImageJ.

Dispersor	200 μm				2,0 μm			
	0,25		1,00		0,25		1,00	
Aeração (vvm)	Área	Nº de	Área	Nº de	Área	Nº de	Área	Nº de
Nº de Agrupamentos	(cm ²)	bolhas	(cm ²)	bolhas	(cm ²)	bolhas	(cm ²)	bolhas
1	0,00064	339	0,00037	1228	0,00008	3356	0,00007	4076
2	0,00789	25	0,00645	28	0,01693	14	0,00828	12
3	0,01514	26	0,01253	18	0,03378	3	0,01649	4
4	0,02238	13	0,01862	20	0,05063	1	0,02470	6
5	0,02963	5	0,02470	11	0,06748	0	0,03291	5
6	0,03687	2	0,03078	12	0,08433	1	0,04112	2
7	0,04412	0	0,03686	3	0,10118	0	0,04933	4
8	0,05136	0	0,04294	1	0,11803	0	0,05754	1
9	0,05861	0	0,04903	4	0,13487	0	0,06575	0
10	0,06586	1	0,05511	4	0,15172	2	0,07396	1
Total		411		1329		3377		4111

Fonte: Próprio autor.

Pode-se constatar que o dispersor de 2,0 μm gerou bolhas de menor tamanho e em uma faixa mais definida, o que está de acordo com o comportamento observado nas Figuras 32 e 33. Dessa forma os maiores valores de k_{LA} atingidos pelo dispersor

de 2,0 μm são justificados pela característica das bolhas por este geradas, que se apresentaram em maior quantidade e em menor dimensão que as formadas pelo dispersor de 200 μm .

A influência das características das bolhas sobre o k_La é exposta por Condori Bustamante (2013) que cita que um maior número de bolhas de menor diâmetro possibilita a elevação da área de transferência de oxigênio e conseqüentemente o aumento do k_La , enquanto Najafpour (2007) além de reforçar tal afirmação, ainda cita que o tamanho das bolhas depende do tamanho do orifício e do tipo de aspersor.

Wongwailikhit *et al.* (2018) avaliaram a influência de dois grupos de dispersores sobre algumas variáveis de um reator coluna de bolhas, dentre estas o k_La . Os autores observaram que tratando-se de uma mesma velocidade superficial do gás, o que está atrelado a uma mesma vazão de gás para o reator, o grupo de dispersores com menores orifícios gerou bolhas menores e um k_La maior quando comparado com o grupo de dispersores com orifícios maiores nas mesmas condições.

As afirmações de Condori Bustamante (2013) e Najafpour (2007), bem como os resultados de Wongwailikhit *et al.* (2018) vão ao encontro do exposto no presente trabalho, em que se observou maiores valores de k_La atrelados ao dispersor que gerou menores bolhas e em maior quantidade, justificando assim os resultados obtidos. Devido aos maiores valores de k_La produzidos pelo dispersor de 2,0 μm , esse equipamento foi selecionado, juntamente com o reator coluna de bolhas, para execução dos cultivos.

5.4 Avaliação da influência da disponibilidade de oxigênio e da concentração inicial de substrato sobre a produção de carotenoides e lipídeos em biorreator

Nesta etapa do estudo foi avaliada a influência do k_La e da concentração inicial de glicerol sobre o crescimento celular e a produção de carotenoides e lipídeos em biorreatores tipo coluna de bolhas. Os ensaios foram realizados segundo um planejamento experimental 2^2 com faces centradas e repetições no ponto central, que é apresentado na Tabela 19 juntamente com os resultados obtidos nos ensaios. Pode-se observar que para todas as variáveis resposta analisadas, os três maiores valores obtidos estão relacionados aos ensaios onde ambos os fatores, k_La e concentração

inicial de glicerol, estão ajustados em seus níveis intermediários ou altos. Tal comportamento sugere uma tendência de aumento da concentração celular, de carotenoides e lipídeos como resultado do aumento do k_{LA} e de S_0 .

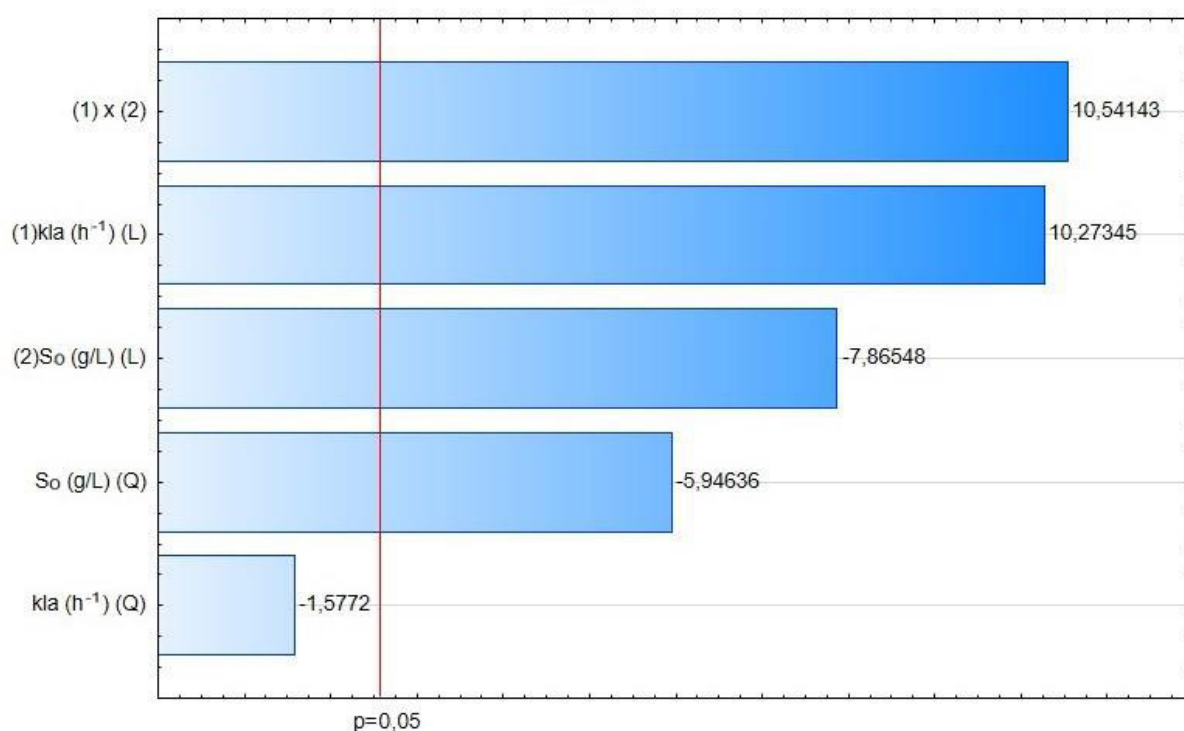
Tabela 19- Resultados obtidos para a concentração de células, carotenoides e lipídeos após 120 horas de cultivo em biorreatores coluna de bolhas com volume útil de 500 mL sob as diferentes condições do planejamento experimental.

Ensaio	Variáveis		Respostas		
	k_{LA} (h^{-1})	S_0 (g/L)	Células (g/L)	Lipídeos (g/L)	Carotenoides (mg/L)
1	175	250	20,51	12,52	5,59
2	175	160	21,99	8,40	4,82
3	175	70	18,44	5,80	5,02
4	75	250	11,53	3,80	1,76
5	75	160	17,29	5,60	2,91
6	75	70	19,79	4,20	2,00
7	125	250	16,67	10,00	3,52
8	125	70	19,92	8,48	4,56
9	125	160	20,57	8,60	5,47
10	125	160	19,46	7,00	5,91
11	125	160	19,54	7,80	5,26

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 34 é apresentado o Gráfico de Pareto para a análise dos efeitos principais, quadráticos e de interação do k_{LA} e de S_0 sobre a concentração celular, ao final de 120 horas de cultivo. Nesta análise verificou-se que foram considerados significativos os efeitos principais do k_{LA} e de S_0 , o efeito quadrático de S_0 e o efeito de interação entre o k_{LA} e S_0 . Esses resultados corroboram com o comportamento observado no cultivo em frascos agitados, em que ambos os fatores e sua interação apresentaram efeito significativo sobre a concentração celular.

