



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Luisa Pires Vaz

Otimização do meio de cultivo da levedura *Rhodospordium toruloides* baseado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar através da suplementação com glicerol e melado de soja visando a produção de óleo microbiano

Campinas

2019

Luisa Pires Vaz

Otimização do meio de cultivo da *Rhodosporidium toruloides* baseado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar através da suplementação com glicerol e melão de soja visando a produção de óleo microbiano

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Coorientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA LUISA PIRES
VAZ E ORIENTADA PELO PROF. DR.
EVERSON ALVES MIRANDA

Campinas - 2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 168457/2017-2; FAPESP, 2016/10636-8

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2972-9810>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

V477o Vaz, Luisa Pires, 1995-
Otimização do meio de cultivo da levedura *Rhodospordium toruloides* baseado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar através da suplementação com glicerol e melaço de soja visando a produção de óleo microbiano / Luisa Pires Vaz. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Everson Alves Miranda.

Coorientador: Silvio Silvério da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. *Rhodospordium toruloides*. 2. Óleo microbiano. 3. Hidrolisados. 4. Biocombustíveis. 5. Leveduras. 6. Fermentação. I. Miranda, Everson Alves, 1959-. II. Silva, Silvio Silvério. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Optimization of *Rhodospordium toruloides* medium based in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with glycerol and soybean molasses aiming microbial oil production

Palavras-chave em inglês:

Rhodospordium toruloides

Microbial oil

Hydrolysates

Biofuels

Yeasts

Fermentation

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Everson Alves Miranda [Orientador]

Fabiana Regina Xavier Batista

Thiago Olitta Basso

Data de defesa: 22-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida por Luisa Pires Vaz e aprovada em 22 de fevereiro de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

FEQ / UNICAMP

Profa. Dra. Fabiana Regina Xavier Batista

FEQ / UFU

Prof. Dr. Thiago Olitta Basso

DEQ / EPUSP

*A ATA da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedico este trabalho à Virgínia Fernandes por me mostrar o caminho. Saiba que é tão possível para mim quanto para você.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por permitirem que esta experiência fosse possível e pelo apoio e amor incondicional de vocês e de meus irmãos. Também aos outros familiares, pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

Ao Prof. Everson, por me acolher como sua aluna e por me dar a grande oportunidade de pertencer ao seu grupo de pesquisa. Você passou por todo este trabalho ao meu lado, me guiando, ensinando, motivando e acreditando no meu potencial. Serei eternamente grata pelos vários aprendizados que você me trouxe!

Aos colegas dos laboratórios da Faculdade de Engenharia Química pelo acolhimento e pela prestatividade, em especial aos colegas do LEBp. Agradeço-lhes pelas amizades nestes anos e por todo o apoio necessário para realização deste trabalho.

Agradecimento carinhoso ao León e à Virgínia, que fazem com que todos os meus dias sejam especiais. Vocês sempre me fizeram acreditar que a conclusão do mestrado era possível e sempre me aconselharam nos momentos de maior dificuldade.

Às amigas Mariana Ruiz e Nathália Nagib, que mesmo distantes se mostraram presentes em todos os momentos. Vocês acompanham a minha trajetória desde sempre e contribuíram para o meu crescimento como pessoa. A distância apenas estreitou nossos laços! Agradeço também à PCDM por me adotarem em 2018 e auxiliar sempre que possível em questões relacionadas ou não ao mestrado.

Ao LRAC, em especial ao Hugo, pela prontidão e excelência nas análises realizadas. A todos os funcionários da FEQ que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho. À Universidade Federal de Uberlândia, mais uma vez presente em minha vida, pela disponibilização dos laboratórios para análises.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2016/10636-8, ao CNPq e à Capes, pelo financiamento para o desenvolvimento deste projeto e à Universidade Estadual de Campinas que me acolheu nestes dois anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

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

Por fim, agradeço a todos que um dia acreditaram na ciência: vocês nos trouxeram até aqui!

RESUMO

O biodiesel, que tem como uma de suas matérias prima principais óleos vegetais, tem sido cada vez mais utilizado em substituição ao diesel produzido a partir de petróleo, devido a razões de sustentabilidade e ambientais. Entretanto, variações climáticas e geográficas, além da competição por áreas cultiváveis para produção de alimentos, afetam a disponibilidade e custo de sua matéria-prima, sendo um entrave para seu uso em maior escala. Óleos microbianos (OM) produzidos por microrganismos oleaginosos são uma alternativa possível para sanar este problema, dentre eles aquele produzido pela levedura *Rhodospiridium toruloides*. Esta levedura é capaz de acumular até 70% de óleo na célula (base seca), além de crescer em meios derivados de coprodutos de biorrefinaria, tal como o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA). Todavia, esse hidrolisado contém inibidores e apresenta baixa razão molar entre carbono e nitrogênio (C/N) que não favorece o crescimento do microrganismo e a produção de lipídios. O objetivo deste estudo foi otimizar o HHBCA como meio de cultivo para a produção de OM pela cepa *R. toruloides* CCT7815 suplementando-o com glicerol, melão de soja e extrato de levedura, sendo os dois primeiros suplementos capazes de aumentar a razão C/N do meio. A formulação otimizada continha 30 g/L de glicerol, 50 g/L de melão de soja, 1,5 g/L de extrato de levedura e 80% (v/v) de HHBCA não destoxificado, além do requerimento de 1% de solução de micronutrientes. Nesse meio otimizado, as células foram capazes de acumular 44% de lipídios (base seca), ao passo que no hidrolisado não suplementado este conteúdo foi de apenas 26%, resultando em um aumento de cinco vezes na concentração lipídica. Além da suplementação do HHBCA, a melhor fase de crescimento e concentração celular inicial (em termos de densidade óptica (OD)) para ser usada como inóculo foram determinadas, sendo elas a fase de desaceleração e OD₆₀₀ igual a 1. Portanto, a adição de glicerol e melão de soja é uma estratégia simples para melhorar a produção de OM para essa cepa de *R. toruloides* em substratos com baixa razão C/N.

Palavras-chave: *Rhodospiridium toruloides*; óleo microbiano; hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Biodiesel, which has vegetable oils as a raw material, is currently used as a substitute for diesel produced from petroleum due to sustainability and environmental issues. However, geographic and climatic variations and competition for agricultural area with food crops affect the availability and cost of the oil seeds used in its production process. Microbial oil (MO) produced by oleaginous microorganisms is a possible solution to overcome these problems. The yeast *Rhodosporidium toruloides* is one of these microorganisms. It can accumulate up to 70% of oil (dry mass base) in its cells and can grow in media made from biorefinery co-products, e.g., sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate (SCBHH). However, this hydrolysate has low carbon to nitrogen (C/N) ratio and contains inhibitors that do not favor growth and lipid production. The objective of this work was to optimize the SCBHH as a medium for the production of MO by *R. toruloides* CCT7815 strain supplementing it with glycerol, soybean molasses, and yeast extract, the first two being able to increase the C/N ratio of the medium. The optimized formulation contained 30 g/L of glycerol, 50 g/L of soybean molasses, 1.5 g/L of yeast extract, and 80% (v/v) non-detoxified SCBHH, besides the 1% micronutrient solution requirement. In this medium the cells were able to accumulate 44% of lipids (dry mass base) whereas the non-supplemented hydrolysate provided a lipid content of 26%, resulting in a 5-fold increase in lipid concentration. Also, the best inoculum phase and initial cell concentration to be used as inoculum were determined: deceleration phase and OD equal 1. Therefore, the addition of glycerol and soybean molasses is a simple strategy to improve production of MO by this *R. toruloides* strain in substrates with low C/N ratio.

Palavras-chave: *Rhodosporidium toruloides*; microbial oil; sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABIOVE	Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais
AMP	Adenosina monofosfato
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ATP	Adenosina trifosfato
C/N	Razão molar carbono/nitrogênio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
DCCR	Delineamento composto centrado rotacionado
F _{calc}	Valor de F calculado
FEQ	Faculdade de engenharia química
F _{tab}	Valor de F tabelado
HAc	Ácido acético
H _{CaO}	Hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar tratado com CaO
HHBCA	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar
HMF	5-(hidroximetil)furfural
H _{NaOH}	Hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar tratado com NaOH
IEA	<i>International Energy Agency</i>
LEBp	Laboratório de Engenharia de Bioprocessos
LRAC	Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos analíticos e de Calibração
m/v	Proporção massa/volume (g/mL)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
m _{biomassa}	Massa de biomassa
m _{lipídios}	Massa de lipídios
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NUCBIO	Núcleo de Processos Biotecnológicos
OD ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
OM	Óleo microbiano
PB-12	Planejamento de Plackett e Burmann para 12 variáveis

rpm	Rotações por minuto
SCO	<i>Single cell oil</i>
TAGs	Triacilgliceróis
UA	Unidade de absorbância
v/v	Proporção volume/volume
VOCs	Compostos orgânicos voláteis
YMP	<i>Yeast extract-malt extract-peptone</i>
$Y_{p/x}$	Produção específica de lipídios
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
ρ	Coefficiente de Spearman

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Óleo microbiano de <i>Rhodosporidium toruloides</i> para produção de biodiesel ...	13
1.2. Colocação do problema	14
1.3. Objetivo e etapas	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Biorrefinarias	15
2.2. Produção de biodiesel	16
2.3. Óleo microbiano como matéria-prima alternativa aos óleos vegetais	17
2.4. A levedura oleaginosa <i>Rhodosporidium toruloides</i>	18
2.4.1. Ação de sais inorgânicos no metabolismo da levedura.....	20
2.4.2. Características do inóculo e substrato	22
2.4.3. Influência da razão C/N no conteúdo lipídico.....	23
2.5. Composição do meio de cultivo de <i>R. toruloides</i> para produção de OM	25
2.5.1. Glicerol.....	26
2.5.2. Melaço de soja.....	27
2.5.3. Hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA).....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Microrganismo e sua manutenção	32
3.1.1. Preparo do pré-inóculo e inóculo	32
3.2. Quantificação da biomassa celular	32
3.3. Extração e quantificação de lipídios	33
3.4. Obtenção e caracterização dos substratos	34
3.4.1. Hidrolisado e suplementos	34
3.4.2. Quantificação dos açúcares, inibidores e razão molar C/N.....	35
3.5. Determinação da metodologia de ajuste de pH do HHBCA	36
3.6. Determinação da fase de crescimento ideal para inóculo	36
3.7. Otimização do meio de cultivo	37
3.7.1. Planejamento de experimentos para avaliação dos efeitos principais.....	37
3.7.2. Planejamento de experimentos para geração da superfície de resposta.....	37
3.7.3. Metodologia do cultivo de <i>R. toruloides</i> para execução dos planejamentos experimentais.....	38

3.8. Estudo cinético do cultivo da <i>R. toruloides</i> no meio otimizado	38
3.9. Determinação da concentração celular inicial do inóculo para cultivos	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. Caracterização das fontes de carbono	40
4.1.1. Características do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA)	40
4.1.2. Características do melaço de soja.....	41
4.1.3. Avaliação da razão molar C/N do HHBCA, melaço de soja e extrato de levedura	41
4.2. Determinação da metodologia de ajuste de pH do HHBCA	42
4.3. Determinação da idade ideal do inóculo.....	45
4.4. Otimização do meio de cultivo	47
4.4.1. Planejamento de experimentos para avaliação dos efeitos principais.....	47
4.4.2. Planejamento de experimentos para geração da superfície de resposta	54
4.5. Estudo cinético do cultivo da <i>R. toruloides</i> no meio otimizado	58
4.6. Determinação da melhor concentração celular inicial do inóculo para cultivos.....	64
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	68
5.1. Conclusões.....	68
5.2. Sugestões de trabalhos futuros.....	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICE.....	81

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energia renováveis como alternativa aos combustíveis fósseis se faz necessária devido ao aquecimento global e também à alta nos preços dos combustíveis derivados de petróleo. Embora a produção mundial de petróleo tenha crescido em 2017, superando a média de 100 milhões de barris diários, existem incertezas quanto à disponibilidade das fontes de combustíveis fósseis em longo prazo por ser uma fonte não renovável (BEN, 2018; IEA, 2018). Portanto é imprescindível o uso de energia proveniente de fontes limpas para atender à crescente demanda energética ao redor do mundo e às ameaças de mudanças climáticas. De maneira geral, o preço destes combustíveis varia ao longo das regiões do globo e sofre flutuações ao longo do tempo; por outro lado, as energias de fontes limpas são cada vez mais barateadas. Destaca-se ainda que muitas das reservas de petróleo e gás estão presentes em regiões tecnicamente desafiadoras e onerosas para se alcançar, enquanto que as fontes de energia renováveis são de fácil acesso e a instalação de indústrias para sua produção, quando comparada às refinarias de petróleo, é mais simples (MAJI, 2015; GENERAL ELECTRIC, 2015).

Os biocombustíveis são uma das mais conhecidas e estudadas fontes de energia renováveis, apresentando diversas vantagens frente aos combustíveis derivados de petróleo. Dentre essas, estão a menor emissão de gases do efeito estufa, de partículas sólidas e de compostos orgânicos voláteis (VOCs), que são substâncias danosas à saúde e ao meio ambiente, causando problemas respiratórios e escurecimento atmosférico (HAJJARI *et al.*, 2017). Além disso, biocombustíveis podem ser obtidos, por exemplo, através do processamento de biomassa vegetal (e.g., madeira e cana-de-açúcar) e óleos vegetais, sendo assim, possível para a indústria empregar resíduos e coprodutos agroindustriais para sua produção (URQUIAGA *et al.*, 2015).

Um dos biocombustíveis amplamente empregados atualmente é o etanol produzido a partir da fermentação dos açúcares contidos no caldo da cana-de-açúcar, que tem como subproduto quantidades significativas de bagaço de cana-de-açúcar por safra. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o bagaço de cana-de-açúcar é

comumente utilizado para geração de energia (calor e eletricidade), na indústria alimentícia e, apesar de suas vantagens, ainda se tem o desperdício deste material (BEN, 2018; MAPA, 2018).

Para melhor aproveitamento dessa matéria-prima, estudos têm sido feitos para a sua utilização na produção de outros biocombustíveis e uma das formas é realizar a hidrólise fracionada deste material para a geração de frações ricas em basicamente glicose e em xilose e xilooligômeros a partir da celulose e hemicelulose (esta última tradicionalmente chamada de extração de hemicelulose), respectivamente, permitindo assim sua utilização em diversos processos fermentativos (BASTOS, 2007).

Outro combustível amplamente utilizado é o óleo diesel. Em 2017, foi registrado no Brasil um aumento de 0,6% de consumo de óleo diesel em relação ao ano anterior e sua produção no ano de 2017 foi de 44,471 bilhões de litros, sendo que desses apenas 11% eram de biodiesel, produção essa que vem aumentando anualmente (BEN, 2018; MAPA, 2018). Este biocombustível é de fundamental importância por ser utilizado como substituinte do diesel derivado de petróleo. Além de sua aceitação no mercado devido às suas características semelhantes às do diesel convencional, ele provê um balanço de energia positivo na sua produção, sua queima emite menos gases do efeito estufa do que o diesel derivado do petróleo e é livre de enxofre e compostos aromáticos (HAJJARI *et al.*, 2017).

No Brasil, desde 2008 é permitida a comercialização do diesel contendo 2% de biodiesel e 98% de diesel de petróleo e em março de 2018 a proporção de biodiesel aumentou para 10% tornando-se obrigatória a presença do biodiesel devido às questões ambientais (BRASIL, 2012; ANP, 2018).

A principal produção do biodiesel se dá a partir da transesterificação de óleos vegetais obtidos de sementes oleaginosas como, por exemplo, a soja, e as sementes utilizadas especificamente para a produção do biodiesel não apresentam características adequadas para o consumo humano. Dentre elas está o baixo teor de proteínas, alto teor de óleos e ácidos graxos, baixo teor de carboidratos e maior tamanho dos grãos. O plantio de tais variedades conflita-se com a utilização de terras cultiváveis para produção de óleos em vez de alimentos. Outro problema da produção de biodiesel a partir de óleos vegetais está relacionado às características climáticas e geográficas, que podem impossibilitar ou dificultar o cultivo da cultura em diferentes locais. Dessa forma, a competição por terras para o cultivo e a dificuldade de reprodutibilidade ao longo do globo torna necessária a busca por uma alternativa aos óleos vegetais para a produção de biodiesel (HAJJARI *et al.*, 2017).

1.1. Óleo microbiano de *Rhodospiridium toruloides* para produção de biodiesel

Uma alternativa de matéria-prima para a produção de biodiesel poderia ser a utilização de óleo microbiano (OM). Tal óleo pode ser produzido por bactérias, fungos, algas e leveduras, dentre as quais se destaca a levedura *Rhodospiridium toruloides* por ser capaz de assimilar diferentes tipos de substratos e apresentar altos teores de lipídios em sua biomassa (FEI *et al.*, 2016; LEMAN, 1997; SITEPU *et al.*, 2014). Para essa produção, os microrganismos utilizam fontes de carbono como substrato para sua conversão em lipídios e, a fim de reduzir o custo do produto, podem ser utilizados coprodutos de biorrefinaria, tais como o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA), glicerol e o melaço de soja.

É importante ressaltar a possibilidade de diferentes fontes de carbono, visto que os fatores mais importantes que afetam a conversão da fonte de carbono em lipídios são o tipo desta fonte, a presença de uma fonte de nitrogênio, a razão entre estas duas fontes (razão molar C/N), a presença de sais importantes da via metabólica do conteúdo lipídico, as condições operacionais do cultivo, a relação entre concentração celular e concentração de substrato e a fase do inóculo (CHIDINMA, 2010).

Dessa maneira o OM se tornou uma alternativa na busca de novas matérias-primas para a produção do biodiesel, embora esta rota de produção de lipídios tenha baixa produtividade acarretando em um alto custo de produção pela utilização de muito substrato. Sendo assim, uma das formas de reduzir os custos da produção de OM seria empregar uma matéria-prima barata e renovável no processo, preferencialmente coprodutos agroindustriais, tais como os hidrolisados hemicelulósicos, destacando-se o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar. Entretanto, este não apresenta condições ideais para o processo, como a baixa razão molar C/N e a produção de inibidores de crescimento microbiano devido às reações de hidrólise realizadas para a disponibilização da fração hemicelulósica (BONTURI, 2016).

Outra abordagem possível para a utilização destes materiais seria a adaptação de microrganismos para o consumo dos carboidratos contidos em tais coprodutos de biorrefinarias e também resistentes aos inibidores presentes no meio, estratégia essa já utilizada por Bonturi *et al.* (2017), obtendo 55% de conteúdo lipídico ao cultivar uma cepa de *R. toruloides* em HHBCA não destoxificado (remoção de ácidos orgânicos fracos, derivados de furanos e compostos fenólicos) para a produção de OM.

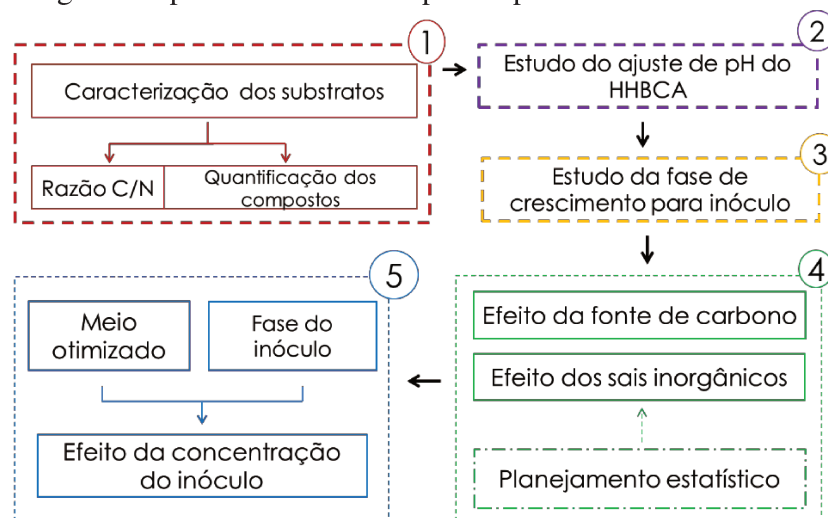
1.2. Colocação do problema

Por mais que existam dados na literatura muito bem sintetizados por Park *et al.* (2017) e retratados por Bonturi *et al.* (2017) sobre o cultivo de *R. toruloides* em HHBCA, os estudos realizados não apresentam a razão C/N adequada para a produção de OM. Sabendo-se que esta é uma das condições críticas para aumentar a produtividade da cepa, pode-se suplementar o HHBCA com outras fontes de carbono para aumentar a razão C/N até que o meio de cultivo atinja a condição ideal e, desta forma, espera-se obter maiores valores de produtividade e conteúdo de OM do que os já retratados na literatura. Para isso, cria-se a necessidade de estudos para a otimização do meio de cultivo utilizando diferentes fontes de carbono para favorecer a síntese de OM pela levedura em questão.

1.3. Objetivo e etapas

O presente trabalho teve como objetivo a otimização da suplementação de um meio de cultivo da levedura adaptada *R. toruloides* CCT 7815 baseado em HHBCA, com os coprodutos de biorrefinarias agroindustriais glicerol e melaço de soja, sais inorgânicos e extrato de levedura, assim como otimizar parâmetros de inóculo visando o aumento da produtividade de lipídios. O intuito do projeto foi contribuir para o desenvolvimento de um processo industrial de baixo custo, (aproveitando coprodutos das biorrefinarias envolvidas), que torne a produção de OM uma tecnologia viável para sua utilização como matéria-prima para o biodiesel. Para isso, foram realizadas as etapas determinadas de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1.1.

Figura 1.1: Fluxograma representativo das etapas do plano de trabalho.



CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biorrefinarias

De acordo com a *International Energy Agency (IEA) Bioenergy* (2007), “biorrefinação é o processamento sustentável da biomassa em um espectro comercializável de produtos e energia”. O conceito de biorrefinaria engloba diversas tecnologias que permitem separar a biomassa, de acordo com sua composição e função, em diferentes produtos de valor agregado, como por exemplo biocombustíveis, energia, produtos químicos, óleos, entre outros. Desse modo, no Brasil, podem-se destacar duas grandes biorrefinarias, a de cana-de-açúcar e a da soja (CHERUBINI, 2010).

Sobre a biorrefinaria da cana-de-açúcar, estima-se que a produção da matéria-prima para 2019 atinja 647 milhões de toneladas. Destes, cerca de 26%, ou seja, 165 milhões de toneladas, serão de bagaço de cana-de-açúcar, gerados na moagem da cana para extração do caldo que tem como principais produtos açúcar e etanol de primeira geração. O bagaço da cana-de-açúcar é atualmente utilizado na própria biorrefinaria para geração de energia térmica nas caldeiras, e que permite também a geração de energia elétrica. Outras utilizações possíveis deste coproduto seriam na forragem para bovinos, indústria do papel, indústria cosmética, entre outros, mas que apresentam inviabilidade econômica ou geram um desperdício da biomassa vegetal. (KAWA, 2015; MAPA, 2018).

De todas as utilizações para o bagaço, a sua queima na própria biorrefinaria é a mais empregada. Todavia, ela pode ser prejudicial ao meio ambiente, aumentando a emissão de CO₂ na atmosfera. Além disso, existe a questão de que grande parte das usinas atualmente possui um sistema de caldeiras eficientes, que extraem o máximo de energia possível do bagaço, gerando um excedente desse coproduto. Ademais, ele também pode ser utilizado na produção de biocombustíveis, como é o caso do etanol de segunda geração, que utiliza o seu hidrolisado como substrato em processos fermentativos (ANTUNES, *et al.*, 2014).

Outra biorrefinaria que vem ganhando destaque na produção de biocombustíveis é a biorrefinaria da soja, que além de gerar a produção de biodiesel a partir do óleo vegetal, apresenta o farelo de soja e a proteína da soja como principais subprodutos. O Brasil é

responsável por 34% da produção mundial de soja, sendo o segundo maior produtor. Grande parte da produção é exportada e, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais – ABIOVE, para o ano de 2019, espera-se que 43 milhões de toneladas sejam processadas no país. Desta forma, espera-se que a produção de farelo de soja seja de 32,7 milhões de toneladas, 3,8% maior que o ano de 2018, e a tendência é que o processamento da oleaginosa no país só aumente. (EMBRAPA SOJA, 2018; ABIOVE, 2018).

O grão da soja possui alto teor de lipídios, proteínas e carboidratos, características essas que permitem diferentes aplicações do grão, como a produção de óleos vegetais para produção de biocombustíveis, alimentação humana e animal. Após a extração da fração lipídica do grão, o produto de interesse pode ser utilizado para a fabricação de biocombustíveis (como é o caso do biodiesel) ou na alimentação humana como óleo de soja. Sua extração gera o farelo de soja que contém alto teor de proteínas e carboidratos e é amplamente utilizado na fabricação de ração animal, mas também bastante utilizado na alimentação humana em produtos veganos ou vegetarianos. (ROMÃO, 2011).

O tipo de processamento da soja também é de grande importância, visto que podem restar inibidores ou componentes que afetem a capacidade do humano ou animal de absorver os alimentos. A extração do óleo pode ser feita por solvente ou por prensagem mecânica, sendo que a extração por solvente se mostra mais interessante por conseguir extrair quase completamente o óleo da semente. O farelo resultante da extração é seco para a remoção do solvente e pode dar origem a diversos produtos, tais como farinha integral, proteína concentrada e isolada, hidrolisados e extratos em pó. O óleo bruto extraído pode ser refinado e vendido como óleo vegetal; também pode ser hidrogenado e vendido como margarina, mas a maior parte é destinada à produção de biodiesel (ROMÃO, 2011).

2.2. Produção de biodiesel

De acordo com a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel é um combustível renovável resultante da reação de transesterificação de óleos e gorduras. Os triglicerídeos presentes nos óleos reagem com um álcool primário (metanol ou etanol) e geram glicerol e um éster alquílico de ácidos carboxílicos de cadeia longa (12 – 22 carbonos), chamado de biodiesel. Apesar de sua estrutura química diferente, suas características físico-químicas se assemelham bastante às do diesel derivado do petróleo (ANP, 2018).

A aceitação deste biocombustível está associada à eficiência dos parâmetros empregados na reação de transesterificação dos ácidos graxos. Quando estes valores estão bem estabelecidos ocorre a redução da viscosidade do óleo utilizado como matéria-prima e dessa

forma o biodiesel gerado a partir desse óleo apresenta características similares às do diesel convencional. O biodiesel é um combustível livre de enxofre e aromáticos, possui elevado ponto de fulgor e é denominado ambientalmente correto por ser produzido a partir de fontes renováveis e ser facilmente biodegradado no meio ambiente (AGUIAR, 2013).

Em 2017, a produção de biodiesel do Brasil foi de aproximadamente 4,3 bilhões de litros, o que corresponde a apenas 56% da capacidade total de produção do país. No entanto, a produção vem aumentando com o tempo, visto que, em 2017, a produção foi 12% maior que em 2016. Todavia essa produção depende da disponibilidade da matéria-prima e, como não há restrições técnicas em relação ao tipo de triacilglicerídeo utilizado produção de biodiesel, cada região pode selecionar o tipo de triacilglicerídeo mais abundante, barato e melhor adaptado à sua condição climática e geográfica (AGUIAR, 2013).

2.3. Óleo microbiano como matéria-prima alternativa aos óleos vegetais

Uma estratégia para substituir os óleos vegetais na produção de biodiesel é o emprego de óleos microbianos (OM ou SCO, do inglês *single cell oil*), que podem também ser usados para o consumo humano, tanto na forma de alimentos quanto como insumos na indústria (WU *et al.*, 2011). Sua utilização apresenta diversas vantagens frente ao uso de óleos vegetais na produção de biodiesel, tais como a não utilização de terras para a produção de alimentos — o que pode baratear o custo dos alimentos em longo prazo devido a disponibilização de terras cultiváveis para outras culturas —, a independência das alterações climáticas, o que gera uma maior estabilidade no preço desta matéria-prima e assegura uma produção constante ao longo do ano, a facilidade na ampliação de escala da sua produção e por apresentar teor lipídico maior do que as culturas vegetais oleaginosas (30 – 50%) (PAPANIKOLAOU E AGGELIS, 2011; CHIDINMA, 2010).

Os microrganismos capazes de produzir e acumular óleo intracelular acima de 20% de sua biomassa são denominados oleaginosos (RATLEDGE, 1991). A fonte de carbono utilizada no cultivo desses microrganismos pode ser qualquer material que seja metabolizado de forma similar à açúcares, como, por exemplo, polissacarídeos, glicerol e resíduos agroindustriais. Tal óleo pode ser produzido por bactérias, fungos, algas e leveduras. Vale ressaltar que a produção por leveduras pode ser mais vantajosa frente às algas devido à sua maior taxa de crescimento e à facilidade na ampliação de escala (KOUTINAS *et al.*, 2014; LEMAN, 1997). Além disso, as leveduras têm um maior conteúdo lipídico (porcentagem de massa de lipídios por massa de biomassa) do que as bactérias e são mais fáceis de cultivar que os fungos filamentosos (KOUTINAS *et al.*, 2014).

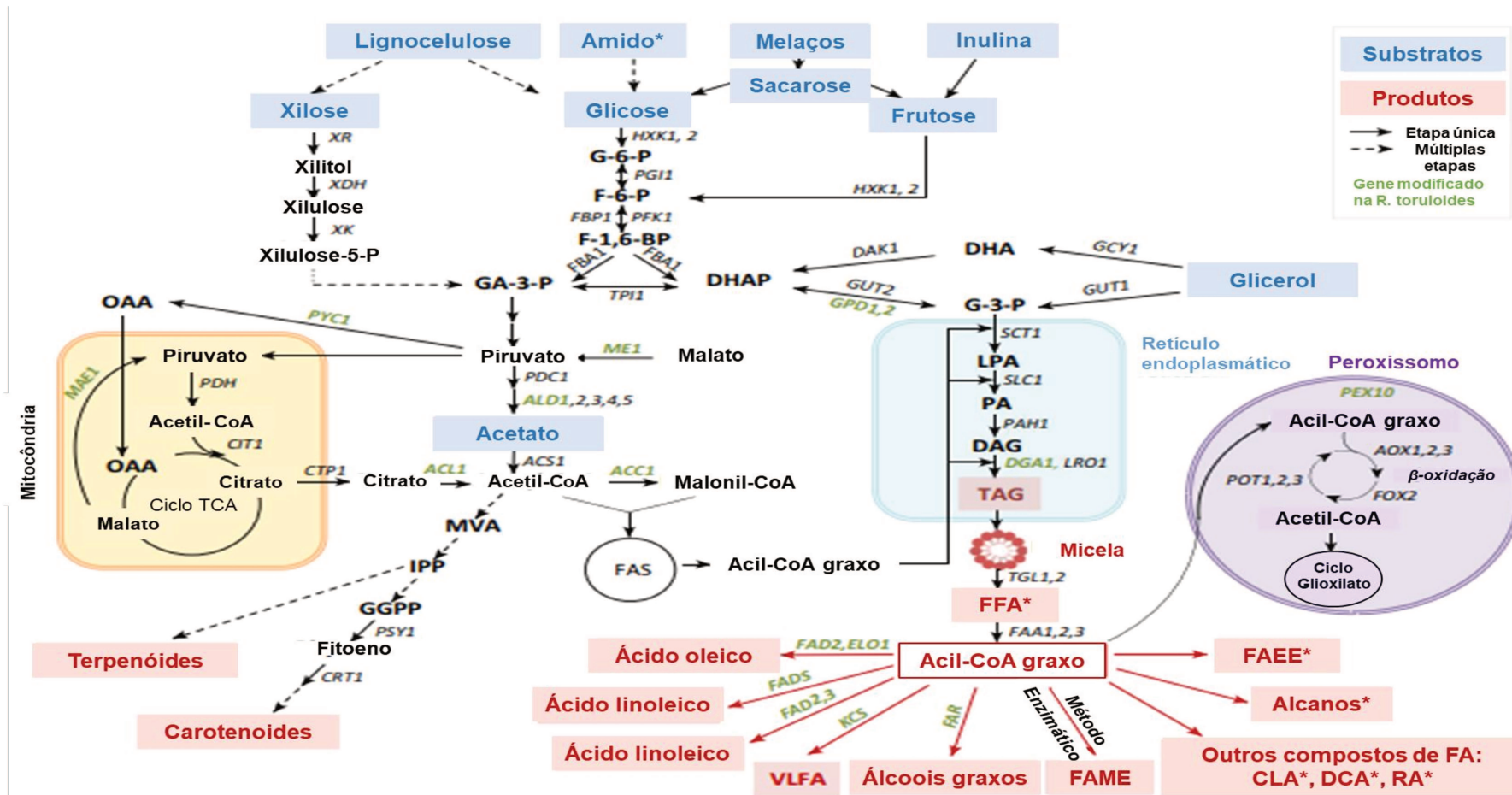
2.4. A levedura oleaginosa *Rhodosporidium toruloides*

Dentre as leveduras oleaginosas uma que se destaca é a *Rhodotorula toruloides* (até recentemente nomeada *Rhodosporidium toruloides* (PARK *et al.*, 2017)) por apresentar um conteúdo de lipídios de até 70% de sua biomassa quando cultivada em um meio rico em glicose, xilose e arabinose (FEI *et al.*, 2016; LEMAN, 1997; LI *et al.*, 2006).

Por ser uma cepa muito estudada, alguns parâmetros de cultivo da *R. toruloides* já estão bem estabelecidos, como temperatura de 28°C, agitação a 200 rpm (em frascos Erlenmeyer), e pH de 5,0 a 6,5. A respeito de modo de operação para produção de OM, Wiebe *et al.* (2012) demonstraram que o modo batelada alimentada é o mais apropriado para aumentar a produtividade do sistema por proporcionar um rápido crescimento celular e conteúdo lipídico devido à adição gradual de nutrientes. Já no modo batelada, é possível que o substrato seja consumido rapidamente no início do cultivo, levando à limitação de nutrientes essenciais, diminuindo o crescimento celular (WIEBE *et al.*, 2012).

Outro dado bem estabelecido sobre microrganismos oleaginosos é a via bioquímica do conteúdo lipídico, favorecida pela levedura que metaboliza o excesso de carbono do meio quando este apresenta uma limitação de nitrogênio (Figura 2.1). A depleção de nitrogênio diminui a quantidade de adenosina mono fosfato (AMP) na célula, aumentando a proporção ATP/AMP, o que acaba por aumentar a quantidade de citrato intracelular, via ciclo de Krebs. Este citrato é transportado para fora da mitocôndria e então clivado em acetil-CoA e oxaloacetato pela enzima citrato liase. Essa etapa é controlada pela alta concentração dos ésteres de acetil-CoA, usado na biossíntese de ácidos graxos enquanto o oxaloacetato é convertido em piruvato. Outros dois pontos de controle para a biossíntese lipídica estão na via da glicólise, em que as duas enzimas (fosfofrutoquinase e piruvato quinase) são inibidas pela alta concentração citrato, o que aumenta o conteúdo lipídico. Esta inibição pode ser revertida pela presença de íons amônio produzidos quando uma fonte de nitrogênio é inserida. Os precursores imediatos para a biossíntese dos triacilgliceróis (TAGs) são os ésteres graxos de acil-CoA e os fosfatos de glicerol, metabolizados no retículo endoplasmático (LEMAN, 1997; PARK *et al.*, 2017; ZHU, Z. *et al.*, 2012).