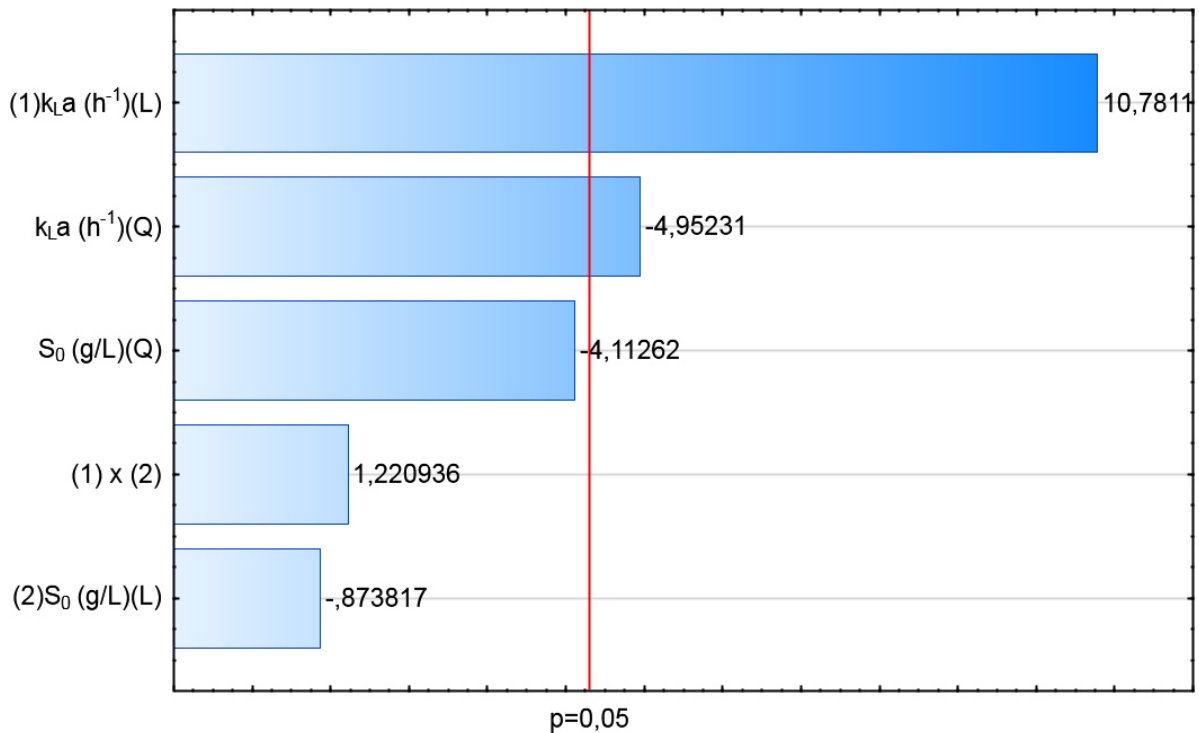
Figura 34- Gráfico de Pareto com os efeitos lineares, quadráticos e de interação dos fatores k_La e concentração inicial de glicerol (S_0), sobre a concentração de células ao final de 120 h de cultivo em biorreator coluna de bolhas.



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 35 é apresentado o Gráfico de Pareto para a resposta concentração de carotenoides. É possível notar que os efeitos linear e quadrático do k_La foram significativos para a concentração final deste metabólito, enquanto o efeito quadrático da concentração inicial de glicerol se mostrou próximo ao limite de significância. Os resultados obtidos também estão de acordo com o observado no cultivo em frascos agitados, uma vez que o fator com efeito majoritariamente significativo foi o k_La , que apresentou nesta etapa influência em sua forma linear e quadrática, e posteriormente a concentração inicial de glicerol, que aqui apresenta maior influência em sua forma quadrática.

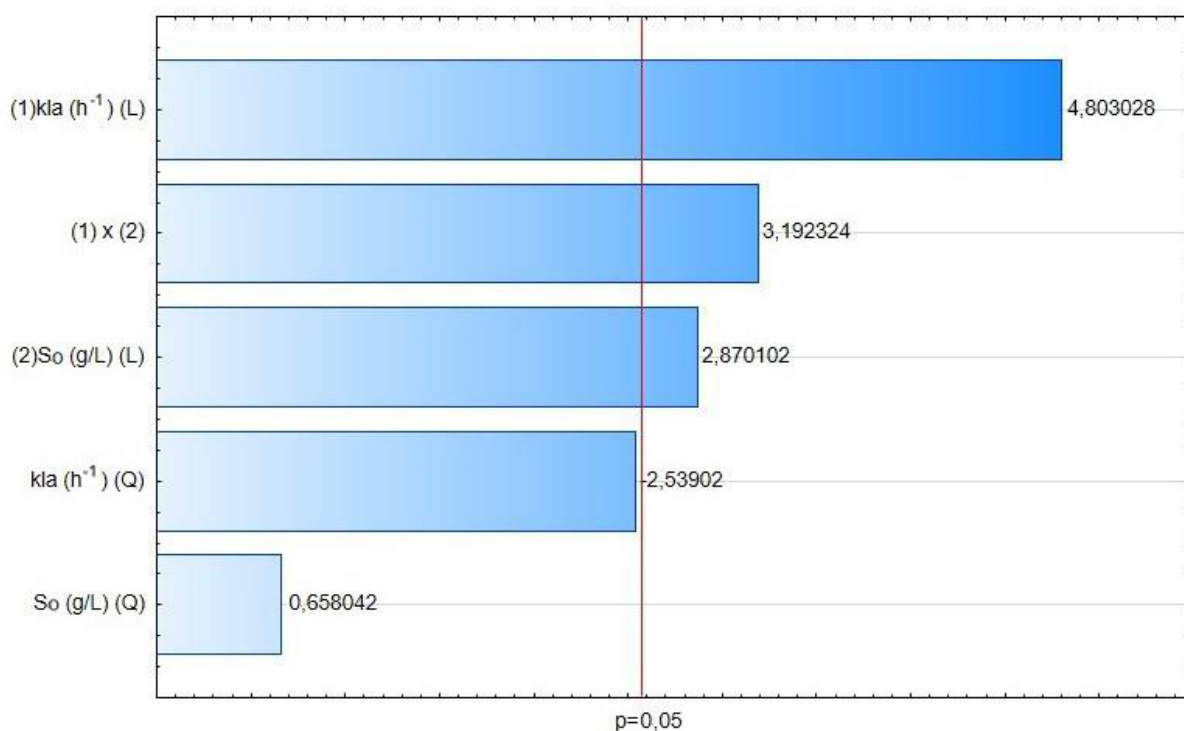
Figura 35- Gráfico de Pareto com os efeitos lineares, quadráticos e de interação dos fatores k_{La} e concentração inicial de glicerol (S_0), sobre a concentração de carotenoides ao final de 120 h de cultivo em biorreator coluna de bolhas.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 36 apresenta o Gráfico de Pareto para a resposta concentração de lipídeos. Nesta análise os dois fatores em sua forma linear, bem como sua interação apresentaram efeitos significativos sobre a produção de lipídeos, sendo que o k_{La} em sua forma quadrática apresentou um efeito próximo ao limite de significância, sendo assim mantido no modelo, enquanto a concentração inicial de glicerol em sua forma quadrática não foi significativa.

Figura 36- Gráfico de Pareto com os efeitos lineares, quadráticos e de interação dos fatores k_La e concentração inicial de glicerol (S_0), sobre a concentração de lipídeos ao final de 120 h de cultivo em biorreator coluna de bolhas.



Fonte: Próprio autor.

O resultado em questão se distingue do observado na etapa de frascos agitados devido a influência do k_La sobre a resposta analisada, todavia não se trata de uma constatação inesperada devido a alguns fatores como a influência do oxigênio sobre o metabolismo celular. Ressalta-se ainda que a diferença observada pode ser atribuída ao fato de que a faixa de variação do k_La utilizada nos experimentos em biorreatores foi muito mais ampla e com valores muito superiores aos aplicados em frascos agitados.