Figura 2.1: Metabolismo de conteúdo lipídico da levedura *R. toruloides* adaptada de Park *et al.* (2017). As setas contínuas indicam etapas simples, e as setas tracejadas indicam mais de uma etapa. Os nomes de enzimas e outros compostos conhecidos estão abreviados. As caixas azuis indicam as fontes de carbono, enquanto as vermelhas indicam produtos de interesse industrial. As enzimas marcadas com a cor verde indicam modificações genéticas já realizadas. Os asteriscos (*) indicam substrato em potencial ou produtos para serem estudados. Abreviações: CLA, ácido linoleico conjugado; DCA, ácido dicarboxílico; FA, ácido graxo; FAME, metil éster de ácido graxo; FFA, ácido graxo livre; FAEE, éster etílico de ácido graxo; RA, ácido ricinoleico; TAG, triacilglicerol; VLFA, ácido graxo de cadeia muito longa.



Ao longo do processo fermentativo para a síntese do OM também ocorre a produção de metabólitos secundários pela célula, que podem ou não ser tóxicos dependendo de sua concentração no meio. No modo batelada alimentada, atingir uma alta concentração destes compostos tóxicos é mais difícil visto que estes são diluídos no meio adicionado a cada alimentação. Dentre estes metabólitos, está o ácido acético que causa redução no pH do meio (DIAS *et al.*, 2015), tornando as condições de cultivo desfavoráveis para o crescimento e produção de lipídios.

Além da produção de metabólitos que alteram o pH do meio, existe a necessidade de se ajustar o pH inicial do cultivo, para possibilitar um rápido crescimento microbiano e diminuir a fase *lag*. Tal ajuste pode ser feito através da adição de sais de caráter básico ou ácido que formem íons participantes da via metabólica do microrganismo, pois dessa forma, além de se proporcionar condições favoráveis ao crescimento microbiano, estimula-se a produção lipídica pelo aumento da pressão osmótica do sistema e pela participação dos íons adicionados na via metabólica da biossíntese lipídica.

A seguir serão discutidos três fatores importantes no cultivo de *R. toruloides* visando o aumento da produção de óleo microbiano, sendo eles a ação de sais no metabolismo, razão C/N e características do inóculo.

2.4.1. Ação de sais inorgânicos no metabolismo da levedura

Como dito anteriormente, o processo do conteúdo lipídico se dá por um rápido crescimento celular até que o nitrogênio seja esgotado do meio e, conjuntamente, parte da fonte de carbono também seja convertida em lipídios (LEMAN, 1997). A forma mais eficiente para induzir o conteúdo lipídico é pela limitação do nitrogênio no meio, mas essa indução também pode ser feita pela depleção ou adição de outros nutrientes essenciais, como magnésio, zinco, ferro e fósforo (BEOPOULOS *et al.*, 2009; BEOPOULOS *et al.*, 2011).

Sabe-se da necessidade de alguns íons específicos na via metabólica do conteúdo lipídico pela levedura *R. toruloides* como, por exemplo, a presença de magnésio, ferro e fosfatos (LI *et al.*, 2006). Em estudos realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) na Unicamp, avaliou-se o efeito da concentração de alguns sais no conteúdo lipídico e no crescimento da biomassa de *R. toruloides*. Neste estudo, cultivou-se a levedura em HHBCA suplementado com glicerol (54 g/L), extrato de levedura 2,8 g/L (razão C/N 100) e adicionou-se diferentes sais ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $FeCl_3$), obtendo resultados superiores aos obtidos no cultivo realizado nas mesmas condições sem a presença dos sais (ZHAO *et al.*, 2012). Concluiu-se que a presença dos sais aumenta os teores de biomassa, lipídios e o conteúdo

lipídico, que atingiram valores máximos de 14,69 g/L, 7,22 g/L e 49,15% respectivamente (dados não publicados). No estudo do LEBp não foi observada diferença significativa do conteúdo lipídico entre os experimentos realizados, o que levanta a hipótese de que as condições de operação utilizadas não estivessem de acordo com os dados retratados pela literatura, reforçando que estes parâmetros sejam fatores cruciais para aumento do conteúdo lipídico.

Os fosfatos presentes no meio agiam como tampão, auxiliando na manutenção do pH do meio ao longo do cultivo e contribuíram no ajuste da razão C/P no início do cultivo, razão esta que quando alta, favorece o conteúdo lipídico (BONTURI, 2016; WU *et al.*, 2010). A presença de cloro em baixas concentrações também foi benéfica, pois o íon atua como cofator de enzimas que realizam o transporte de oxigênio (LESTER *et al.*, 2013). Já a presença de magnésio se faz necessária pela sua atuação na replicação celular e também a participação direta na síntese lipídica visto que ele atua como cofator da enzima málica que é responsável pela redução de NADP⁺ em NADPH que, por sua vez, atua na conversão de malonil Co-A em ácidos graxos (SAUER *et al.*, 1980).

Os efeitos que cada sal exerce individualmente na produtividade de óleo pela *R. toruloides* são importantes, mas também os são os efeitos sinérgicos entre eles. Por se tratar de um microrganismo robusto, a levedura pode ser mais produtiva em ambientes considerados extremos, como locais com altas concentrações salinas. Cepas selvagens deste microrganismo foram isoladas de ambientes considerados desfavoráveis para o crescimento microbiano, o que suporta a hipótese de elas conseguirem se desenvolver em tais condições. Com a adição de diferentes sais ao meio, aumentou-se a pressão osmótica e a salinidade; esta condição de cultivo de relativa alta salinidade pode ter contribuído para o melhor desempenho da cepa (PULSCHEN *et al.*, 2015; TCHAKOUTEU *et al.*, 2017).

Além da adição de sais participantes da via metabólica, é necessária a adição de vitaminas ao meio de cultivo, que pode ser feita através da utilização de um meio basal contendo extrato de levedura. Esse é um material rico em vitaminas, aminoácidos essenciais, nitrogênio e sais minerais que auxiliam no metabolismo de conteúdo lipídico devido à composição da parede celular das leveduras ser composta por cerca de 90% de polissacarídeos (álcali-glucanos solúveis e insolúveis e também quitina) e os outros 10% de proteína (SPEARMAN *et al.*, 2016; EKPENI *et al.*, 2014). Assim como a adição de sais inorgânicos, a adição de fontes de carbono e extrato de levedura ao meio de cultivo pode favorecer o desenvolvimento de um microrganismo, mas é preciso ser cauteloso quanto às concentrações utilizadas para que não se tenha um efeito inibitório no crescimento (TCHAKOUTEU *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2011).

2.4.2. Características do inóculo e substrato

Ao se considerar um meio de cultivo que forneça todos os nutrientes necessários para as células, deve-se também considerar a concentração celular do inóculo, visto que uma concentração celular inicial alta pode resultar na rápida limitação dos nutrientes, gerando pouco conteúdo lipídico em cada célula, o que reduz a produtividade. Já uma baixa concentração celular inicial pode resultar na inibição do crescimento devido à alta concentração do substrato. Portanto, devem-se balancear as concentrações celular e de substrato iniciais para que o cultivo seja conduzido em condições ideais, durando tempo suficiente para atingir os resultados esperados da produção de OM (LI *et al.*, 2007).

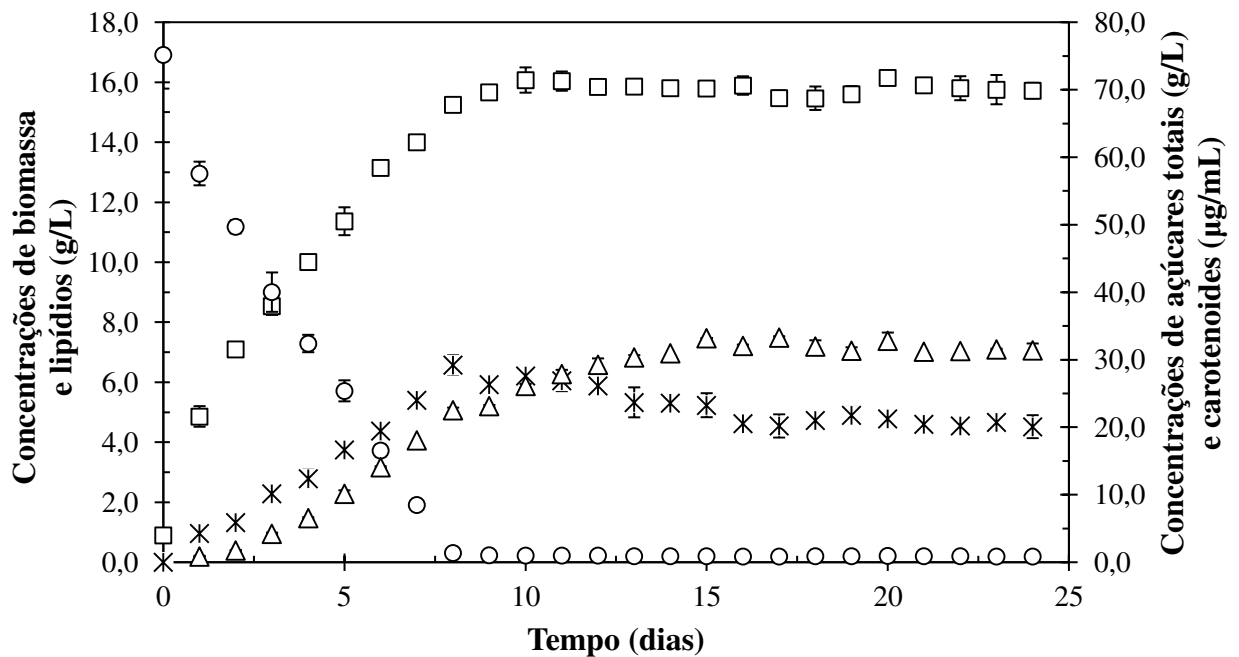
Nos trabalhos de Bonturi *et al* (2017) e Ling *et al* (2013), os autores observaram maior conteúdo de lipídios em cultivos com a limitação de nutrientes como fósforo e nitrogênio, e também que o conteúdo se dava desde o início do cultivo, sendo maior da fase exponencial até a fase estacionária do cultivo. Estudos realizados no LEBp corroboram com o comportamento retratado pelos autores, como pode ser observado na Figura 2.2. Percebe-se que o crescimento celular se dá juntamente com o conteúdo, o qual apresenta valor máximo em 192 h (8 dias) de cultivo. Após esse tempo, a fonte de carbono se esgota e a levedura utiliza o próprio lipídio como fonte de carbono para manutenção celular (HOLDSWORTH e RATLEDGE, 1988). Dessa forma observou-se que a fonte de carbono é totalmente limitante para produção e biomassa e subprodutos do metabolismo microbiano.

Para promover um maior conteúdo lipídico é necessário adequar a concentração inicial de substrato, pois quando esta é elevada, espera-se que a produção de lipídios seja maior, porém o substrato pode agir como inibidor celular, aumentando a fase *lag* ou até mesmo impossibilitando o cultivo. Quando operado em modo batelada alimentada, tal comportamento não é observado, pois a fonte de carbono e os nutrientes são fornecidos gradualmente (WIEBE *et al.*, 2012). O trabalho de Li *et al.* (2006) mostra que o modo de operação (batelada ou batelada alimentada) não influencia na composição do óleo produzido, mas que o tipo de fonte de carbono e sua concentração utilizada influenciam tanto no crescimento celular quanto no conteúdo lipídico.

Sabe-se que a fase em que o inóculo se encontra também pode influenciar o conteúdo lipídico, pois a cepa apresenta comportamentos diferentes em cada uma de suas fases de crescimento frente às diferentes condições do meio, podendo favorecer ou inviabilizar o cultivo. Dessa forma, Li *et al.* (2006) investigaram a melhor fase de inóculo da levedura *R. toruloides* para o meio YPD e encontraram que o inóculo de 28 h apresentou maior conteúdo

lipídico nesse meio. Porém, tal comportamento ainda não foi investigado na literatura para a cepa *R. toruloides* cultivada em outros meios de cultivo, embora o desvio dos comportamentos na síntese de produtos e até mesmo no tempo da fase *lag* tenham sido retratados para outras leveduras e bactérias (CABRAL *et al.*, 2003; CARON *et al.*, 1997).

Figura 2.2: Cinética de conteúdo lipídico e crescimento celular da levedura *Rhodospordium toruloides* utilizando xilose e glicose (70 g/L) como fonte de carbono e meio com limitação de nitrogênio, em uma razão C/N igual a 100 e modo de operação batelada (dados não publicados de Pinheiro M., estudos realizados no LEBp). Concentrações de: □ biomassa, * lipídios, ○ açúcares totais e Δ carotenoides totais.



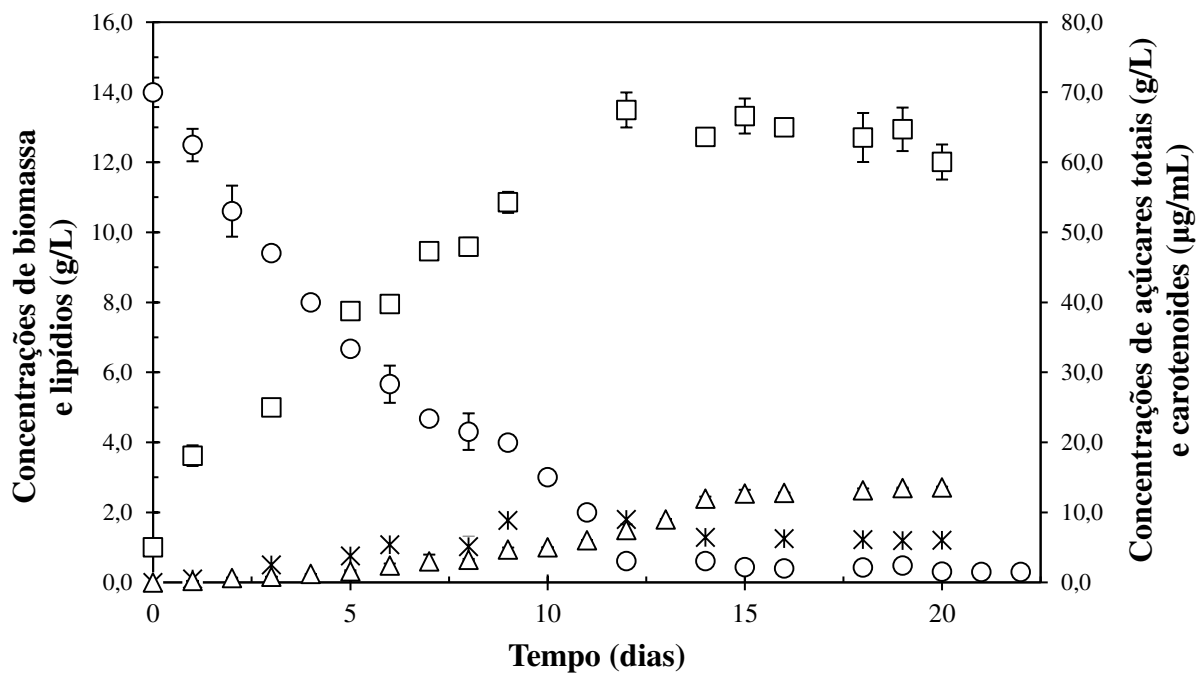
2.4.3. Influência da razão C/N no conteúdo lipídico

Como citado anteriormente, o processo de produção de OM se dá devido a algumas particularidades do microrganismo, dentre elas, a necessidade da limitação de nitrogênio no meio para induzir a via metabólica de conteúdo lipídico na célula (BOULTON e RATLEDGE, 1984; BEOPOULOS *et al.*, 2011). O nitrogênio e os fosfatos são consumidos primeiramente, possibilitando um rápido crescimento celular, compondo proteínas e estruturas celulares. No entanto, são necessárias fontes de carbono em excesso para suprir o gasto energético da célula

e tais fontes são também utilizadas como substrato e convertidas em triacilglicerídeos, que são armazenados na forma de lipídios (LEMAN, 1997).

A Figura 2.3 apresenta o comportamento da levedura *R. toruloides* em meio sintético contendo xilose e glicose a uma razão C/N igual a 20. O comportamento observado é bem diferente quando comparado ao da Figura 2.2, que apresenta carbono em excesso. Neste meio de cultivo, não há limitação de nitrogênio, portanto, a maior parte da fonte de carbono é destinada para a produção de biomassa. Em comparação com o cultivo em C/N igual a 100 (Figura 2.2), o cultivo realizado em C/N igual a 20 (Figura 2.3) apresentou concentrações de lipídios bem menores assim como a taxa de consumo de açúcares, esgotando-os próximo ao vigésimo dia de cultivo. Além da produção de lipídios, a produção de carotenoides também foi favorecida em uma razão C/N mais alta.

Figura 2.3: Cinética de conteúdo lipídico e crescimento celular utilizando xilose e glicose (70 g/L) como fonte de carbono e meio com limitação de nitrogênio, em uma razão C/N 20 e modo de operação batelada (dados não publicados de Pinheiro M., estudos realizados no LEBp). Concentrações de: \square biomassa, \ast lipídios, \circ açúcares totais e Δ carotenoides totais.



Este favorecimento do conteúdo lipídico torna necessária uma alta razão C/N, pois o fornecimento em excesso de carbono permite um alto conteúdo lipídico sem impedir o crescimento celular. Observa-se na literatura que os maiores teores celulares e de lipídios foram em meios contendo altas concentrações de glicose (LI *et al.*, 2007), e também os maiores valores para os mesmos teores observados por Bonturi (2016) foram obtidos com meio sintético contendo fonte de nitrogênio limitada e uma mistura de açúcares xilose e glicose, justamente a mistura de açúcares encontrados nos hidrolisados hemicelulósicos. Caso utilizado esse substrato como meio de cultivo, seria necessária sua suplementação com outras fontes de carbono visto que ele possui uma razão C/N baixa. A estratégia utilizada por Bonturi *et al.* (2017) para aumentar a razão C/N foi a adição de glicerol ao HHBCA, pois este é um subproduto da produção de biodiesel, gerado em grandes quantidades e, por se tratar de uma matéria-prima de baixo custo, poderia ser utilizado na produção do óleo microbiano sem aumentar o custo final do OM (BOMMAREDDY *et al.*, 2015).

Além da adição de glicerol, podem ser feitas as adições de açúcares fermentescíveis ao meio como glicose, xilose, sacarose, entre outros, e essa composição do meio de cultivo pode ser responsável por aumentar consideravelmente o conteúdo lipídico.

2.5. Composição do meio de cultivo de *R. toruloides* para produção de OM

Como discutido anteriormente, o tipo da fonte de carbono utilizado no cultivo de *R. toruloides* influencia tanto a taxa de crescimento da biomassa quanto o conteúdo lipídico, mas não na composição dos lipídios. Os ácidos graxos produzidos pela cepa são compostos majoritariamente de ácidos oléicos (C18:1), palmíticos (C16:0) e linoleicos (C18:2), mantendo a mesma proporção independente da fonte de carbono utilizada, como retratado na literatura (BONTURI *et al.*, 2017; SARAN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2009).

Sobre o desenvolvimento da levedura em diferentes tipos de fonte de carbono, Saxena *et al.* (1998) verificaram que cada microrganismo se desenvolve melhor em determinado substrato, sendo que a levedura *Rhodotorula minuta* apresentou taxas de duplicação de 0,34 h⁻¹, 0,30 h⁻¹, 0,36 h⁻¹ e 0,11 h⁻¹ quando cultivadas em glicose, frutose, sacarose e galactose, respectivamente. Em um meio de cultivo contendo diversas fontes de carbono, deve-se ter cautela para evitar a repressão catabólica, que ocorre quando as enzimas utilizadas em uma via alternativa passam a ser produzidas em baixas quantidades pela presença de açúcares de vias principais como, por exemplo, a via da glicose, e dessa forma se tornam incapazes de utilizar o substrato da via alternativa. Além da repressão catabólica, deve-se

investigar sobre a presença de transportadores de membrana do microrganismo, para saber se ele será capaz de assimilar e metabolizar a fonte de carbono (GANCEDO, 1998).

O intuito do processo de produção de OM é que a célula se multiplique e inicie o conteúdo lipídico de forma sinérgica. Para isso, deve haver um balanço entre os nutrientes e substratos utilizados. Todavia, a dificuldade está em se encontrar um substrato que possua as características ideais para a produção de OM por *R. toruloides* e que tenha um baixo custo, a fim de baratear sua produção. Substratos de baixo custo, como hidrolisados e coprodutos de biorrefinaria possuem alguns destes atributos quando analisados separadamente, não sendo considerados ideais para o cultivo da levedura por também possuírem características desfavoráveis. Deve-se verificar então o potencial destes substratos para um cultivo em conjunto, reunindo todas as qualidades e tentando driblar os inconvenientes de cada um (BONTURI *et al.*, 2017).

A seguir, trataremos de coprodutos de biorrefinarias que apresentem potencial como fontes de carbono em cultivos utilizando *R. toruloides* para produção de OM.

2.5.1. Glicerol

O glicerol, glicerina ou 1,2,3 propanotriol, pode ser produzido a partir da transesterificação dos óleos vegetais na produção de biodiesel e na saponificação. Todavia, a sua principal produção se dá como coproduto da produção de biodiesel (cerca de 70%), sendo 374,5 milhões de litros do glicerol bruto produzidos no Brasil em 2017 (ANP, 2018). O glicerol bruto, que corresponde a cerca de 60% do glicerol puro produzido nas biorrefinarias, possui certas impurezas como o solvente utilizado para sua produção (metanol ou etanol), alguns sais, corantes vegetais e também mono e diglicerídeos (ANITHA *et al.*, 2016; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008; SAENGE *et al.*, 2011).

A grande oferta de glicerol no mercado faz com que ele tenha baixo custo, cerca de US\$0,22 por quilograma, visto que sua demanda não é tão grande, sendo utilizado em indústrias farmacêuticas, de plásticos, de combustível e geração de calor entre outros. Dessa forma, é possível sua utilização como fonte de carbono em processos fermentativos. Azambuja (2016) realizou o cultivo de *R. toruloides* em diferentes concentrações de glicerol o que comprovou a capacidade da levedura consumir o substrato e convertê-lo em lipídios. Contudo, apenas o glicerol como fonte de carbono não fornece todos os tipos de nutrientes necessários para o desenvolvimento do microrganismo, sendo necessário suplementar o meio com outras fontes de carbono (AZAMBUJA, 2016; ANITHA *et al.*, 2016).

2.5.2. Melaço de soja

Uma outra fonte de carbono disponível para ser utilizada em processos fermentativos é o melaço de soja. Trata-se de um coproduto da biorrefinaria da soja, obtido a partir da extração alcoólica dos açúcares contidos no farelo de soja. Como dito anteriormente, a soja passa por um processo de extração do óleo, que resulta no farelo da soja. Em seguida, é feita a extração da proteína deste farelo utilizando-se uma mistura de etanol (60%) e água (40%). São separadas duas frações: a fração insolúvel, contendo a proteína, e a fração líquida, contendo os açúcares. A fração líquida é, então, destilada para recuperação do solvente, restando o chamado melaço de soja, que tem rendimento de produção de 16% a partir do grão da soja (ROMÃO, 2011; CJ SELECTA, 2018 – dados da empresa não publicados).

Apesar do alto teor de carboidratos do melaço (20–35%), apenas 2% destes açúcares são assimilados no trato digestivo humano, e por isso, este coproduto é mais aplicado como suplemento em rações animais, embora seu uso não seja muito difundido. A sua composição corresponde a cerca de 50% de sacarose e os demais 50% são compostos de estaquiose, rafinose, frutose e glicose (Tabela 2.1), contendo ainda pequenas quantidades de melibiose, galactose, ramnose, pinitol, verbascose e maltopentoses (ROMÃO *et al.*, 2012).

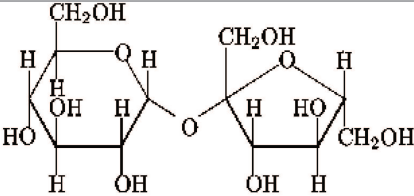
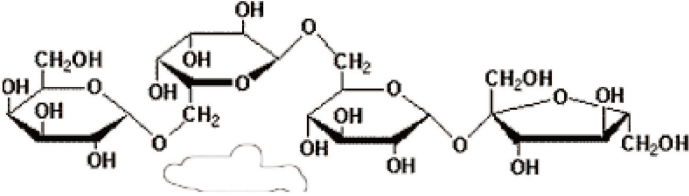
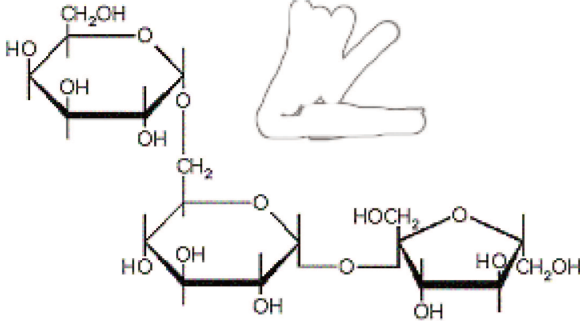
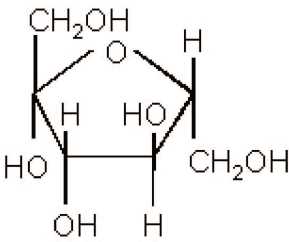
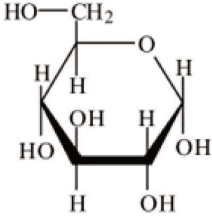
A estaquiose, estruturalmente similar à rafinose, distingue-se apenas por uma molécula de galactose a mais. A hidrólise total destes dois açúcares resulta na obtenção de galactose, frutose e glicose. Devido à complexidade de sua estrutura e à necessidade de enzimas específicas para sua hidrólise (e.g. α -galactosidase), tais açúcares não são absorvidos pelo corpo humano e podem não ser assimilados por alguns microrganismos, tanto pela falta de transportadores de membrana quanto pela ausência das enzimas (ROMÃO *et al.*, 2012). Ainda não houve relatos do cultivo da levedura *R. toruloides* nesse substrato, contudo, a presença da enzima α -galactosidase em algumas famílias da mesma levedura foi observada (GÓES e RIBEIRO, 2002; NAVARRETE e TOVAR-RAMÍREZ, 2014). Além disso, a levedura apresentou capacidade de consumir diversos tipos diferentes de açúcares, inclusive pentoses (BONTURI, 2016).

2.5.3. Hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA)

Os açúcares e oligossacarídeos (principalmente xilose e xilooligômeros) provenientes da fração hemicelulósica de resíduos agroindustriais são uma opção de substrato de baixo custo para o cultivo da *R. toruloides* e produção de OM (BONTURI, 2016; JIN *et al.*, 2015; RATLEDGE, 1991). Tais coprodutos podem ser produzidos em biorrefinarias, em

especial a partir do bagaço de cana-de-açúcar, que tem seu caldo usado em processos fermentativos.

Tabela 2.1: Principais açúcares presentes no melão de soja (dados empresa CJ Selecta).

Componente	Teor (g/kg)	Estrutura molecular
Sacarose	199	
Estaquiose	119	<p style="text-align: center;">b</p> 
Rafinose	50	
Frutose	26	
Glicose	6	

Após ser despolimerizado por diversos processos biológicos, químicos, físicos ou a combinação destes, os açúcares fermentescíveis solubilizados no meio podem ser usados como fonte de carbono em bioprocessos, tal como o de produção de OM (CHERUBINI, 2010; CANILHA *et al.*, 2012).

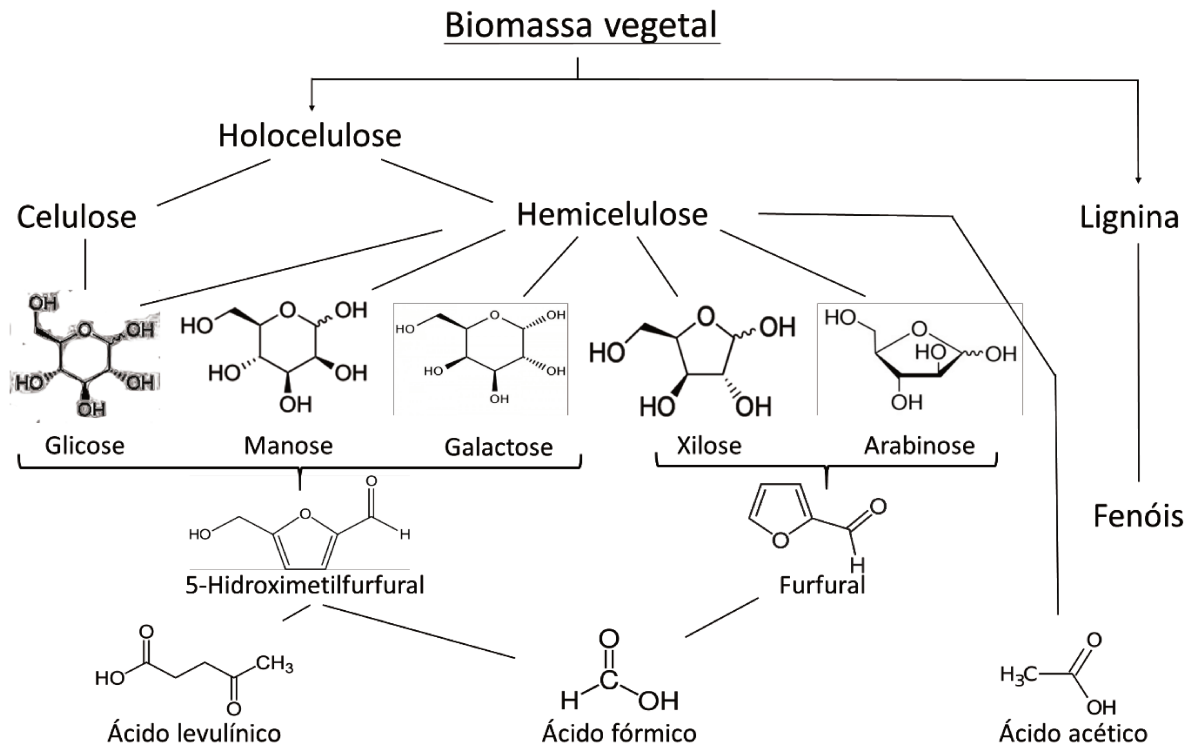
No entanto, há inconvenientes do uso desta fonte de carbono gerados durante o processamento do bagaço de cana-de-açúcar. As reações que despolimerizam a hemicelulose e solubilizam os produtos dessa reação, gerando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA), produzem também inibidores (ácidos orgânicos fracos, derivados de furanos e compostos fenólicos) (Figura 2.4) e, dependendo da concentração de tais substâncias, o meio contendo estes componentes pode se tornar tóxico para o microrganismo (CORADINI *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2009). O HHBCA também apresenta uma baixa razão molar C/N (cerca de 20), enquanto que o ideal para o conteúdo de lipídios é acima de 100 (BONTURI, 2016). Na literatura, há relatos de conteúdo lipídico de 74% da biomassa em razões C/N acima de 450 (apesar do crescimento celular inibido e conseqüente diminuição da produção lipídica total) (BONTURI, 2016; LI *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2011; PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

Para evitar o efeito negativo dos inibidores, destoxificações no hidrolisado podem ser feitas removendo-os do meio (CHANDEL *et al.*, 2013; CORADINI *et al.*, 2015). Tais abordagens podem ser físicas (e.g., evaporação), físico-químicas (e.g., adsorção com resinas de troca iônica, neutralização ou calagem em excesso, adsorção com carvão ativado e extração com solventes orgânicos) e biológicas (e.g., uso de enzimas ou microrganismos) (CANILHA *et al.*, 2012; CHANDEL *et al.*, 2013).

Uma forma alternativa à remoção dos inibidores é realizar a adaptação da cepa aos inibidores do HHBCA tornando a cepa tolerante a estes compostos. Trata-se de uma estratégia relativamente simples e eficiente quando comparada à engenharia metabólica, pois, para tal, não é necessário saber a fundo sobre a genética ou rede metabólica da cepa em questão. Ao realizar a adaptação de *R. toruloides* em HHBCA concentrado e não destoxificado para produção de OM, os autores obtiveram um conteúdo de cerca de 55% de lipídios em biomassa, valores similares aos encontrados pela levedura quando cultivado em meios sintéticos (BONTURI *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2017). Embora eficiente, a adaptação da cepa ao meio demanda tempo e pode não atingir os resultados esperados. De qualquer forma, além da adaptação, é imprescindível a adequação da composição do meio de cultivo às necessidades da

levedura, assim como a determinação das melhores condições de cultivo para a *R. toruloides* (BOMMAREDDY *et al.*, 2015; BONTURI *et al.*, 2017).

Figura 2.4: Compostos formados a partir da hidrólise da matriz hemicelulósica, adaptado de Patel *et al.*, (2016).



Caso o HHBCA seja obtido por via ácida, uma das etapas de preparação que antecedem o cultivo consiste em ajustar o pH para níveis adequados ao desenvolvimento da cultura microbiana. Algumas cepas de *R. toruloides* – como a *R. toruloides* Y4, cepa evoluída em HHBCA – são capazes de acumular lipídios em pH menores que 2,0, embora esta condição não seja favorável para a levedura e o conteúdo de lipídios seja baixo (LI *et al.*, 2007). Mesmo que Dias *et al.* (2015) tenham verificado o pH 4,0 como ótimo para crescimento celular em meio de glicose (com adição de sulfatos, magnésio e extrato de levedura), os melhores resultados obtidos para o conteúdo de lipídios em hidrolisados hemicelulósicos foram em pH 6–7 para as cepas *R. toruloides* AS2.1389 e *R. toruloides* CCT7815 (LI *et al.*, 2006; BONTURI *et al.*, 2017).

O ajuste de pH pode ser feito adicionando-se bases como NaOH (CHAUD, 2010), sendo esse método pouco relatado na literatura, ou então utilizar sais ou óxidos de caráter básico, explorando a instabilidade dos inibidores frente a alterações no pH do meio que causa precipitação dos compostos furanos e fenólicos e além da neutralização dos ácidos orgânicos fracos (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000; SOUZA-SARTORI *et al.*, 2013). A calagem em excesso (adição de CaO) é o mais utilizado por apresentar baixo custo e fornecer íons necessários para favorecer a rota metabólica de conteúdo lipídico, ou que atuem como cofatores de enzimas das vias de conteúdo lipídico (SAUER *et al.*, 1980; RAVINDRAN E JAISWAL, 2016). Porém, o precipitado gerado pelo processo (sulfato de cálcio) adsorve alguns açúcares, como a arabinose e glicose, diminuindo a concentração destes no meio, e conseqüentemente sua razão C/N. Em seguida, há a necessidade de descarte deste precipitado e a adição de uma etapa de filtração antes da utilização do HHBCA como substrato para o processo de produção de OM.