Com base nas variáveis significativas foram propostos modelos matemáticos para descrever o comportamento da concentração celular (Equação 8), concentração de carotenoides (Equação 9) e concentração de lipídeos (Equação 10), após 120 h de cultivo em um biorreator coluna de bolhas. As equações fundamentam-se nos valores reais do k_La (h^{-1}) e da concentração inicial de glicerol no meio de cultivo (g/L).

$$\text{Conc. Células} \left(\frac{g}{L} \right) = 22,71 - 0,05 * k_{La} - 0,01 * S_0 - (2,42 * 10^{-4}) * S_0^2 + 5,74 * 10^{-4} * k_{La} * S_0 \quad (8)$$

$$\text{Conc. Carotenoides} \left(\frac{mg}{L} \right) = -7,31 + 0,13 * k_{La} - 4,13 * 10^{-4} * k_{La}^2 + 3,25 * 10^{-2} * S_0 - 1,06 * 10^{-4} * S_0^2 \quad (9)$$

$$\text{Conc. Lipídeos} \left(\frac{g}{L} \right) = -1,85 + 0,15 * k_{La} - 6,62 * 10^{-4} * k_{La}^2 - 0,03 * S_0 + 3,96 * 10^{-4} * k_{La} * S_0 \quad (10)$$

Para avaliar a capacidade dos modelos propostos em prever os valores para o experimento em questão foram realizadas análises de variância (ANOVA) apresentadas nas Tabelas 20, 21 e 22, respectivamente para a concentração celular, de carotenoides e de lipídeos ao final do cultivo.

Tabela 20- Análise de variância dos efeitos principais, quadráticos e de interação: k_{La} (1) e concentração inicial de glicerol, S_0 (2), sobre a concentração celular ao fim das 120 horas de cultivo em um biorreator coluna de bolhas de 500 mL.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	p
(1) k_{La}	25,34	1	25,34	0,000093 *
(2) S_0	14,85	1	14,85	0,000410 *
S_0 (Q)	10,48	1	10,48	0,001041 *
(1) x (2)	26,68	1	26,68	0,000081 *
Residual	1,80	6	0,30	
Total	79,14	10		
Variação explicada pelas variáveis significativas:		96,21%		
Máxima variação explicável:		97,73%		

* Significativo a 95% de confiança.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 21- Análise de variância dos efeitos principais, quadráticos e de interação: k_{La} (1) e concentração inicial de glicerol, S_0 (2), sobre a produção de carotenoides ao fim das 120 horas de cultivo em um biorreator coluna de bolhas de 500 mL.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	<i>p</i>	
(1) k_{La}	12,79	1	12,79	0,001606	*
k_{La} (Q)	2,70	1	2,70	0,046665	*
(2) S_0	0,08	1	0,08	0,674843	
S_0 (Q)	1,86	1	1,86	0,083389	**
Residual	2,59	6	0,43		
Total	21,66	10			
Variação explicada pelas variáveis significativas:		80,03%			
Máxima variação explicável:		88,02%			

* Significativo a 95% de confiança.

** Significativo a 90% de confiança.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 22- Análise de variância dos efeitos principais, quadráticos e de interação: k_{La} (1) e concentração inicial de glicerol, S_0 (2), sobre a produção de lipídeos ao fim das 120 horas de cultivo em um biorreator coluna de bolhas de 500 mL.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática	<i>p</i>	
(1) k_{La}	28,69	1	28,69	0,002340	*
k_{La} (Q)	7,48	1	7,48	0,041931	*
(2) S_0	10,24	1	10,24	0,023514	*
(1) x (2)	12,67	1	12,67	0,015329	*
Residual	6,76	6	1,13		
Total	65,84	10			
Variação explicada pelas variáveis significativas:		82,90%			
Máxima variação explicável:		89,74%			

* Significativo a 95% de confiança.

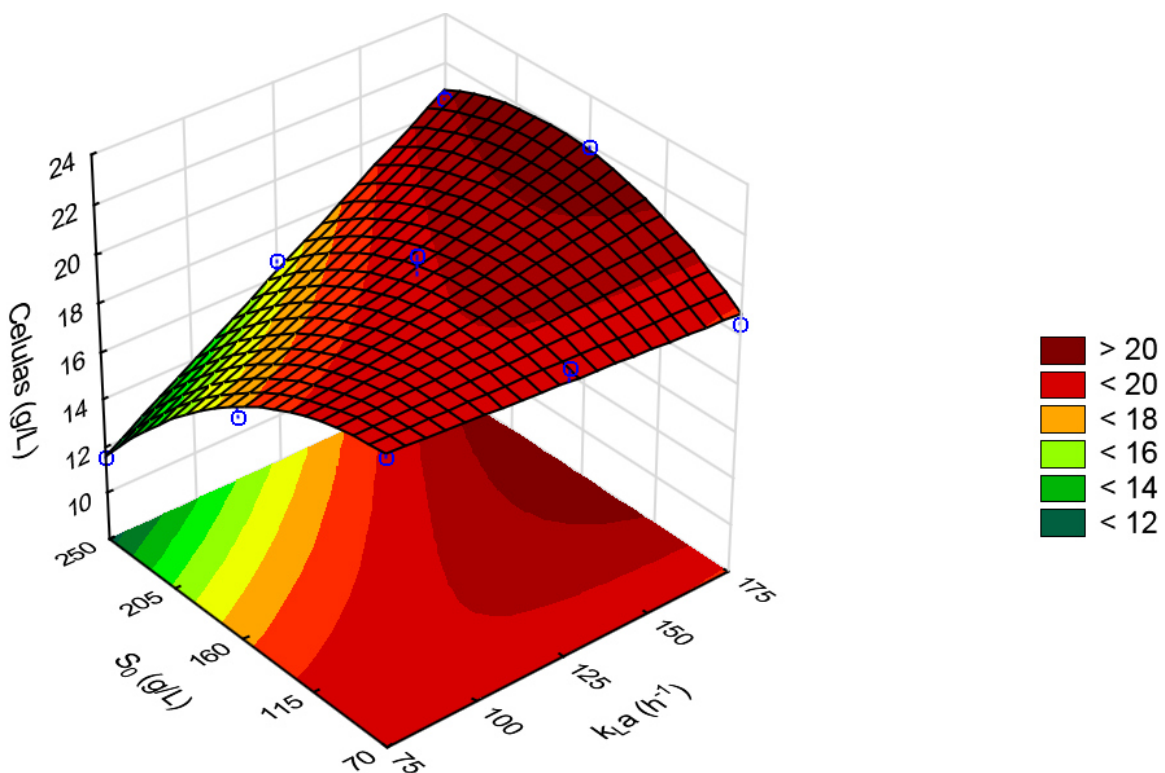
Fonte: Próprio autor.

Nas análises de variância realizadas para as respostas estudadas observa-se que a variação explicada pelas variáveis significativas foi de pelo menos 80%, enquanto a máxima variação explicada foi superior a 88%. Tratando-se da concentração celular, o modelo obtido foi capaz de explicar pelo menos 96,21% da variação observada nos resultados.

Ressalta-se que na análise de variância apresentada na Tabela 22 o valor de “ p ” menor que 0,05, referente ao k_{LA} em sua forma quadrática sugere que esse fator é relevante para o modelo em questão, em contraste com o resultado apresentado na Figura 36. Essa mudança de comportamento é explicada pela exclusão do fator S_0 em sua forma quadrática da análise de variância, o que causou a alteração nos valores de “ p ” dos demais fatores. Após estas análises os modelos matemáticos obtidos foram considerados adequados para serem representados na forma de superfícies de resposta.

Na Figura 37 é apresentada a superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração celular em função das variáveis k_{LA} e S_0 para o cultivo realizado em biorreatores tipo coluna de bolhas por 120 horas. Nesta figura pode-se observar que o maior resultado obtido foi de aproximadamente 22 g/L, na condição em que o k_{LA} foi ajustado em 175 h^{-1} e a concentração inicial de glicerol em 160 g/L.

Figura 37- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de células alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo em biorreator coluna de bolhas, em função do k_{LA} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.