A fim de aumentar a razão C/N do HHBCA, podem ser utilizadas variadas fontes de carbono na sua suplementação, e, visando reduzir o custo da produção de OM, busca-se a utilização de matérias-primas de baixo custo. O uso de outros resíduos agroindustriais, de forma geral, é uma alternativa para reaproveitar um material rico em carga orgânica que demandaria tratamento antes de seu descarte e, ao empregá-lo como matéria-prima, observar-se-ia a diminuição de custos dos processos, tanto daquele que se tornaria resíduo quanto daquele que será usado como matéria-prima (FERNANDES e MIGUEL, 2012).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo e sua manutenção

Este trabalho foi realizado com a cepa *Rhodospiridium toruloides* CCT 7815 adaptada para o crescimento em HHBCA por Bonturi (2016) no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) da FEQ- Unicamp (BONTURI *et al.*, 2017).

3.1.1. Preparo do pré-inóculo e inóculo

Para o preparo do pré-inóculo utilizou-se a cepa congelada em tubos tipo Eppendorf e armazenados em meio YPD (20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura) com 10% de glicerol a -15°C. Um tubo contendo a cepa (1 mL) foi descongelado e adicionado a 9 mL de meio YPD em um tubo do tipo Falcon. Em seguida, o tubo contendo essa suspensão de células de 10 mL (cepa e meio YPD) foi mantido sob agitação à temperatura de 28°C e 200 rpm por 24 h, gerando o que se chamou de pré-inóculo.

Iniciou-se a produção do inóculo cultivando-se uma mistura de 10 mL de pré-inóculo e 90 mL de meio YPD em frasco Erlenmeyer de 500 mL a 28°C a 200 rpm por 24 h. Após esse período, a suspensão de células passou por centrifugação (centrífuga Eppendorf modelo 5804 R) a 1789g, 4°C durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e as células, ressuspendidas em solução salina (NaCl 0,9%), consistiram no inóculo.

Todos os cultivos (tanto em meios sintéticos, quanto cultivos em hidrolisado, melação de soja e glicerol) contiveram também 1% (v/v) da solução de micronutrientes proposta por Meesters *et al.* (1996) (Tabela 3.1) na sua composição.

3.2. Quantificação da biomassa celular

A quantificação da biomassa foi feita por gravimetria. Utilizou-se um volume de 30 mL de meio fermentado contendo células que foram centrifugadas a 1789g por 15 min, lavadas duas vezes com água e secas em estufa a 90°C por 24 h em frascos Schott de 100 mL previamente pesados, cor âmbar, até que a massa do frasco fosse constante e em seguida foram novamente pesados. A massa de células contida em cada alíquota foi determinada pela diferença obtida nas massas dos frascos após a etapa de secagem, em balança analítica. O valor da

biomassa obtido a partir do volume de fermentado foi relacionado para obter a concentração de biomassa de acordo com a equação 1.

$$\text{Concentração de biomassa} = (m_{\text{biomassa}} / V_{\text{fermentado}}) \quad (1)$$

Tabela 3.1: Composição da solução de micronutrientes proposta por Meesters *et al.* (1996).

Compostos	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	2,70
EDTA	0,10
Na ₂ HPO ₄	0,95
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,20
Extrato de levedura	0,10
MnSO ₄ .H ₂ O	0,076
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10
Ácido cítrico. H ₂ O	0,52
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,55
CaCl ₂ .H ₂ O	4,00
H ₂ SO ₄ 18 mol/L	0,10*

*Em mililitros por litro (mL/L)

3.3. Extração e quantificação de lipídios

A extração de lipídios foi feita por solventes orgânicos utilizando a metodologia adaptada de Folch *et al.* (1957) selecionada por Bonturi (2016) por apresentar melhor reprodutibilidade e melhor eficiência, sendo utilizados clorofórmio e metanol na proporção 2:1. A biomassa utilizada nas análises de lipídio foram obtidas de acordo com o tópico 3.2. Posteriormente, as células foram raspadas para desuni-las do recipiente e em seguida foram minimamente trituradas por maceração em almofariz a fim de aumentar a superfície de contato destas com 80 mL do solvente que foi adicionado no frasco, e este, então, foi deixado em repouso por 24 h. Após este período, as células (*debris* celular) foram separadas por filtração simples em papel filtro Whatman nº1, sendo o filtrado (solvente) coletado em balões volumétricos de 100 mL, previamente pesados e rotulados. A remoção do solvente foi feita por evaporação a 70°C em evaporador rotativo modelo TE-211 (Tecnal, Brasil), acoplado a um banho termostático de água fria a 4,0 °C e uma bomba de vácuo. Após a total evaporação do

solvente, sendo os traços residuais de solvente removidos por aquecimento dos balões em estufa a 100 °C por cerca de 10 min, somente os lipídios restaram nos balões, que foram novamente pesados. A massa de lipídios contido em cada alíquota foi determinada pela diferença obtida nas massas dos balões após a etapa de secagem, em balança analítica. O valor da massa de lipídios obtido a partir do volume de fermentado foi relacionado para obter a concentração de lipídios de acordo com a equação 2.

$$\text{Concentração de lipídios} = (m_{\text{lipídios}} / V_{\text{fermentado}}) \quad (2)$$

3.4. Obtenção e caracterização dos substratos

3.4.1. Hidrolisado e suplementos

O HHBCA foi obtido do Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios) da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. A hidrólise e a solubilização da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar foram feitas segundo metodologia proposta por Alves *et al.* (1998), na qual foram adicionados em um reator 100 g de H₂SO₄ (98% de pureza) a 1kg de bagaço de cana-de-açúcar. Em seguida a temperatura foi elevada para 121°C e mantida durante 20 min. Após resfriado, o líquido foi filtrado (hidrolisado) e estocado em câmara fria a 4°C (ALVES *et al.*, 1998). Concentrou-se o hidrolisado através da evaporação em béquer com agitação magnética na temperatura de 80°C até que a concentração dos açúcares atingisse cerca de 30 g/L, sendo necessário fazer com que o volume final fosse 50% do volume inicial, dependendo do lote de HHBCA utilizado.

O melaço de soja foi obtido por doação da empresa CJ Selecta, situada em Araguari - MG. O produto cedido foi armazenado em freezer e um mesmo lote foi utilizado para todos os experimentos.

A solução de glicerol (pureza 99,5% fabricante Labsynth) foi preparada a 60% (v/v), simulando o glicerol bruto, cuja pureza pode variar de 50-65%, e em seguida a solução foi autoclavada para seu uso nos cultivos (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008; SAENGE *et al.*, 2011).

Os meios de cultura, soluções e vidrarias utilizadas durante o cultivo foram esterilizados por calor úmido em autoclave a 121°C por 20 min com exceção do HHBCA, que foi filtrado em um dispositivo esterilizante com membrana hidrofílica de polietersulfona e tamanho de poro de 0,22 µm (Millipore, EUA).

3.4.2. Quantificação dos açúcares, inibidores e razão molar C/N

Tanto as concentrações dos açúcares xilose, arabinose e glicose quanto as de ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e glicerol nos HHBCA *in natura* e com o pH ajustado foram analisadas por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) realizada no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC, Faculdade de Engenharia Química, Unicamp), utilizando o cromatógrafo Thermo Scientific, modelo Dionex Ultimate 3000, módulo de bomba: LPG -3400SD, módulo de Injetor WPS – 3000TSL, detector espectrofotométrico por conjunto de arranjo de diodos DAD 3000, detector de índice de refração RI-101 (Shodex), Software Chromeleon 6.80, empregando coluna Aminex HPX-87H utilizando como fase móvel ácido sulfúrico 5 mmol/L, volume de injeção 20 µL e fluxo de 0,6 mL/min, temperatura do amostrador 15°C e temperatura do forno da coluna 50°C.

Os fenóis foram quantificados segundo metodologia descrita por Hodge *et al.* (2009) em que 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu foi adicionado a 200 µL de HHBCA diluído 40 vezes e 2600 µL de água destilada. Esta solução foi armazenada ao abrigo da luz por 6 minutos e, em seguida foram adicionados 2000 µL da solução de K₂CO₃ agitados em vórtex e novamente armazenados ao abrigo da luz por 90 min. Por último a solução foi centrifugada a 7155g por 15 min. O sobrenadante foi coletado e sua absorbância medida a 750 nm.

Para a quantificação dos açúcares do melão de soja (estaquiiose, sacarose, glicose e rafinose) e também do meio otimizado (contendo glicerol e HHBCA), utilizou-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-20A Prominence empregando coluna SUPELCOGEL C-610H com fase móvel ácido fosfórico (0,1%), fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32°C e volume de injeção de 20 µL, sendo o etanol e o açúcar determinados pelo detector de índice de refração (RID), e os ácidos orgânicos pelo detector UV-Vis. Tal, metodologia foi realizada no laboratório de análises do Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química na Universidade Federal de Uberlândia.

A análise da razão C/N foi realizada pela Central Analítica, Instituto de Química, Unicamp, em equipamento Analisador Elementar de CHN Perkin Elmer 2400, conforme instruções do fabricante. Na análise elementar, as amostras são oxidadas em atmosfera de oxigênio e os produtos produzidos na zona de combustão (CO₂, vapor de água e nitrogênio) são detectados em função da sua condutividade térmica e convertidos em porcentagens de C, H e N nas amostras.

3.5. Determinação da metodologia de ajuste de pH do HHBCA

O pH do hidrolisado foi ajustado para valores entre 5,5 e 6,0 com auxílio de óxido de cálcio (CaO) na forma de pó ou com “lentilhas” de hidróxido de sódio (NaOH) sob forte agitação. Após essa etapa, uma centrifugação seguida de filtração em papel filtro Whatman n° 1 removeu sólidos maiores formados e outra filtração em uma membrana porosa de 0,22 µm (Millipore, Bedford, EUA) esterilizou o substrato para seu uso em cultivos com a *R. toruloides*.

A caracterização dos dois HHBCAs – Hidrolisado ajustado por CaO (H_{CaO}) e hidrolisado ajustado por NaOH (H_{NaOH}) – tratados pelas duas metodologias foi realizada em termos da concentração dos açúcares xilose, glicose e arabinose, assim como a quantificação de fenóis, HMF e furfural, a fim de verificar a o efeito da metodologia de ajuste de pH na composição do meio. Em seguida, cultivos da *R. toruloides* nos HHBCA com pH ajustado foram feitos para comparar o comportamento da cepa. Os cultivos foram realizados sob agitação de 200 rpm a 28°C durante 120 h. Avaliou-se tanto os perfis de consumo dos açúcares totais e crescimento de biomassa quanto o conteúdo lipídico. A partir destes resultados a metodologia para ajuste do pH foi definida e utilizada para os cultivos subseqüentes.

3.6. Determinação da fase de crescimento ideal para inóculo

O perfil de crescimento celular de um cultivo de *R. toruloides* em meio YPD foi acompanhado ao longo de 60 h a fim de se determinar as fases de crescimento do inóculo (*lag*, aceleração, crescimento exponencial, desaceleração e fase estacionária) a partir da linearização da equação de Monod. Montou-se uma curva de calibração relacionando a concentração celular e absorvância medida em espectrofotômetro para determinação da concentração celular em cada fase de crescimento (Tabela A1, Apêndice). Em seguida, suspensão de células correspondentes às três fases de interesse (aceleração, fase *log* e desaceleração) foram inoculados e cultivados em meio contendo 60 g/L de xilose, 10 g/L de glicose, 1,5 g/L de MgSO₄.7H₂O, 2,0 g/L de extrato de levedura, 0,4 g/L de (NH₄)₂SO₄, 3,6 g/L de KH₂PO₄ e 1% de solução de micronutrientes, com razão C/N 100, razão C/P 88 e pH 6,00 sob agitação de 200 rpm a 28°C durante 96 h. A partir do cultivo foram quantificadas as concentrações de biomassa e lipídios, assim como o conteúdo lipídico, tendo como objetivo selecionar a fase do inóculo que favoreceu a produção lipídica. A seleção da fase de inóculo mais adequada foi feita baseada nos resultados de produtividade lipídica e biomassa e dados da literatura.

3.7. Otimização do meio de cultivo

A composição ótima do meio de cultivo foi determinada pela metodologia de análise de superfície de resposta, visando estudar o efeito sinérgico entre o HHBCA, os suplementos e os sais inorgânicos selecionados. Para isso, foram preparados dois planejamentos experimentais com variáveis e níveis determinados com base na literatura, um inicial para avaliação dos efeitos principais das variáveis dependentes, e um principal para geração da superfície de resposta.

3.7.1. Planejamento de experimentos para avaliação dos efeitos principais

O primeiro planejamento experimental preparado foi baseado na metodologia de Plackett e Burman, (1946), denominado PB-12 (Tabela A4, Apêndice), para avaliação do efeito principal das variáveis no crescimento e produtividade de óleo da *R. toruloides*. Para tal, utilizou-se o software Statistica 8.0 (StataSoft Inc., Tulsa, EUA) e em seguida os resultados foram analisados estatisticamente considerando um nível de 95% de confiança.

Os níveis para cada variável foram determinados baseando-se em dados da literatura e dados experimentais obtidos no LEBp em experimentos anteriores e estão descritos na Tabela 3.2. As variáveis dependentes foram a concentração de biomassa e de lipídios para posterior cálculo do conteúdo lipídico determinado a partir da equação 3. O conjunto de dados resultantes deste planejamento foi utilizado para montar os ensaios seguintes, descritos no próximo tópico.

$$\text{Conteúdo lipídico} = (m_{\text{lipídios}} / m_{\text{biomassa}}) \times 100 \quad (3)$$

3.7.2. Planejamento de experimentos para geração da superfície de resposta

Após obter dados sobre a importância de cada variável estudada, utilizou-se um delineamento composto centrado rotacionado (DCCR) (Tabela A6, Apêndice) baseado nos resultados do PB-12, cujos níveis estão descritos na Tabela 3.3. O planejamento teve como objetivo avaliar por meio da metodologia de superfície de resposta a composição de meio que mais produzisse OM, além de verificar a tendência das variáveis no conteúdo lipídico. Adotou-se o teste F a um nível de 90% de confiança para validar o modelo matemático.

As variáveis dependentes foram a concentração de biomassa (em g/L) e de lipídios (em g/L) para posterior cálculo do conteúdo lipídico através da equação 1. Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do software Statistica 8.0 (StataSoft Inc., Tulsa,

EUA). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o tópico 3.7.3. a seguir, apenas adicionando-se 50 g/L de melação de soja em cada condição.

Tabela 3.2: Valores utilizados para as variáveis em cada nível do planejamento PB-12.

Variável	-1	0	+1
Glicerol bruto (g/L)	15,0	35,0	55,0
Melaço de soja (g/L)	10,0	25,0	40,0
Extrato de levedura (g/L)	2,0	6,0	10,0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0	1,5	3,0
FeCl ₃ (g/L)	0	0,5	1,0
K ₂ SO ₄ (g/L)	0	1,5	3,0

Tabela 3.3: Valores utilizados para as variáveis em cada nível do planejamento DCCR.

VARIÁVEL	- α	-1	0	+1	+ α
Glicerol bruto (g/L)	30,2	36,0	50,0	64,0	69,8
Extrato de levedura (g/L)	0,0	0,41	1,5	2,6	3,0

3.7.3. Metodologia do cultivo de *R. toruloides* para execução dos planejamentos experimentais

Os ensaios determinados pelos planejamentos de experimentos (tópicos 3.7.1. e 3.7.2) foram realizados em triplicatas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 45 mL de meio de cultivo e 5 mL de inóculo a uma OD₆₀₀ inicial igual a 2 UA, sob agitação de 200 rpm, a 28°C durante 120 h em uma incubadora TE-211 (Tecnal, Brasil).

Dos 50 mL de meio de cultivo, 80% correspondia ao HHBCA com o pH ajustado entre 6,0 e 7,0 através da adição de CaO e 10% ao inóculo. Os 10% restantes foram utilizados para agregar os suplementos descritos na Tabela 3.2 ou Tabela 3.3, tendo água sido adicionada quando necessário para se completar os 100%. O meio de cultivo contendo HHBCA suplementado teve adicionado em sua composição, 1 mL da solução de traços elementares (Tabela 3.1).

3.8. Estudo cinético do cultivo da *R. toruloides* no meio otimizado

O estudo cinético da cepa *R. toruloides* CCT7815 na condição ótima determinada pelo DCCR foi feita com o intuito de comprovar os valores obtidos no planejamento e avaliar

o perfil de produção lipídica e de biomassa além de avaliar o consumo dos açúcares ao longo do tempo. Os ensaios foram conduzidos em triplicatas em frascos Erlenmeyer de 250 mL a 200 rpm, 28°C e OD₆₀₀ inicial igual a 2 UA em que amostras do meio em fermentação eram analisados a cada 24 h. O meio de cultivo utilizado continha cerca de 30 g/L (dependendo do lote) dos açúcares contidos no HHBCA (xilose, glicose e arabinose), 50 g/L de melação de soja, 50 g/L de glicerol bruto, 1,5 g/L de extrato de levedura e 1% v/v de solução de micronutrientes.

3.9. Determinação da concentração celular inicial do inóculo para cultivos

A concentração inicial do inóculo foi estudada após a determinação da composição do meio de cultivo otimizado para a produção de OM. Testou-se as concentrações iniciais de inóculo iguais a 1,0; 2,0 e 4,0 UA. O pré-inóculo e o inóculo foram preparados de acordo com o item 3.1.1. Os inóculos das respectivas concentrações foram cultivados separadamente no meio otimizado sob agitação de 200 rpm, a 28°C durante 120 h em uma incubadora TE-211 (Tecnal, Brasil) e cada ensaio foi avaliado em relação às concentrações lipídica, e de biomassa e conteúdo lipídico.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das fontes de carbono

4.1.1. Características do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA)

A caracterização do HHBCA em relação ao conteúdo de carboidratos permitiu verificar que os açúcares mais abundantes são a xilose e a arabinose, seguidas da glicose (Tabela 4.1). Isso ocorre, pois, o HHBCA foi obtido a partir de um tratamento ácido, o que acarretou na solubilização da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, fração essa responsável pelo conteúdo de pentoses na sua maioria, como a xilose e arabinose, e algumas hexoses como a glicose, além do ácido acético (HAc). Parte das outras frações (lignina e celulose) também são solubilizadas, porém em menores quantidades. Concomitante à solubilização dos carboidratos, há a produção dos inibidores furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e fenol (PATEL *et al.*, 2016).