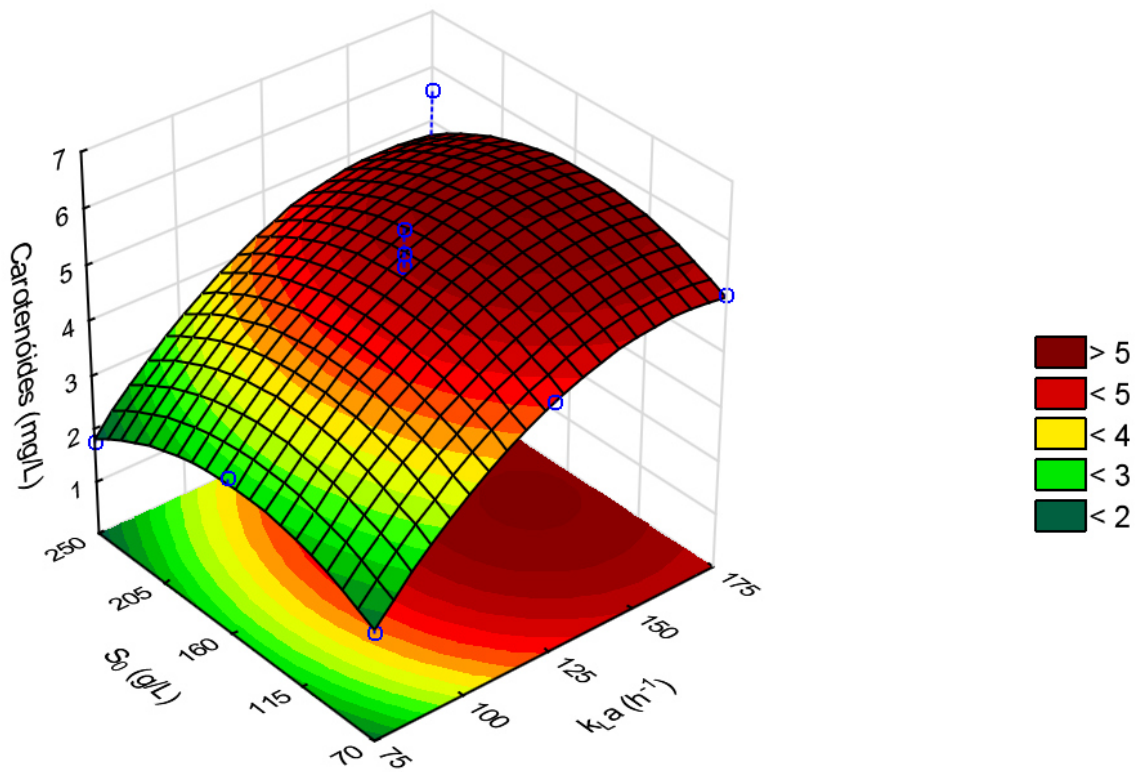
Fonte: Próprio autor.

A análise da superfície de resposta demonstra que os maiores valores de concentração celular foram obtidos na região em que a concentração inicial de glicerol foi mantida próxima a 160 g/L, associada a uma elevação dos valores de k_{LA} . Quando o valor da concentração inicial de glicerol é mantido fixo e aumenta-se o k_{LA} , observa-se uma tendência de elevação da concentração celular, sendo que a análise da figura sugere que maiores concentrações celulares podem ser obtidas quando ambos os fatores são elevados de forma conjunta, ressaltando-se porém que esse comportamento não é linear.

A necessidade de elevação conjunta das variáveis para obtenção de maiores concentrações celulares observada na Figura 37 pode ser explicada pela limitação do crescimento celular devido a restrição de um dos nutrientes, carbono ou oxigênio, nas condições em que o k_{LA} ou S_0 não foram ajustados de forma a suprir essa demanda, bem como os maiores valores de concentração celular obtidos com o ajuste de S_0 em 160 g/L e k_{LA} em 175 h^{-1} sugerem uma condição em que ambas as variáveis não limitam o crescimento celular.

Na Figura 38 pode-se observar a superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de carotenoides em função de k_{LA} e S_0 em que verifica-se que o maior valor obtido para esta resposta foi de aproximadamente 6,00 mg/L.

Figura 38- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de carotenoides alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo em biorreator coluna de bolhas, em função do k_{La} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.



Fonte: Próprio autor.

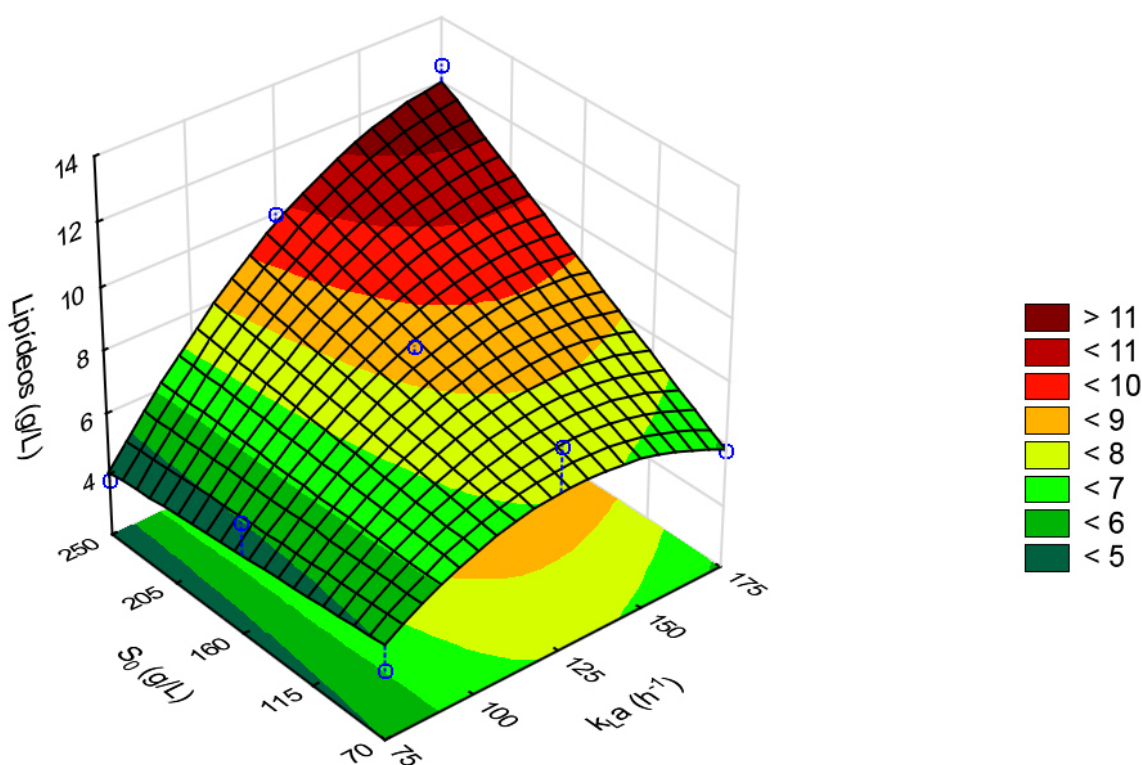
A produção de carotenoides apresentou um comportamento quadrático em relação as variáveis estudadas, havendo ainda um ponto de máxima. Para definir os valores de k_{La} e S_0 atrelados a este ponto foi aplicado o comando “*Solver*” do Excel® à Equação 9, inserindo como restrição para as variáveis os limites estabelecidos no planejamento experimental, ou seja, com o k_{La} limitado a valores entre 75 e 175 h^{-1} e S_0 entre 70 e 250 g/L. Como resposta o programa informou que a máxima produção seria obtida com $S_0= 153,3$ g/L e $k_{La}= 157,4$ h^{-1} , valores estes que vão ao encontro do comportamento observado na Figura 38.

É importante salientar que, para alcançar maiores concentrações de carotenoides, novas variáveis devem ser consideradas e que a inclusão destas variáveis pode levar a um ajuste diferente das condições de k_{La} e S_0 aqui encontradas. Todavia, no presente estudo, dentro dos limites experimentais considerados, os dados obtidos servem como base para o dimensionamento da produção deste metabólito.

A superfície de resposta para a concentração de lipídeos é representada na Figura 39, em que o maior valor obtido foi de 12,52 g/L, na condição onde o k_{La} e a

concentração inicial de glicerol foram mantidos em seus maiores valores. Pode-se notar que quando a concentração inicial de glicerol é mantida fixa e o k_{La} é elevado existe uma tendência de aumento na produção de lipídeos, bem como na situação em que o k_{La} é mantido em um valor fixo e a concentração inicial de glicerol é elevada. Ressalta-se, porém, que nesta última condição o aumento ocorre de forma mais discreta, o que vai ao encontro do apresentado no gráfico de Pareto da Figura 36, em que o efeito do k_{La} é maior que o da concentração inicial de glicerol.

Figura 39- Superfície de resposta que descreve o comportamento da concentração de lipídeos alcançada pela levedura em 120 horas de cultivo em biorreator coluna de bolhas, em função do k_{La} e da concentração inicial de glicerol (S_0) empregados nos cultivos.



Fonte: Próprio autor.

O comportamento observado na superfície de resposta sugere que a elevação conjunta dos fatores resulta em maiores concentrações do metabólito, uma vez que o maior valor obtido foi observado quando o k_{La} e a concentração inicial de glicerol estavam em seus maiores valores e também pelo fato de que as menores concentrações foram encontradas nas regiões onde uma das variáveis estava em seu valor mais alto e a outra no mais baixo. Esse comportamento vai ao encontro do observado no gráfico de Pareto da Figura 36, em que a interação entre os fatores foi

o segundo item de maior efeito, precedido pelo k_{La} e seguido pela concentração inicial de glicerol.

De forma geral, o comportamento observado nas superfícies de resposta de todas as variáveis demonstra que o k_{La} tem um efeito majoritário sobre as variáveis estudadas dentro da região avaliada, sendo que o aumento deste fator tende a favorecer a elevação das concentrações de células, carotenoides e lipídeos. Todavia ressalta-se que apesar de ter menor influência no processo, é necessário que a concentração inicial de glicerol seja conjuntamente elevada para que valores otimizados possam ser obtidos.

A influência positiva observada para o k_{La} sobre as variáveis estudadas vai ao encontro do apresentado por Manowattana *et al.* (2018), que avaliaram os efeitos da taxa de aeração sobre a concentração de células, carotenoides e lipídeos com a levedura *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 em um reator *Air-lift* utilizando glicerol oriundo da produção de biodiesel como fonte de carbono. Os autores realizaram experimentos com as aerações de 2,0, 4,0 e 6,0 vvm e observaram que as três respostas avaliadas atingiram seus maiores valores na condição de maior aeração, o que corrobora com o resultado obtido no presente estudo.

Com base nos resultados obtidos foram estabelecidas condições que permitissem minimizar o k_{La} e a concentração inicial de glicerol e ao mesmo tempo maximizar a concentração de lipídeos. Estabeleceu-se então uma produção mínima desejada de 11 g/L de lipídeos, que segundo o modelo apresentado na equação 10 seria alcançada com um k_{La} de 125 h^{-1} associado a concentração inicial de glicerol de 230 g/L. Com base nestas condições os modelos apresentados nas equações 8 e 9, referentes a produção de células e carotenoides respectivamente, foram aplicados visando prever os valores para essas respostas na condição citada.

5.4.1 Ensaio de confirmação

Os resultados obtidos no ensaio de confirmação bem como os valores previstos nos modelos matemáticos para a produção de células, carotenoides e lipídeos são apresentados na Tabela 23.

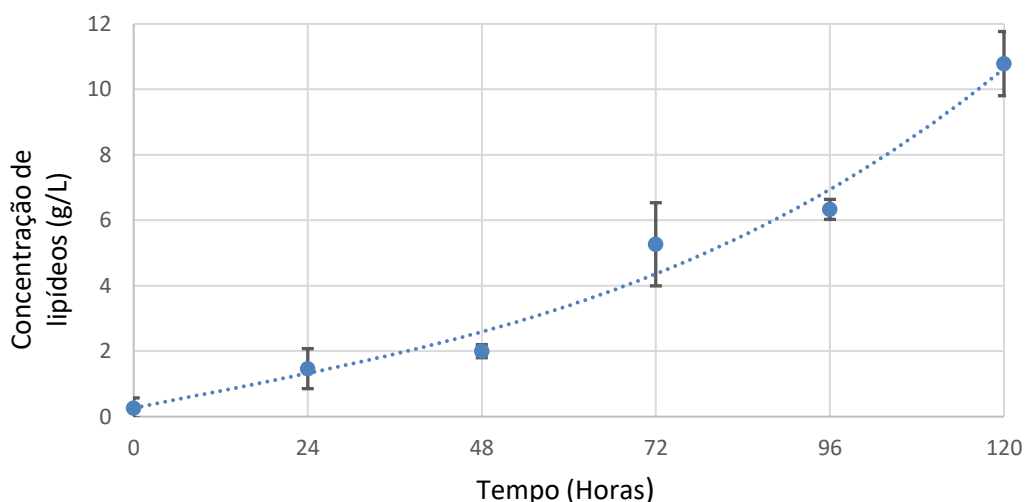
Tabela 23- Valores calculados e resultados obtidos no ensaio de confirmação para a concentração de células, carotenoides e lipídeos após 120 horas de cultivo.

	Conc. Células (g/L)	Conc. Carotenoides (mg/L)	Conc. Lipídeos (g/L)
Ensaio de confirmação	22 ± 1	3,5 ± 0,3	11 ± 1
Valor previsto pelo modelo	18 ± 2	4 ± 2	11 ± 3

Fonte: Próprio autor.

De modo geral foram alcançados no ensaio de confirmação concentrações de células, carotenoide e lipídeos (22 g/L, 3,5 mg/L e 11 g/L, respectivamente) próximos aos previstos pelos modelos (18 g/L, 4 mg/L e 11 g/L, respectivamente). Tratando-se da produção de lipídeos os dados apresentados demonstram que os cultivos atingiram valores próximos ao estimado pelos modelos inicialmente. Deste as respostas avaliadas, a produção de lipídeos foi a que mais se assemelhou ao previsto pelo modelo, uma vez que este foi o parâmetro tido como base para a escolha das condições deste ensaio. A evolução na concentração de lipídeos ao longo do cultivo é apresentada na Figura 40, bem como a porcentagem mássica de lipídeos na biomassa nas diferentes etapas do presente estudo é apresentada na Tabela 24.

Figura 40- Evolução na concentração de lipídeos ao longo das 120 horas de cultivo do ensaio de confirmação.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 24- Teor mássica de lipídeos na biomassa alcançada durante diferentes etapas do presente estudo.

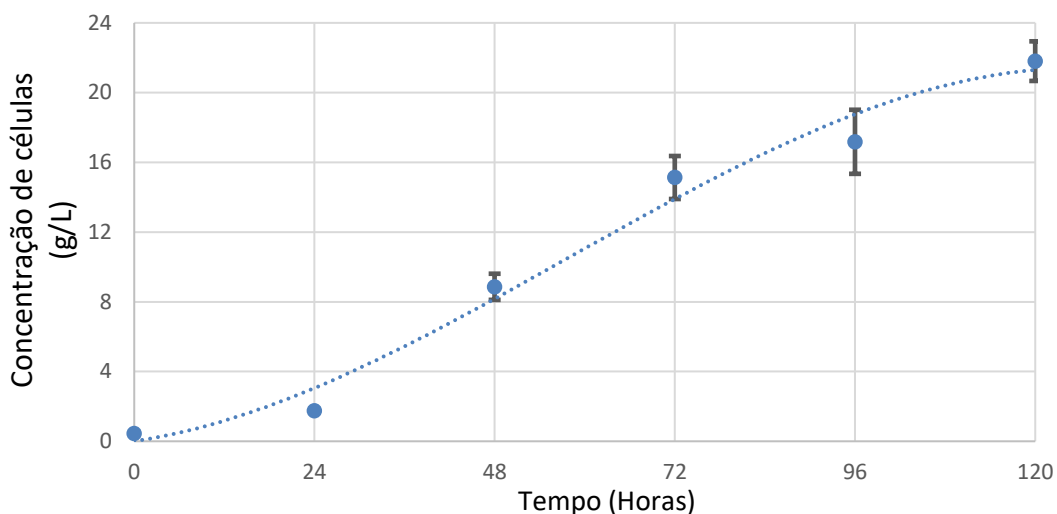
Etapa do estudo	k_{La} (h⁻¹)	Concentração inicial de glicerol (g/L)	Teor de lipídios (% m/m)
Frascos agitados	40	120	28%
Biorreator (máxima aeração avaliada)	175	250	61%
Biorreator (condição selecionada)	125	230	51%

Fonte: Próprio autor.