Tabela 4.1: Quantificação dos componentes dos hidrolisados original (HHBCA) e com pH ajustado e concentrado.

Hidrolisado	Concentrações (g/L)						
	Xilose	Arabinose	Glicose	HAc	HMF	Furfural	Fenol
HHBCA	17,82	1,41	0,79	3,28	0,015	0,27	6,80
Concentrado, pH ajustado e filtrado*	24,04	1,70	1,92	2,68	<0,01	0,04	2,99

*Os HHBCA variam a concentração dos açúcares e inibidores de acordo com o lote utilizado.

Em elevadas temperaturas e altas pressões, como no caso do tratamento utilizado, a hexose glicose, produzida a partir da fração celulósica, é convertida no inibidor HMF; já a xilose é degradada em furfural, e por ser mais presente na fração hemicelulósica (fração

solubilizada no tratamento ácido utilizado neste trabalho) apresenta maior concentração que o HMF. Os compostos fenólicos, são gerados a partir da lignina e podem ser considerados os principais responsáveis pela inibição do crescimento microbiano neste HHBCA devido à sua maior concentração em relação aos demais inibidores.

4.1.2. Características do melão de soja

A quantificação dos açúcares do melão de soja (Tabela 4.2) mostra que a sacarose é o açúcar mais abundante neste substrato e que sua concentração é duas vezes maior que a da estaquiase, segundo açúcar mais presente, e 30 vezes maior que a da glicose, sendo este açúcar o de menor concentração dentre os açúcares analisados neste substrato. A produção de melão de soja não gera nenhum inibidor do crescimento microbiano, como é o caso do HHBCA, e os solventes utilizados em sua extração são completamente retirados do meio por evaporação.

Tabela 4.2: Composição média dos açúcares e de ácido acético contidos no melão de soja.

Concentrações (g/L)					
Glicose	Sacarose	Estaquiase	Rafinose	Frutose	HAc
8,39	278,59	166,59	69,99	36,39	2,6

*Dados fornecidos pela empresa CJ Selecta.

4.1.3. Avaliação da razão molar C/N do HHBCA, melão de soja e extrato de levedura

A composição mássica dos substratos utilizados em termos de carbono e nitrogênio está apresentada na Tabela 4.3. Sabe-se que o bagaço de cana-de-açúcar possui baixa quantidade de proteínas em sua composição, portanto a quantidade de nitrogênio solubilizado no HHBCA é pequena. Ademais, a quantidade de carboidratos solubilizados também é relativamente baixa, acarretando em uma baixa razão molar C/N ao HHBCA (ANTUNES *et al.* 2014). No melão de soja, a porcentagem de nitrogênio é maior que a encontrada no HHBCA, pois a extração das proteínas da soja não é completamente eficiente, havendo resquícios destas na fração solúvel que contém os açúcares (ROMÃO *et al.*, 2012). Entretanto, a quantidade de carboidratos disponíveis no melão é muito maior quando comparado ao HHBCA; dessa forma a razão molar C/N deste substrato é maior que a do hidrolisado.

O extrato de levedura, por sua vez, apresenta uma composição rica em vitaminas (PEREIRA *et al.*, 2008) responsável pela alta proporção mássica de carbono e, apesar do alto teor de carbono, esse substrato apresenta baixa razão molar C/N por conter alta concentração de nitrogênio em sua composição. Por isso este substrato é amplamente empregado como fonte de nitrogênio em bioprocessos.

Tabela 4.3: Composição mássica de carbono e nitrogênio dos substratos utilizados.

	C (% m/m)	N (% m/m)	Razão molar C/N
HHBCA	1,4 ($\pm 0,03$)	< 0,1 ($\pm 0,01$)	14,03
Melaço de soja	31,5 ($\pm 0,2$)	0,8 ($\pm 0,1$)	45,94
Extrato de levedura	38,5 ($\pm 0,6$)	11,8 ($\pm 0,2$)	3,81

4.2. Determinação da metodologia de ajuste de pH do HHBCA

O HHBCA teve seu pH ajustado por dois métodos: adição de CaO ou adição de NaOH. A caracterização dos HHBCA após os diferentes tratamentos de ajuste de pH está apresentada na Tabela 4.4. Nota-se que o hidrolisado tratado com CaO (H_{CaO}) reduziu o teor de fenóis em cerca de 53%, enquanto o hidrolisado tratado com NaOH (H_{NaOH}) apresentou redução de apenas 5,3%. Tal comportamento também foi apresentado por Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000) ao comparar a utilização de $Ca(OH)_2$ e NaOH. Segundo os autores, a adição de $Ca(OH)_2$ e o consequente aumento no pH acarretaram na precipitação dos inibidores, furfural, HMF e fenol. Além do ajuste de pH para valores adequados ao crescimento microbiano, sabe-se que a remoção dos inibidores do meio de cultivo pode aumentar o conteúdo lipídico e o crescimento celular, como retratado por Huang *et al.* (2011) que dobrou a produção de lipídios ao utilizar o hidrolisado destoxificado como meio de cultivo.

Além da precipitação dos inibidores, quando realizado o ajuste do pH com NaOH pode-se observar uma diminuição na concentração dos açúcares, principalmente a de arabinose que foi praticamente esgotada dos meios com pH ajustado. Este comportamento também foi relatado por Chaud (2010), sendo que o ajuste com NaOH foi a condição que apresentou a maior perda na concentração dos açúcares em relação à utilização de CaO.

Tabela 4.4: Caracterização do hidrolisado original (HHBCA) e após ajuste de pH com CaO (H_{CaO}) ou NaOH (H_{NaOH}).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Hidrolisado	Concentrações (g/L)						
	Glicose	Xilose	Arabinose	HAc	HMF	Furfural	Fenol
HHBCA	0,79	17,82	1,41	3,28	0,02	0,270	6,80
H _{CaO}	0,91	20,85	<0,001	3,77	<0,001	0,003	3,19
H _{NaOH}	0,72	16,12	<0,001	2,93	<0,001	<0,001	6,44

Além disso, a capacidade do NaOH de precipitação dos inibidores é baixa, visto que a concentração de fenóis ainda estava alta após o ajuste do pH. Verifica-se também que ambos os tratamentos causaram uma perda no volume ao final dos procedimentos, sendo esta de 4% para o H_{CaO} e 2% para o H_{NaOH}, comportamento e valores também observado por Chaud (2010). Acredita-se que a maior perda de volume do HHBCA tratado com CaO se dá, pois, o sulfato de cálcio (CaSO₄), um dos compostos precipitados formados durante o tratamento e retirado do meio através de filtração, possui características higroscópicas, absorvendo parte da água contida no hidrolisado. Tal fenômeno também pode explicar o aumento na concentração dos açúcares contidos no H_{CaO} (MANDAL e MANDAL, 2002).

No tocante ao crescimento da *R. toruloides* no H_{CaO} e H_{NaOH}, embora a concentração de ácido acético fosse maior no H_{CaO}, o efeito de inibição não foi o mais importante, pois os maiores teores de lipídios e biomassa celular encontrados foram para essa condição, além do cultivo não ter sido retardado ou prejudicado pela redução na produção final de biomassa ou lipídio (Figura 4.1). Conforme retratado por Huang *et al.* (2012), a levedura pode utilizar o ácido acético como fonte de carbono, assim como a levedura pode se adaptar ao ambiente e dessa forma o ácido orgânico perde sua função inibitória. O caso observado neste trabalho foi o consumo total do ácido acético pela levedura em ambos os casos (Tabela A2 e A3, Apêndice), servindo como fonte de carbono e aumentando o pH do meio. O ácido acético também foi retratado por Huang *et al.* (2012) como responsável por desacelerar o consumo de glicose e xilose e influenciar na atividade da enzima málica, uma das mais importantes na via de biossíntese lipídica.

Como dito anteriormente, após 120 h, o cultivo em H_{CaO} apresentou maior OD₆₀₀ (20,1 UA) do que o cultivo com hidrolisado H_{NaOH} (16,4 UA). No tocante ao consumo de xilose, o experimento utilizando H_{CaO} também apresentou maiores valores de conversão de açúcar, 92%, frente aos 72% (Tabela 4.5) observados no experimento com H_{NaOH}, provavelmente em função da maior concentração celular para esta condição. O maior poder tamponante do CaO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

possivelmente contribuiu para o maior desenvolvimento celular, visto que o pH do H_{NaOH} ao final do cultivo era 8,8 e o pH do H_{CaO} era 7,6. Valores de pH na faixa de 5,5-7,0 são comumente adotados para o cultivo desta cepa, favorecendo a utilização do H_{CaO} (BONTURI *et al.*, 2017; FEI *et al.*, 2016).

Outro motivo que possibilitou o pior desempenho da condição H_{NaOH} foi a alta concentração de fenóis no meio, por ser considerado um composto inibidor do crescimento microbiano atuando nas membranas celulares, inibindo enzimas e causando danos na estrutura do DNA (VAN DER POL *et al.*, 2014).

Figura 4.1: Cinéticas de consumo do substrato e crescimento celular da *R. toruloides* quando cultivados em H_{CaO} e H_{NaOH} por 120 h. Consumo de xilose: ○ H_{CaO} e △ H_{NaOH} . OD_{600 nm}: ● H_{CaO} e ▲ H_{NaOH} .

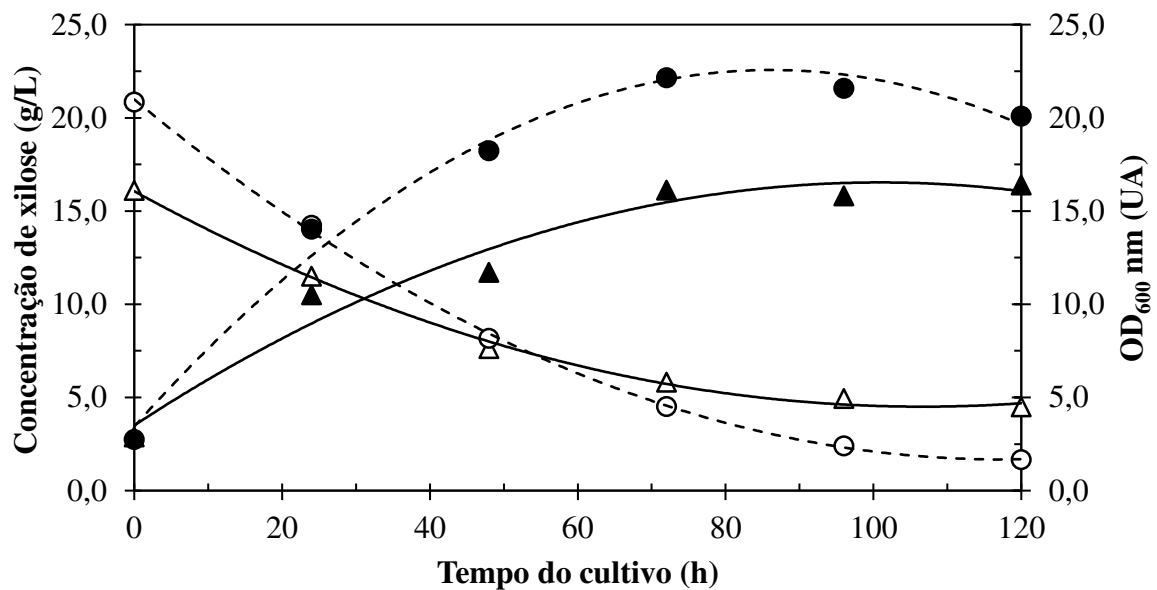


Tabela 4.5: Dados de produtividade ao final de 120 h de cultivo em H_{CaO} e H_{NaOH} .

	pH final	Conversão de açúcares	Concentração de biomassa (g/L)	Concentração de lipídeos (g/L)	Conteúdo lipídico (%)	Produtividade lipídica [mg/(L.h)]
H_{CaO}	7,6	92%	4,9	2,74	56,74	22,83
H_{NaOH}	8,8	72%	4,2	1,49	36,02	12,42

No tocante à produção de biomassa e OM, o hidrolisado tratado com CaO apresentou melhores resultados quando comparado com o hidrolisado tratado com NaOH, tanto

em termos de concentração celular (4,9 g/L versus 4,2 g/L) quanto em conteúdo lipídico (57% versus 36%). Estes resultados foram alcançados muito provavelmente em função da menor concentração de compostos fenólicos no meio H_{CaO} e do maior poder tamponante do CaO. Mesmo gerando sulfato de cálcio durante a calagem e a perda de volume, o CaO se apresenta como melhor opção para tratamento de hidrolisado para produção de lipídeos por *R. toruloides*.

4.3. Determinação da idade ideal do inóculo

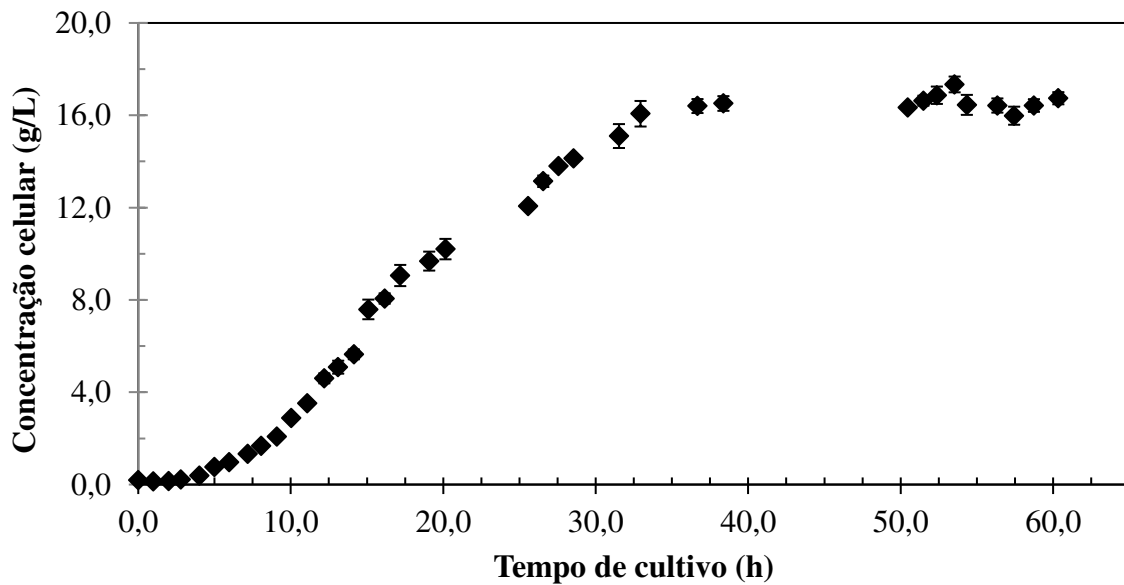
A levedura *R. toruloides* teve seu perfil de crescimento em meio YPD traçado ao longo de 60 h a fim de determinar as fases de crescimento (Figura 4.2). A partir deste perfil foi possível determinar os tempos das diferentes fases de crescimento do inóculo (*lag*, aceleração, exponencial, desaceleração e estacionária), a partir da linearização da equação de Monod. De acordo com o perfil obtido, a fase *lag* tem fim após 4 h, dando início à aceleração (5-9 h de cultivo) e em seguida a fase exponencial (log), que tem duração de 7 h (10-17 h). A fase de desaceleração tem duração de 13 h (18-31h), iniciando a fase estacionária após 32 horas de cultivo. As fases de interesse do estudo assim como suas respectivas concentrações celulares médias de acordo com o tempo de cultivo utilizado estão apresentadas na Tabela 4.6.

Após a determinação das fases de crescimento, um horário médio foi estipulado para cada uma das fases. Realizou-se cultivos em meio YPD com duração destes tempos médios gerando-se assim células para inóculos representantes das fases de aceleração, exponencial e desaceleração, a fim de cultivá-las em um meio contendo os açúcares presentes no HHBCA (Tabela 4.7).

Tabela 4.6: Fase de crescimento da levedura *R. toruloides* de acordo com o tempo de cultivo em YPD e suas respectivas concentrações médias. Concentração do inóculo: 0,7 UA.

Faixa de tempo (h)	Fase de crescimento	Concentração celular média (g/L)	OD ₆₀₀ média
5 - 9	Aceleração	1,18	2,59
10 - 17	Exponencial	5,80	9,68
18 - 31	Desaceleração	12,58	22,86

Figura 4.2: Perfil de crescimento da levedura *R. toruloides* em meio YPD cultivadas de acordo com o tópico 3.1.1.



Embora o inóculo constituído de células na fase de aceleração tenha apresentado maior produção tanto lipídica quanto de biomassa, seu uso é pouco prático devido à baixa concentração celular inicial (Tabela 4.6), sendo necessário um grande volume de meio para atingir a concentração celular desejada. Já para os inóculos nas fases exponencial e desaceleração, não se observou diferenças significativas para estes valores. Li *et al.* (2006) realizaram estudos com a levedura *R. toruloides* sobre a melhor fase de crescimento e obtiveram resultados que corroboram com o presente trabalho, embora todos os cultivos deles tenham sido realizados em meio YPD, contendo composição distintas do meio utilizado no presente trabalho. No trabalho de Li *et al.* (2006), o inóculo que apresentou maior conteúdo lipídico (73%) foi o de 28 h, representante da fase de desaceleração. As diferenças nos resultados apresentados se dão pelas diferentes necessidades nutritivas que o microrganismo apresenta em cada fase do inóculo, e para supri-las é necessário que o meio contenha os nutrientes adequados para as células (NIELSEN *et al.*, 2015; CABRAL 2003).