É possível observar uma tendência de aumento da porcentagem mássica de lipídeos na biomassa com a elevação das variáveis estudadas, uma vez que comparando os valores obtidos no estudo em frascos agitados com os do ensaio de confirmação, nota-se um aumento de 28 para 51% nesta resposta. Da mesma forma é possível observar um decréscimo desta porcentagem quando compara-se os resultados alcançados no cultivo em biorreatores, em que ambas as variáveis estudadas estavam ajustadas em maiores valores, com os apresentados no ensaio de confirmação.

No caso da concentração de células os resultados encontrados no ensaio de confirmação (22 ± 1 g/L) foram discretamente superiores aos previstos no modelo (18 ± 2 g/L). No caso dos carotenoides a concentração atingida de $3,5 \pm 0,3$ mg/L também se manteve dentro da margem esperada, que era de 4 ± 2 mg/L. Os desvios relacionados a ambas as respostas foram baixos, mostrando que os modelos são adequados para descrever o comportamento do processo. Na Figura 41 é apresentada a evolução na concentração de células ao longo das 120 h de cultivo.

Figura 41- Evolução na concentração de células ao longo das 120 horas de cultivo do ensaio de confirmação.



Fonte: Próprio autor.

Os valores obtidos para a concentração de carotenoides foram próximos aos resultados obtidos na etapa anterior deste trabalho. Nessa etapa, cujos resultados são apresentados na Tabela 19, em uma condição semelhante, em que o k_La foi ajustado em 125 h^{-1} e a concentração inicial de glicerol em 250 g/L a concentração de carotenoides obtida foi de $3,52 \text{ mg/L}$, valor praticamente idêntico aos $3,50 \text{ mg/L}$ obtidos no cultivo de confirmação.

A concentração de carotenoides foi quantificada somente ao final do cultivo, todavia a evolução na concentração deste metabólito pode ser percebida qualitativamente pela tonalidade do meio de cultivo ao longo do tempo (devido a sua coloração característica). Na Figura 42 são apresentadas imagens do biorreator em intervalos de 24 horas, pode-se verificar que a coloração se desenvolveu de forma mais intensa a partir de 96 horas de cultivo, não sendo percebida alteração importante antes deste período.

Figura 42- Evolução na concentração de carotenoides ao longo das 120 horas de cultivo do ensaio de confirmação, para um dos experimentos realizados.



Fonte: Próprio autor.

Na Tabela 25 está apresentada uma comparação de resultados do presente estudo, referentes a produção simultânea de lipídeos e carotenoides, bem como da produção de biomassa celular e tempo de cultivo, com estudos que reportam o emprego de leveduras do gênero *Rhodotorula* com a mesma finalidade.

Tabela 25- Comparação entre os resultados obtidos pelas referências para cultivos realizados com leveduras do gênero *Rhodotorula* e os valores obtidos no presente estudo.

Referência	Fonte de Carbono	Tempo de Cultivo (h)	Células (g/L)	Carotenoides (mg/L)	Lipídeos (g/L)
Pereira <i>et al.</i> (2019)	Glicerol	288	21,0	2,8	10,7
Yen e Chang (2015)	Hidrolisado lignocelulósico	72	20,0	9,7	6,9
Kot <i>et al.</i> (2017)	Água residual e Glicerol	72	19,4	3,7	2,1
Presente estudo	Glicerol	120	22 ± 1	3,5 ± 0,3	11 ± 1

Fonte: Pereira *et al.* (2019); Yen e Chang (2015); Kot *et al.* (2017).

Os resultados observados por Pereira *et al.* (2019) foram obtidos em um meio composto por 10,4 g/L de glicerol cru, 4,3 g/L de peptona, 2,6 g/L de extrato de malte

e 3,4 g/L de extrato de levedura. O experimento foi conduzido em batelada alimentada, com a injeção de 20 mL de uma solução aquosa de glicerol (104 g/L) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 g/L) por 3 vezes ao longo do tempo de cultivo. Yen e Chang (2015) obtiveram seus resultados em um meio composto por hidrolisado lignocelulósico, oriundo de palha de arroz, com uma concentração de açúcares redutores de 60 g/L, 2 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L de CaCl_2 e 0,1 g/L de NaCl . Kot *et al.* (2017) por sua vez utilizaram um meio composto por água residual do processamento de batatas para produção de amido. Essa solução apresentava um teor total de proteínas de 12,9 g/L, de açúcares redutores de 13,8 g/L e foi suplementada com glicerol em uma concentração de 50 g/L.

Na Tabela 25 pode-se observar que, no presente estudo, a concentração celular atingiu um valor de 22 g/L em 120 h de cultivo. Esse resultado foi próximo aos 21 g/L obtidos por Pereira *et al.* (2019), bem como aos 20,0 e 19,4 g/L reportados respectivamente por Yen e Chang (2015) e Kot *et al.* (2017), ressaltando-se que as referências apresentaram diferentes tempos de cultivo.

Tratando-se dos metabólitos de interesse, o valor alcançado para a concentração de carotenoides no presente trabalho foi de 3,5 mg/L. Esse resultado aproxima-se dos 3,7 mg/L reportado por Kot *et al.* (2017), bem como dos 2,8 mg/L reportados por Pereira *et al.* (2019), assumindo valores menores somente que os 9,7 mg/L apresentados por Yen e Chang (2015). Todavia, é necessário salientar que no presente estudo as condições de cultivo foram ajustadas visando a maximização da produção de lipídeos, sendo a concentração de carotenoides resultante deste ajuste. Vale salientar ainda que, segundo o modelo, concentrações de carotenoides próximas a 6 mg/L poderiam ser obtidas, considerando as diferentes condições de cultivo, dentro da região de variação estudada.

No que se refere à concentração de lipídeos o resultado alcançado no presente estudo, 11 g/L, foi superior aos 6,9 e 2,1 g/L reportados por Yen e Chang (2015) e Kot *et al.* (2017), respectivamente, e assumiu um valor próximo aos 10,7 g/L reportado por Pereira *et al.* (2019), porém em um menor tempo de cultivo.

De forma geral, o presente estudo permitiu avaliar a influência da disponibilidade de oxigênio e sua relação com a concentração inicial de glicerol, sobre a produção simultânea de lipídeos e carotenoides. Verificou-se ainda que as condições de cultivo que maximizam a produção de lipídeos podem não coincidir com as condições ótimas para a produção de carotenoides. Neste contexto o emprego dos modelos que

descrevem o comportamento da produção de tais metabólitos pode ser uma ferramenta importante para estabelecer as condições de processo que atendam da melhor forma possível as necessidades pretendidas para o bioprocessamento. Tais modelos podem ainda ser utilizados em conjunto com outras ferramentas de análises técnico-econômicas, para estabelecer de forma mais robusta as condições de maior interesse para o desenvolvimento do processo.

6 Conclusões

Na avaliação da transferência de oxigênio em frascos agitados, verificou-se que tanto a frequência de agitação quanto a relação entre $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$, e a interação entre estas variáveis apresentaram efeito significativo sobre o k_{La} .

No cultivo da levedura *Rhodotorula glutinis* NRRL-Y-12905 realizados em frascos agitados verificou-se que o aumento do k_{La} e da concentração inicial de glicerol proporcionou um aumento da concentração de células, carotenoides e lipídeos, demonstrando a influência positiva de tais fatores na produção dos metabólitos de interesse.

Na seleção do biorreator para operações com elevado k_{La} verificou-se que, em comparação ao reator do tipo *Air-lift*, o reator tipo Coluna de Bolhas possibilitou alcançar maiores valores de k_{La} para o meio de cultivo empregando dispersores com mesma porosidade e sob mesma vazão de ar. Quanto a comparação da porosidade do dispersor de ar, verificou-se que, em comparação ao dispersor de porosidade de 200 μm , os dispersores de 2,0 μm de tamanho de poro possibilitaram alcançar valores de k_{La} consideravelmente maiores, gerando bolhas de menor dimensão e em maior quantidade para uma mesma vazão de ar.

Nos cultivos da levedura realizados em biorreatores do tipo coluna de bolhas sob diferentes condições de k_{La} e da concentração inicial de glicerol, verificou-se que tanto o k_{La} quanto a concentração inicial de glicerol apresentam influência significativa sobre a produção simultânea de carotenoides e lipídeos, de forma que maiores concentrações destes metabólitos podem ser obtidas com o ajuste das variáveis estudadas. Verificou-se ainda que as condições de cultivo que maximizam a produção de lipídeos podem não coincidir com as condições ótimas para a produção de carotenoides, e que o emprego dos modelos que descrevem o comportamento da produção de ambos os metabólitos pode ser uma ferramenta importante para estabelecer as condições de processo que atendam da melhor forma possível as necessidades pretendidas para o processo de bioconversão.

Referências

- ADRIO, J. L. Oleaginous Yeasts: Promising Platforms for the Production of Oleochemicals and Biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 114, n. 9, 2017.
- AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA. **Introduction Biorefinery Fact Sheets**. 4 de Junho de 2016. Disponível em: <http://task42.ieabioenergy.com/document-category/factsheets/>. Acesso em: 01 out. 2018.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIODIESEL. **Anuário estatístico 2019**. 27 Jun. 2019. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/5237-anuario-estatistico-2019>. Acesso em: 05 dez. 2019.
- AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107-113, 2007.
- ALMEIDA, R. N.; BARRETO, E. G. C.; COUTO, H. J. B. Avaliação de tamanho de bolhas em coluna de flotação por análise de imagem usando os softwares ImageJ e APBS. **Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração**. v. 16, n. 3, p. 378-385, 2019.
- ANDRADE, R. F. S. *et al.* Production of β -Carotene by a Newly Isolated *Rhodotorula glutinis* UCP1555 Strain and Cytotoxic Effect Evaluation. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**. v. 10, n. 5, p. 212-220, 2016.
- ATABANI, A. E. *et al.* A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012.
- AVALOS, J.; LIMÓN, M. C. Biological roles of fungal carotenoids. **Current Genetics**. v. 61, n. 3, p. 309-324, 2015.
- BNDES - BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Panoramas setoriais 2030: Desafios e oportunidades para o Brasil**. Rio de Janeiro: BNDES, 2017.
- BARBATO, J. **Estudo da obtenção de carotenoides por fermentação empregando a levedura *Rhodotorula sp* em melaço e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura**. 2014. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.
- BÉLIGON, V. *et al.* Improvement and modeling of culture parameters to enhance biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* grown on acetate. **Bioresources Technology**, v. 192, p. 582-591, 2015.
- BENTO, T. F. S. R. **Produção de lipídios microbianos por leveduras empregando glicerol como principal fonte de carbono**. 2017. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.
- BORZANI, W. *et al.* **Biotechnologia Industrial: Fundamentos**. 1. ed., São Paulo: Blucher, 2001. v. 1.

BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid Biotechnology in Plants for Nutritionally Improved Foods. **Physiologia Plantarum**, v. 126, n. 3, p. 369-381, 2006.

BUWA, V. V.; RANADE, V. V. Mixing in Bubble Column Reactors: Role of Unsteady Flow Structures. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**. v. 81, n. 3-4, p. 402-411, 2008.

CABRAL, M. M. S. **Otimização da bioprodução de carotenoides por uma nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus***. 2010. 62f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2010.

CAO, S. *et al.* Improving of lipid productivity of the oleaginous microalgae *Chlorella pyrenoidosa* via atmospheric and room temperature plasma (ARTP). **Bioresource Technology**. v. 244, p. 1400-1406, 2017.

CASTELO BRANCO, L. S. **Produção de carotenoides por linhagens do gênero *Rhodotorula* utilizando glicerol como fonte de carbono**. 2015. 106 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e Transferência de Oxigênio em Três Biorreatores Airlift de Circulação Interna Geometricamente Semelhantes**. 2009. 157f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2009.

CONDORI BUSTAMANTE, M. C. **Transferência de oxigênio e condições de cisalhamento em biorreator convencional com impelidores Orelha de Elefante**. 2013. 197f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2013.

DIAS, C. *et al.* Yeast and Microalgal symbiotic cultures using low-cost substrates for lipid production. **Bioresources Technology Reports**. v. 7, 2019.

EMBRAPA AGROENERGIA. **Biorrefinarias**. Brasília, 2011.

EPE – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano de 2018**. Rio de Janeiro, 2019.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 101-105, 2011.

FERRARI, R. A. *et al.* Biodiesel de soja- Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química nova**, v.28, n. 1, p. 19-23, 2005.

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

FRANÇA, R. R. F. *et al.* Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 α -desmetilase Contra *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual Química**, v.6, n. 5, p. 1483-1516, set. 2014.

FREITAS, C. *et al.* Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. **Bioresource Technology**. v.158, p. 355–359, 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.

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

JINGYANG, X. *et al.* Bioconversion of glycerol into lipids by *Rhodospiridium toruloides* in a two-stage process and characterization of lipid properties. **Engineering in Life Sciences**, v.17, p. 303–313, jul. 2016.

KADIC, E.; HEINDEL, T. J. **An Introduction to Bioreactor Hydrodynamics and Gas-Liquid Mass Transfer**. 1 ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2014.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O. Bubble Column reactors. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 2263-2283, 2005.

KOT, A. M. *et al.* *Rhodotorula glutinis* - potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 14, p. 6103-6117, 2016.

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, p. 25-31, 2017.

KOTIKOVA, Z. *et al.* Carotenoid profile and retention in yellow, purple and red-fleshed potatoes after thermal processing. **Food Chemistry**. v. 197, p. 992-1001, abr. 2016.

KRISHNA, R.; VAN BATEN J. M. Mass transfer in bubble columns. **Catalysis Today**. v. 7980, p. 67-75, 2003.

KUMAR, R. R. *et al.* Performance evaluation of a yeast biorefinery as a sustainable model for co-production of biomass, bioemulsifier, lipid, biodiesel and animal-feed components using inexpensive raw materials. **Sustainable Energy Fuels**. v. 1, p. 923-931, 2017.

LIU, Y. S.; WU, J.; HO, K. P. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. **Biochemical Engineering Journal**. v. 27, n. 3, p. 331-335, 2006.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and Characterization of Carotenoid-Producing Yeasts from Campinas Region, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 65-70, 2007.

MANOWATTANA, A. *et al.* Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol into lipids and carotenoids by an oleaginous red yeast *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 in an airlift bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 125, n. 1, p. 59-66, 2018.

MATA-GÓMEZ, L. C. *et al.* Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**. v. 13, n. 12, jan. 2014.

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, p. 205-213, 2017.

MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.

MENDES, C. E. **Avaliação das condições hidrodinâmicas, de transferência de oxigênio e de cisalhamento em diferentes modelos e escalas de reatores pneumáticos**. 2016. 239f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

MERTINS, O. **Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compostas de fosfatidilcolina da lecitina de soja e quitosana**. 2004. 78f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoids: Properties, Applications and Market. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 672–688., abr. 2017.

MOUTAFCHIEVA, D. *et al.* Experimental determination of the volumetric mass transfer coefficient. **Journal of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 48, n. 4, p. 351-356, 2013.

NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2007.

NELLIS, S. C.; CORREIA, A. F. K.; SPOTO, M. H. F Extração e quantificação de carotenoides em minitomate desidratado (*Sweet Grape*) através da aplicação de diferentes solventes. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 20, 2016.

OFFICE OF ENERGY EFFICIENCY & RENEWABLE ENERGY. **Map: Integrated Biorefineries**. Disponível em: <https://www.energy.gov/eere/bioenergy/maps/map-integrated-biorefineries>. Acesso em: 01 dez. 2019.

OFFICE OF ENERGY EFFICIENCY & RENEWABLE ENERGY. **Secretary of Energy Rick Perry Announces Integrated Biorefinery Optimization Projects**. 20 Set. 2017. Disponível em: <https://www.energy.gov/articles/secretary-energy-rick-perry-announces-integrated-biorefinery-optimization-projects>. Acesso em: 01 dez. 2019.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 113, n. 8, p. 1031-1051, 2011.