A diferença nos resultados também pode ser explicada pelas características morfológicas das células já que, por exemplo, as células da fase exponencial são mais suscetíveis à diversos tipos de estresse, como estresse oxidativo e a limitação de nutrientes. Por sua vez, as células que estão entrando na fase estacionária (desaceleração) são mais resistentes aos inibidores presentes no meio, e por isso apresentam uma menor fase *lag*, diferente das células da fase estacionária que tendem a ser mais suscetíveis aos inibidores, aumentando a fase de adaptação e diminuindo a sua produtividade (CABRAL, *et al.* 2003; WERNER-WASHBURNE *et al.*, 1993), motivo esse de não ter sido considerada para este estudo. Como o

inóculo será utilizado em um meio contendo limitação de nitrogênio, optou-se pela utilização do inóculo de 24,5 h, fase de desaceleração, que apresenta as condições mais robustas a serem exploradas para cultivo em HHBCA.

Tabela 4.7: Produção lipídica ao final de 96 h de cultivo em meio sintético análogo ao HHBCA (OD₆₀₀ inicial igual a 0,7 UA).

Fase do inóculo utilizada	Horário médio do cultivo gerador do inóculo (h)	Concentração de biomassa (g/L)	Concentração de lipídios (g/L)	Conteúdo lipídico (% m/m)
Aceleração	7	12,5	6,00	48,3
Exponencial	13,5	10,2	4,15	40,6
Desaceleração	24,5	12,2	4,96	40,5

4.4. Otimização do meio de cultivo

Os planejamentos de experimentos de cultivo de *R. toruloides* em HHBCA para avaliar os efeitos primários e secundários das variáveis teores de glicerol, de melão de soja, de extrato de levedura e de sais inorgânicos foram realizados em triplicatas. As respostas (variáveis dependentes) avaliadas foram concentrações de biomassa, concentração de lipídios e conteúdo lipídico. Os resultados estão apresentados nos tópicos a seguir.

4.4.1. Planejamento de experimentos para avaliação dos efeitos principais

A ferramenta utilizada na execução do planejamento de experimentos (PB-12) foi proposta por Plackett-Burman (1946) e permitiu a avaliação dos efeitos primários das variáveis estudadas, ou seja, se elas foram ou não importantes para as respostas avaliadas. Essa importância é avaliada pelo *p-valor* ou significância em função do nível de confiança estabelecido para o teste de Student. Neste planejamento de experimentos foi utilizada uma confiança de 95%, ou seja, os *p-valores* menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos para a resposta avaliada. Após a avaliação da significância de cada variável, faz-se necessário avaliar o efeito que cada variável exerce em cada resposta, podendo este ser positivo ou negativo.

A partir da execução do planejamento foi possível observar como as variáveis independentes (glicerol, melão de soja, extrato de levedura e sais inorgânicos) influenciaram

RESULTADOS E DISCUSSÃO

nas respostas estudadas e, a partir da análise estatística dos valores obtidos experimentalmente (Tabela 4.8), foram obtidos os valores dos efeitos e as significâncias para cada variável em função das concentrações de biomassa, de lipídios e do conteúdo lipídico (Tabela 4.9). Além disso, os dados obtidos com o planejamento inicial (PB-12) auxiliaram na montagem do planejamento de experimentos principal (DCCR).

Analisando os *valores-p* da Tabelas 4.9 e considerando que neste planejamento foi aplicada a confiança de 95% no teste de Student relacionando as variáveis independentes com as respostas, pôde-se observar que o melão de soja e o extrato de levedura foram os principais fatores a causar modificações no teor de biomassa, concentração de lipídios e conteúdo lipídico, pois foram significativos para todas as variáveis. Acredita-se que a forte influência positiva do melão de soja no conteúdo lipídico e produção de lipídios seja devido à sua alta concentração de carboidratos, disponíveis para o consumo celular e também por aumentar a razão molar C/N.

Tabela 4.8: Valores médios das triplicatas das variáveis dependentes avaliadas no PB-12 após 120 h de cultivo.

Ensaio	Concentração de biomassa (g/L)	Concentração de lipídios (g/L)	Conteúdo lipídico (% m/m)	Produtividade lipídica [mg/(L.h)]	Razão molar C/N inicial
1	17,69	1,58	8,97	13,17	70,54
2	16,39	3,90	23,82	32,49	92,54
3	20,74	3,44	16,52	28,63	41,85
4	15,38	1,62	10,50	13,49	70,54
5	16,17	4,88	30,69	40,69	92,54
6	18,48	2,35	12,68	19,55	63,18
7	18,77	2,13	11,18	17,76	41,85
8	17,01	1,93	11,36	16,08	70,54
9	13,17	2,80	21,47	23,36	130,20
10	14,92	3,37	22,57	28,07	72,56
11	16,51	4,54	27,43	37,86	92,54
12	14,55	3,97	27,38	33,09	130,20
13 (C)	17,78	2,86	16,14	23,87	65,72

Tabela 4.9: Tabela de efeitos e significância (*valore-p*) para cada variável independente em relação às respostas concentrações de biomassa, de lipídios e conteúdo lipídico utilizando 95% de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resposta	Variáveis	Efeito	Valor-p
Concentração de biomassa	Glicerol	-0,2852	0,602340
	<u>Melaço de soja</u>	<u>2,3859</u>	<u>0,000112</u>
	<u>Extrato de levedura</u>	<u>2,7278</u>	<u>0,000018</u>
	MgSO ₄	-0,9985	0,074673
	FeCl ₃	0,1989	0,716026
	K ₂ SO ₄	-0,8856	0,112034
Concentração de lipídios	Glicerol	-0,1867	0,328823
	<u>Melaço de soja</u>	<u>0,9942</u>	<u>0,000009</u>
	<u>Extrato de levedura</u>	<u>-1,7377</u>	<u>0,000000</u>
	MgSO ₄	-0,3299	0,089409
	FeCl ₃	0,1703	0,372694
	<u>K₂SO₄</u>	<u>-0,4812</u>	<u>0,015576</u>
Conteúdo lipídico	Glicerol	-1,0180	0,381202
	<u>Melaço de soja</u>	<u>3,3462</u>	<u>0,006383</u>
	<u>Extrato de levedura</u>	<u>-13,6885</u>	<u>0,000000</u>
	MgSO ₄	-1,0896	0,349036
	FeCl ₃	1,0012	0,388988
	K ₂ SO ₄	-2,1492	0,069982

Os outros sais estudados (MgSO₄ e FeCl₃) não apresentaram efeitos significativos à 95% de confiança, embora Li *et al.* (2006) tenha relatado que o MgSO₄ exercesse forte influência no conteúdo lipídico. A falta do efeito destes sais nas respostas deste estudo pode ser explicada pela existência dos mesmos íons na solução de micronutrientes adicionada ao cultivo, que já supre a quantidade necessária dos íons para as células (MEESTERS *et al.*, 1996), não sendo necessário o aumento da concentração destes para favorecer alguma via metabólica.

Entretanto, o K₂SO₄ também se apresentou como significativo para a resposta concentração de lipídios, embora cause um efeito negativo. Isso pode ser explicado pela sua ação de cofator da enzima piruvato quinase, que necessita de um íon bivalente e um univalente para atuar sobre o substrato na via da glicólise, utilizando preferencialmente o íon K⁺ (KAYNE e SUELTER, 1965). A enzima atua na síntese de piruvato, transferindo um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para o ADP, gerando piruvato e ATP. Caso a enzima seja inibida, o precursor

fosfoenolpiruvato é utilizado como fosfato de glicerol em uma via metabólica paralela, favorecendo a produção de lipídios. A inibição da enzima piruvato quinase é um dos reguladores na via da glicólise para o conteúdo lipídico, e pode ser feita pelo aumento da concentração de citrato intracelular (PARK *et al.*, 2017; ZHU, Z. *et al.*, 2012;). Como a presença do sal apresentou efeito negativo no conteúdo lipídico, optou-se por utilizar o nível inferior do planejamento (-1) para a concentração do sal (0 g/L), retirando-o do meio de cultivo nas próximas etapas.

O extrato de levedura foi muito significativo em todas as respostas, exercendo efeito positivo na concentração de biomassa, promovendo o crescimento celular, e efeito negativo na produção de lipídios e conteúdo lipídico. Por ter sido utilizado como fonte de nitrogênio, sua adição desvia a rota de produção de lipídios e favorece o crescimento celular. Sabe-se também que a limitação de nitrogênio é fator chave para o conteúdo lipídico, sendo necessário reduzir a concentração deste nutriente nos estudos seguintes.

Embora o glicerol não tenha sido significativo para nenhuma das respostas, a literatura diz o contrário pois ele participa direta e ativamente na biossíntese de lipídios por ser um precursor direto na via metabólica (PARK *et al.*, 2017). Isso pode ter acontecido por ter havido um efeito mascarado, devido à alta influência das outras variáveis. O comportamento observado também pode ser explicado pela alta quantidade de glicerol utilizada no estudo, pois sabe-se que, quando a altas concentrações (acima de 70 g/L) ele pode atuar como inibidor do crescimento microbiano por conter impurezas como sabão, sais, metanol e cinzas (CHIDINMNA, 2010).

Todavia, Uprety *et al.* (2017) cultivaram uma cepa de *R. toruloides* em glicerol bruto na concentração inicial de 40 g/L como única fonte de carbono suplementado apenas com fonte de nitrogênios e outros micronutrientes, obtendo 10,18 g/L de biomassa e 3,54 g/L de lipídios. Os resultados variaram de acordo com a concentração de metanol contida no substrato, em que quanto maior a porcentagem de metanol, maior a inibição da levedura. Os autores relataram que a levedura tolera até 1,5% (m/m) de metanol no meio de cultivo, pois, após essa concentração, o crescimento microbiano e a biossíntese de lipídios são inibidos (UPRETY *et al.*, 2017).

Apesar da alta concentração do glicerol bruto ser tóxica para o microrganismo pela presença de metanol, este é um empecilho relativamente fácil de contornar, visto que o solvente pode ser removido por evaporação ou até mesmo mascarada pela presença de outros substratos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Poontawee *et al.* (2017) cultivaram a levedura *R. fluvialis* em uma mistura de hidrolisado de ponteiro de cana-de-açúcar e glicerol, contendo 59 g/L deste substrato, sem inibição.

Embora exista a possibilidade de cultivar a cepa em quantidades maiores de glicerol, neste trabalho optou-se por reduzir a concentração de glicerol utilizada no estudo seguinte para um possível desmascaramento do efeito das demais variáveis e assim verificar sua influência no conteúdo lipídico. Além disso, ao avaliar a composição do meio e as respostas, pode-se observar que embora o glicerol não cause grandes diferenças nas respostas, estas sempre eram maiores quanto maior a concentração de glicerol.

Outra grande participação do glicerol é no aumento da razão C/N, tido como fator chave para o aumento da produção lipídica. Todavia essa correlação do aumento da razão C/N pode não ser tão verdadeira quanto aparenta, como mostra a correlação de Spearman, (Tabela 4.10) obtida através de análise estatística. Esta análise avalia a intensidade de associação entre duas variáveis, e para isso usa uma escala que varia de 1 a -1 (diretamente ou indiretamente proporcional, respectivamente), o que não significa que ela é linear. Quanto mais próximos dos extremos maior a correlação, e quanto mais próximo do zero menor é essa dependência estatística entre as duas variáveis. Dessa forma, podemos avaliar a intensidade da correlação, juntamente com sua significância, para então averiguar a influência que uma variável tem sobre a outra.

Tabela 4.10: Valores de ρ de Spearman para as variáveis correlacionadas.

Variáveis	Concentração de lipídios	Conteúdo lipídico	Razão C/N inicial
Concentração de biomassa	-0,101	-0,404*	-0,712**
Concentração de lipídios	1	0,927**	0,478**
Conteúdo lipídico		1	0,697**

* A correlação é significativa no nível 0,05. ** A correlação é significativa no nível 0,01.

Através da correlação de Spearman, pode-se verificar que a razão C/N exerce uma influência intensa e negativa na produção de biomassa, sendo que na produção de lipídios e conteúdo lipídico essa influência é mais branda. Desta forma pode-se concluir que não necessariamente o aumento da razão C/N irá aumentar a produção e o conteúdo lipídico, sendo necessário investigar outras formas de aumentar a produção de lipídios, assim como investigar

RESULTADOS E DISCUSSÃO

o porquê a razão C/N, retratada na literatura como fator chave do aumento do conteúdo lipídico, não necessariamente causa esse efeito.

A fim de entender a relação da razão C/N com o aumento da produção lipídica, a Figura 4.3 representa como se dá a interação entre essas variáveis. Para isso também é necessário avaliar a composição do meio de cultivo utilizado em cada caso (Tabela 4.11).

Figura 4.3: Correlação da razão C/N, massa seca e lipídios para os experimentos do PB-12:

▨ razão molar C/N inicial; ▩ concentração de biomassa; ■ concentração de lipídios.

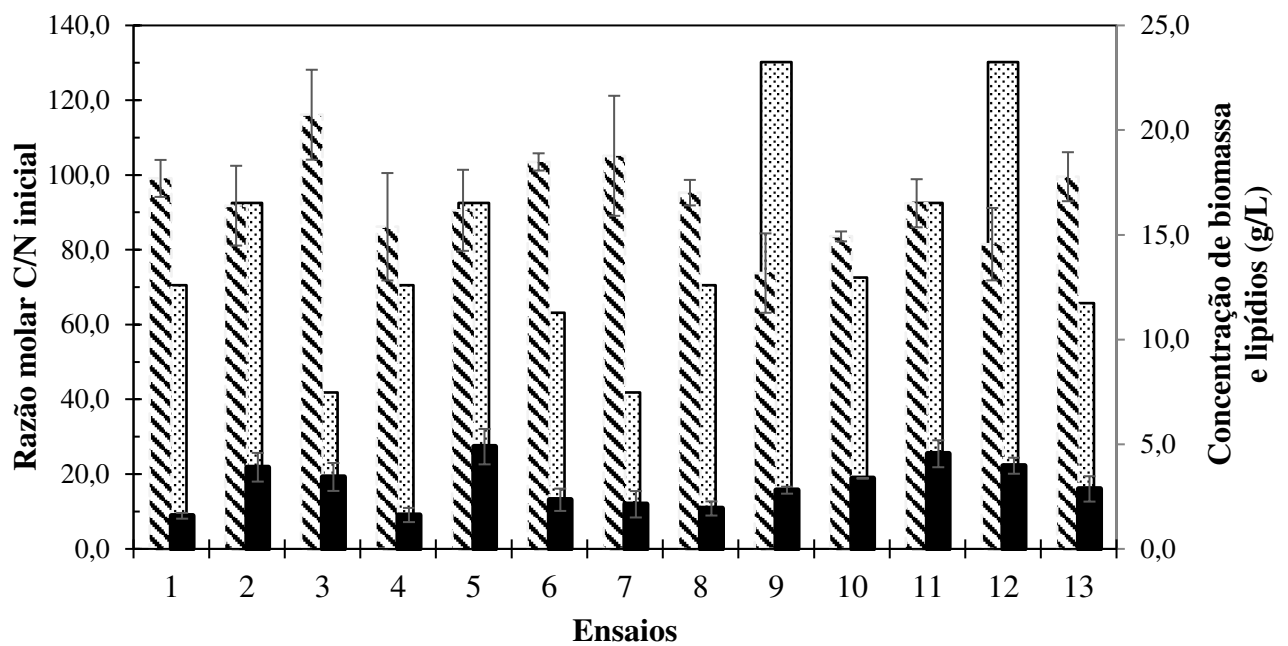


Tabela 4.11: Composição dos meios de cultivo de cada ensaio do PB-12 (dados em g/L).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Glicerol	100	100	50	100	100	100	50	100	100	50	100	100	75
Melaço de soja	10	50	50	10	50	50	50	10	10	10	50	10	30
Extrato de levedura	5	2	5	5	2	5	5	5	2	2	2	2	4

Como já demonstrado pela correlação de Spearman, a baixa razão C/N favorece o crescimento de biomassa, e pode ser comprovado através da composição do meio. Os meios em que se observa a maior quantidade de biomassa são aqueles em que a concentração de extrato de levedura é maior, sendo essa a principal fonte de nitrogênio utilizada, e apresentam a razão C/N mais baixa. Para as condições em que houve a maior produção lipídica, uma menor concentração de extrato de levedura foi observada, variando apenas na concentração de glicerol

e melação de soja, sendo que essas condições não necessariamente apresentavam as maiores razões C/N. A condição 5 apresentou 4,88 g/L de lipídio e razão C/N de 92, enquanto a condição 12 apresentou concentração lipídica de 3,97 g/L e razão C/N de 130. Sabendo que a concentração de K_2SO_4 e extrato de levedura para ambas as condições era a mesma, pode-se concluir que não necessariamente uma maior razão C/N irá promover uma maior produção lipídica. Neste caso, a maior diferença foi a composição do meio, em que a condição 5 possuía 50 g/L de melação de soja, enquanto a condição 12 tinha 10 g/L deste substrato.

Este comportamento pode ser explicado pela preferência da célula por um determinado substrato para realizar sua conversão em óleo microbiano. De acordo com Chidinma (2010) tanto a produção de biomassa quanto a lipídica dependem de um equilíbrio da fonte de carbono e nitrogênio disponíveis em que uma fonte de carbono pode ser preferencialmente utilizada para manutenção celular e outras para a biossíntese lipídica. Acredita-se que o glicerol seja preferencialmente utilizado no metabolismo lipídico por ser um precursor direto dos fosfatos de glicerol, enquanto as outras fontes de carbono são direcionadas à manutenção celular por fazer parte das vias convencionais do metabolismo microbiano.