PEITER, G. C. *et al.* Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**. v. 5, n. 4, p. 519-537, 2016.

PELCZAR, J. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG N. R.: **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Pearson, 1997. v. 1. p. 35-37.

PEREIRA, R. N. *et al.* Simultaneous lipid and carotenoid production by stepwise Fed-Batch cultivation of *Rhodotorula mucilaginosa* with crude glycerol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 36, n. 3, p. 1099-1108, 2019.

PERRIER, V.; DUBREUCQ, E.; GALZY, P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. **Archives of Microbiology**. v. 164, n. 3, p. 173-179, 1995.

PROBST, K. V. *et al.* Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 36, n. 5, p. 1-14, 2015.

REYNOSO-CERECEDA, G. I. *et al.* Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: Mass transfer coefficient $k_L a$ characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. **Biochemical Engineering Journal**. v. 105, p. 379-390, 2016.

RIVALDI, J. D. **Crescimento e caracterização enzimática de bactérias probióticas em meio contendo glicerol e seu encapsulamento em matriz polimérica natural**. 2012. 170f. Tese (Doutorado em Ciências), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **Handbook for Carotenoid Analysis**. Harvest Plus Technical Monograph 2. Washington, DC; Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) e International Center for Tropical Agriculture (CIAT), 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. J. **Fontes Brasileiras de Carotenoides. Tabela Brasileira de Composição de Carotenoides em Alimentos**. Ministério de Meio Ambiente. 2008.

ROSSI, M. *et al.* Getting lipids for biodiesel production from oleaginous fungi. **Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies**, v. 1, p. 72-74, 2011.

SANTOS, E. O. **Aproveitamento do glicerol gerado na síntese de biodiesel para produção de biomassa de leveduras**. 2009. 90f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1 ed., São Paulo: Blucher, 2001. v. 2.

SCOPUS. **Analyze search results: Biorefinery**. Disponível em: <https://www.scopus.com/term/analyzer.uri?sid=48341de5e25e7e93d725b26a98580eb8&origIn=resultslist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28Biorefinery%29&sort=plf-f&sdt=b&sot=b&sl=26&count=7711&analyzeResults=Analyze+results&txGid=c1593af8d794887b71e8cac89cae1c9d>. Acesso em: 06 dez. 2019.

SEVERO, I. A. *et al.* Biodiesel facilities: What can we address to make biorefineries commercially competitive? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 112, p. 686-705, 2019.

SILVA, C. I. S. **Otimização das condições de cultivo da levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 para produção de lipídios e carotenoides, em frascos agitados**. 2014. 65f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 2014. (b)

SILVA, M. L. C. *et al.* Compostos Fenólicos, Carotenoides e Atividade Antioxidante Em Produtos Vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, set. 2010.

SILVA, T. L. Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 98, p. 1043-1053, 2014. (a).

SOCOL, C. R. *et al.* Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. **Bioresource Technology**. v. 223, p. 259-268, 2017.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 2 ed. Oxford: Pergamon, 1995.

STUANI, F. H. **Avaliação da transferência de oxigênio em biorreatores de agitação mecânica e airlift visando a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae***. 2015. 117f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Centro de Ciências Exatas e da Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 2015.

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, p. 911-927, 2015.

THOMASI, S. S. **Avaliação de parâmetros de desempenho de três modelos de biorreatores pneumáticos de bancada**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

VALDUGA, E. *et al.* Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, out. 2009.

WONGWAILIKHIT, K. *et al.* Gas Sparger Orifice Sizes and Solid Particle Characteristics in a Bubble Column - Relative Effect on Hydrodynamics and Mass Transfer. **Chemical Engineering & Technology**. v. 41, n. 3, p. 461-468, 2018.

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

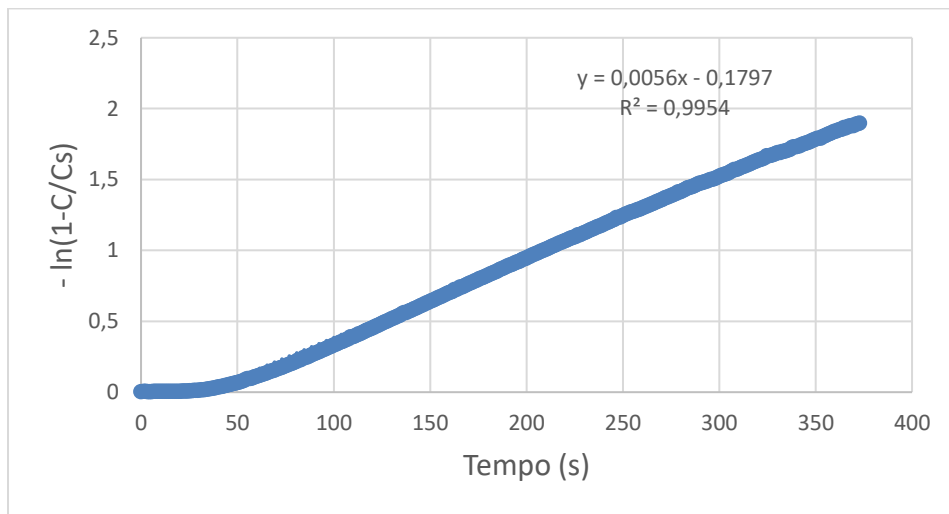
YEN, H. W. *et al.* The effects of feeding criteria on the growth of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* in a pilot-scale air lift bioreactor. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. v. 49, p. 67-71, 2015.

YEN, H. W.; CHANG, J. T. Growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an internal-loop airlift bioreactor by using lignocellulosic biomass hydrolysate as the carbon source. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 5, p. 580-584, 2015.

Apêndice A – Tratamento dos dados para o cálculo de k_La

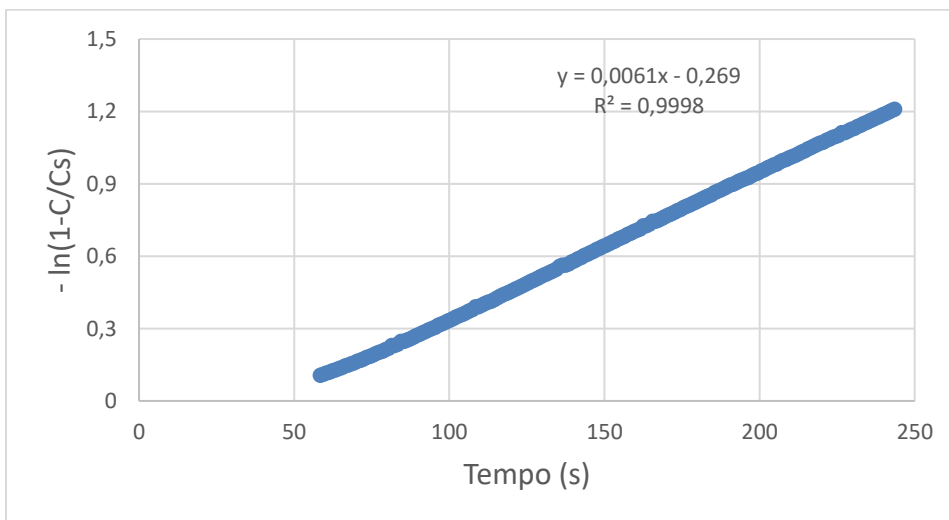
Valores de $-\ln(1-C/C_s)$ calculados a partir dos dados obtidos no experimento com ajuste da concentração de glicerol em 95,0 g/L, relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ em 3,75 e agitação em 200 rpm.

Figura 43- Cálculo de $-\ln(1-C/C_s)$ para todos os dados obtidos durante o experimento, com concentração de glicerol em 95,0 g/L, relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ em 3,75 e agitação em 200 rpm.



Fonte: Próprio autor.

Figura 44- Cálculo de $-\ln(1-C/C_s)$ somente dos dados utilizados para estabelecimento do k_La no experimento com concentração de glicerol em 95,0 g/L, relação $V_{\text{Frasco}}/V_{\text{Meio}}$ em 3,75 e agitação em 200 rpm.



Fonte: Próprio autor.