Dessa forma, a partir dos resultados deste estudo, foram tomadas decisões para os estudos futuros (Tabela 4.12). A concentração de glicerol foi reduzida para 50,0 g/L, sendo o ponto central, devido a sua possibilidade de inibir o crescimento microbiano e não ter sido significativa para as respostas avaliadas. Embora o melação de soja tenha se mostrado significativo, sua concentração não foi aumentada, pois não há dados na literatura que tratem sobre inibição microbiana por este substrato, sendo necessária cautela em seu estudo. A concentração do extrato de levedura foi reduzida, diminuindo o nível superior (+1) para 2,6 g/L, por possivelmente ter mascarado a influência do glicerol e por exercer efeito muito negativo no conteúdo lipídico.

Tabela 4.12: Resumo das decisões tomadas baseados nos resultados obtidos a partir do planejamento experimental e da literatura.

Variáveis	Concentração de biomassa	Concentração de lipídios	Conteúdo lipídico (%)	Decisão
Glicerol	↓	↓	↓	Definir -1 como 0 (50 g/L)
Melaço de soja	↑	↑	↑	Manter o nível superior (50 g/L)
Extrato de levedura	↑	↓	↓↓↓↓	Definir -1 como +1 (2,0 g/L)
MgSO₄	N.S.*	N.S.*	N.S.*	Manter nível inferior (0 g/L)
FeCl₃	N.S.*	N.S.*	N.S.*	Manter nível inferior (0 g/L)
K₂SO₄	N.S.*	↓	N.S.*	Manter nível inferior (0 g/L)

NS*- não significativo. Setas para baixo (↓) indicam diminuição da concentração em relação aos níveis iniciais (Tabela 3.2), devido ao efeito negativo ou a não influência da variável. Setas para cima (↑) indicam o aumento da concentração em relação aos níveis iniciais (Tabela 3.2) devido ao efeito positivo da variável.

4.4.2. Planejamento de experimentos para geração da superfície de resposta

Com o objetivo de determinar os efeitos dos fatores na resposta de interesse e obter um modelo matemático que descrevesse a resposta em função destas variáveis, elaborou-se um novo delineamento composto centrado rotacionado (DCCR). Estes dados só são possíveis de obter através da análise de variância (ANOVA), em que foi necessário fazer um teste de hipótese (teste F) para verificar a significância estatística do modelo utilizando 90% de confiança, ou seja, se ele descreve bem os dados experimentais ou não. A partir da validação da ANOVA, o modelo matemático obtido predisse uma superfície de resposta, que indicou o ponto ótimo do estudo em questão. Os resultados obtidos a partir dos experimentos estão apresentados na Tabela 4.13 como valores médios para cada ensaio.

Para estes resultados, a condição que conteve a maior produção lipídica foi a condição de ponto central (ensaios de 9 a 11) dispendo uma média de 6,0 g/L de concentração de lipídios e 13,14 g/L de biomassa, apresentando razão C/N igual a 65,77. Esta condição apresenta razão molar C/N próxima às outras condições, como a condição 4 que possui razão

RESULTADOS E DISCUSSÃO

C/N igual a 63,77, mas apresenta menor produção lipídica (4,4 g/L), comportamento este que pode ser explicado pela composição do meio.

Tabela 4.13: Valores médios das triplicatas das variáveis dependentes avaliadas para os ensaios do DCCR após 120 h de cultivo.

Ensaio	Concentração de biomassa (g/L)	Concentração de lipídios (g/L)	Conteúdo lipídico (% m/m)	Produtividade lipídica [mg/(L.h)]	Razão C/N inicial
1	11,57	4,88	42,14	40,63	68,47
2	14,77	3,89	26,47	32,38	47,42
3	11,51	5,53	47,85	46,06	92,55
4	13,89	4,39	31,81	36,56	63,67
5	13,28	3,11	23,37	25,89	52,01
6	12,91	4,06	31,14	33,81	79,52
7	11,57	4,13	36,14	34,43	88,62
8	14,70	3,13	21,11	26,09	52,38
9 (C)	13,20	5,81	43,98	48,39	65,77
10 (C)	12,90	6,17	47,81	51,41	65,77
11 (C)	13,30	6,03	45,36	50,29	65,77

A condição de ponto central continha 50 g/L de glicerol, 50 g/L de melão de soja, 30 g/L dos açúcares do HHBCA e 1,5 g/L de extrato de levedura. Já a condição 4 continha 64 g/L de glicerol, 50 g/L de melão de soja, 30g/L dos açúcares do HHBCA e 2,6 g/L de extrato de levedura. Embora houvesse uma maior quantidade de nitrogênio contida na condição 4, a concentração das fontes de carbono também era maior, aproximando o valor da razão C/N da condição de ponto central. Isto sugere a possibilidade da preferência do microrganismo por diferentes fontes de carbono para realizar cada função em seu metabolismo e também ressalta que a limitação da fonte de nitrogênio é fator chave para o conteúdo lipídico. De acordo com a composição do meio (Tabela 4.14) e a relação entre as respostas e a razão C/N (Figura 4.4), pode-se observar que quanto menor a razão C/N, maior foi a produção de biomassa e menor a produção de lipídios. Além disso, observa-se que a fonte de nitrogênio exerce efeito positivo na concentração de biomassa, em que quanto maior a concentração da fonte de nitrogênio, maior o teor de biomassa produzida, comprovando os resultados obtidos no estudo do tópico 4.4.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 4.4: Correlação da razão C/N, massa seca e concentração de lipídios para os experimentos do DCCR: ▨ razão molar C/N inicial; ▩ concentração de biomassa; ■ concentração de lipídios.

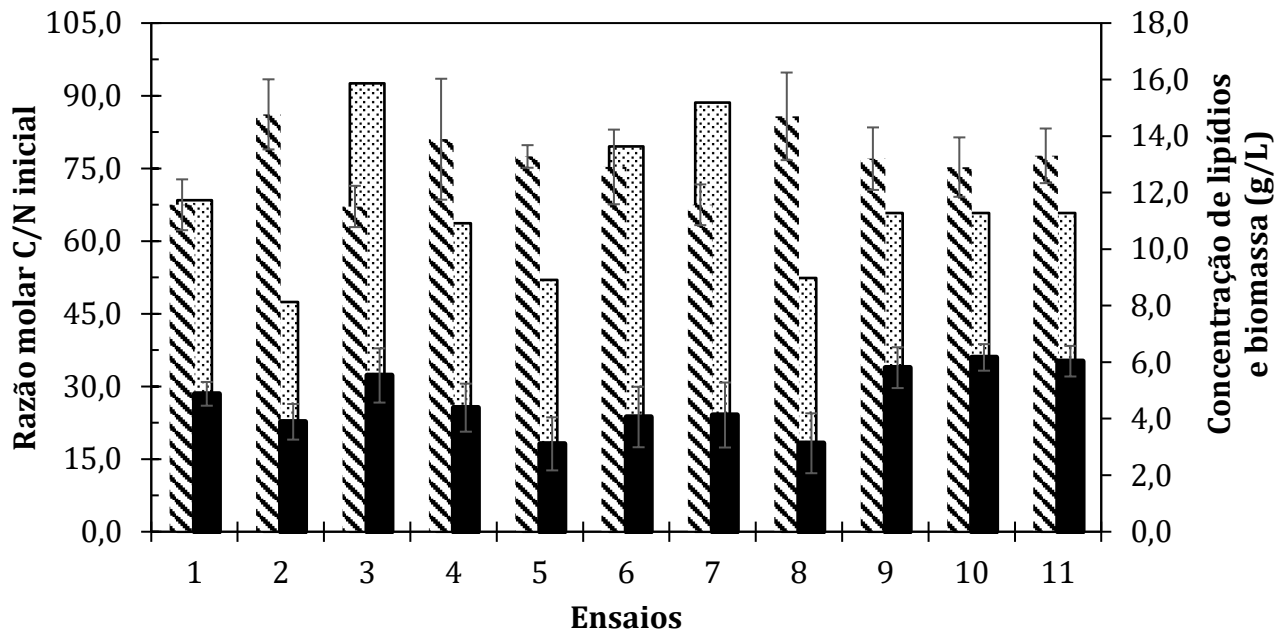


Tabela 4.14: Composição dos meios de cultivo de cada ensaio do DCCR (dados em g/L).

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Glicerol (g/L)	36	36	64	64	30	70	50	50	50	50	50
Melaço de soja (g/L)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Extrato de levedura (g/L)	0,43	2,6	0,43	2,6	1,5	1,5	0	3	1,5	1,5	1,5

Todavia, observam-se condições em que há a limitação de nitrogênio e a produção lipídica não foi alta (ensaio 7). Nesta condição o extrato de levedura não foi adicionado, estando disponível apenas o nitrogênio contido no HHBCA e melaço de soja. A produção de biomassa observada foi menor em relação às outras condições (11,57 g/L) e o mesmo foi observado para a produção de lipídios (4,13 g/L). Dessa forma indica-se o balanço entre a fonte de carbono e a fonte de nitrogênio para promover tanto um crescimento celular quanto a produção lipídica adequada.

O melhor resultado obtido por Poontawee *et al.* (2017) ao cultivar a levedura *R. fluvialis* em hidrolisado de ponteiro de cana-de-açúcar suplementado com glicerol foi em meio de cultivo de razão C/N igual a 60, corroborando com a razão C/N igual a 65,77 encontrada neste trabalho. De acordo com Braunwald *et al.* (2013), a razão C/N exerce sim um efeito positivo no conteúdo lipídico, mas ao elevar a razão C/N de 70 para 120, o aumento na produção lipídica não foi significativo. Matsakas *et al.* (2015) também encontraram como ótima uma razão C/N igual a 60 para cultivo da levedura *R. toruloides* utilizando caule de sorgo sacarificado como fonte de carbono, obtendo aproximadamente 14 g/L de lipídios após 250 h de cultivo.

Após a avaliação dos resultados obtidos com o planejamento experimental, foi realizada a ANOVA (Tabela A8 a A13, Apêndice) destes e os respectivos testes de validação para verificar o ajuste do modelo, os efeitos principais e secundários além de gerar um modelo matemático para determinação do ponto ótimo para produção de lipídios por *R. toruloides*. O teste F para modelo (regressão) é utilizado na verificação do ajuste do modelo obtido aos resultados observados. O teste F para falta de ajuste é realizado a fim de verificar se o erro apresentado pelos resultados experimentais foi significativo o suficiente para impedir a inferência de novas condições. Para os testes de modelo, o valor de F_{calc} deve ser maior que o de F_{tab} , pois assim indica que o modelo é estatisticamente significativo a 95% de confiança. Nos testes de falta de ajuste, a relação que se observa é contrária a observada para o teste de modelo, pois não se deseja que o erro seja significativo, dessa forma o valor de F_{calc} deve ser menor que o de F_{tab} . O resumo dos resultados dos testes de hipótese está apresentado na Tabela 4.15.

Tabela 4.15: Resumo dos testes de variância para cada variável dependente.

Teste F	Variável dependente	F_{calc}	F_{tab}
Modelo	Concentração de biomassa	23,61	2,15
	Concentração de lipídios	38,13	2,01
	Conteúdo lipídico	51,43	2,01
Falta de ajuste	Concentração de biomassa	16,10	7,30
	Concentração de lipídios	11,72	2,83
	Conteúdo lipídico	17,45	2,83

Como pode ser observado, o modelo foi significativo para todas as variáveis analisadas, permitindo a construção das superfícies de resposta, porém a falta de ajuste também foi significativa, o que impede a utilização do modelo matemático para prever diferentes respostas que serão obtidas a partir de concentrações não estudadas através da definição das regiões de interesse. Essa falta de ajuste pode ser aparente e ocorreu porque o erro puro (variação entre replicatas) foi muito baixo, levando à essa interpretação. Sendo assim, assumiu-se a composição de meio da condição do ponto central como ponto ótimo por ter apresentado a maior produção lipídica dentre todas as condições estudadas (Figuras 4.5 e 4.6).

Os modelos matemáticos obtidos a partir das superfícies de respostas parametrizada estão representados abaixo pelas equações 4 e 5:

$$\text{Concentração de lipídios (g/L)} = -7,637 + 0,47x - 0,004x^2 + 1,85y - 0,736y^2 \quad (4)$$

$$\text{Conteúdo lipídico (\%)} = -42,811 + 3,223x - 0,030x^2 + 7,414y - 4,473y^2 \quad (5)$$

em que x e y são as concentrações de glicerol e extrato de levedura (em g/L), respectivamente.

Pode-se verificar observando a equação 2 e 3 que a interação entre as duas variáveis (extrato de levedura e glicerol) não foi significativa para o conteúdo lipídico e nem para a produção de lipídios, pela falta deste coeficiente no modelo matemático, sendo importante apenas a presença ou ausência destes substratos. Entretanto não se descarta a interação destes com outros compostos presentes no meio de cultivo.

4.5. Estudo cinético do cultivo da *R. toruloides* no meio otimizado

Visando verificar a reprodutibilidade dos resultados e o comportamento da cepa ao longo do cultivo na condição estabelecida como ótima – 50 g/L de glicerol bruto; 50 g/L melão de soja; 1,5 g/L extrato de levedura; 30 g/L dos açúcares contidos no HHBCA–, foi realizado o estudo cinético do cultivo da levedura por 120 h. O perfil de produção de biomassa, produção de lipídios e consumo da fonte de carbono está representado na Figura 4.7.

Figura 4.5: Superfície de resposta da variável dependente concentração de lipídios em função da concentração de extrato de levedura e glicerol.

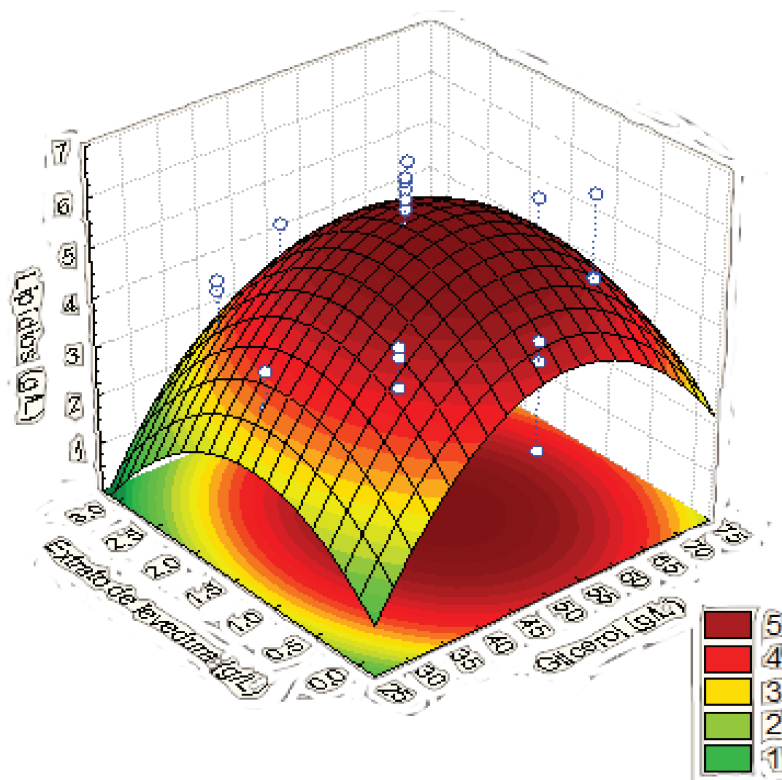


Figura 4.6: Superfície de resposta da variável dependente conteúdo lipídico em função da concentração de extrato de levedura e glicerol.

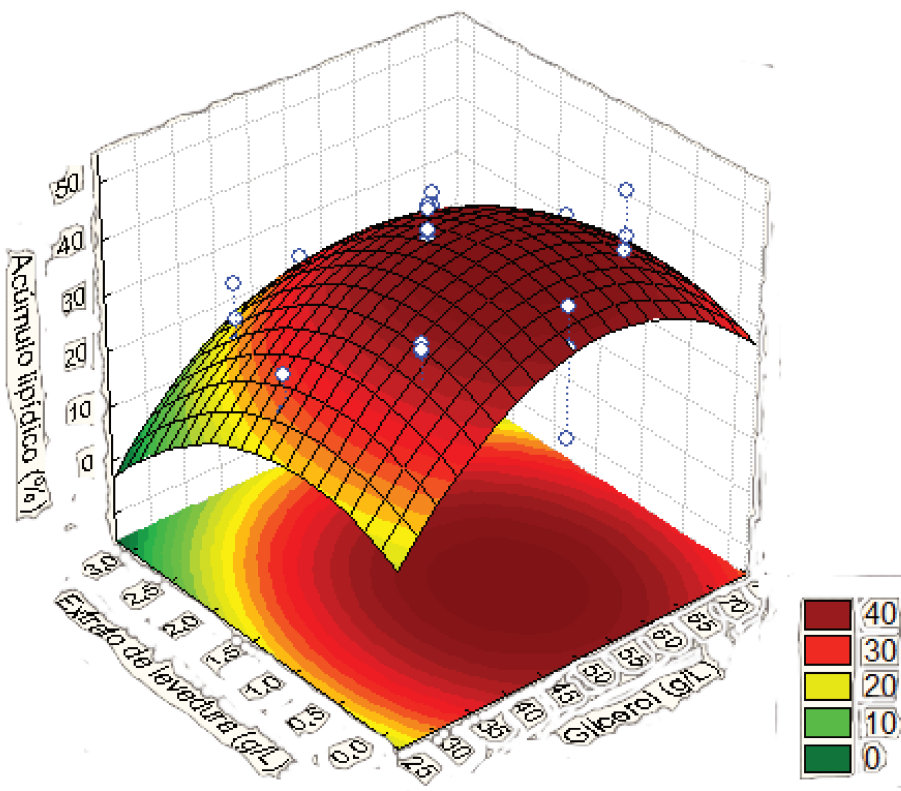
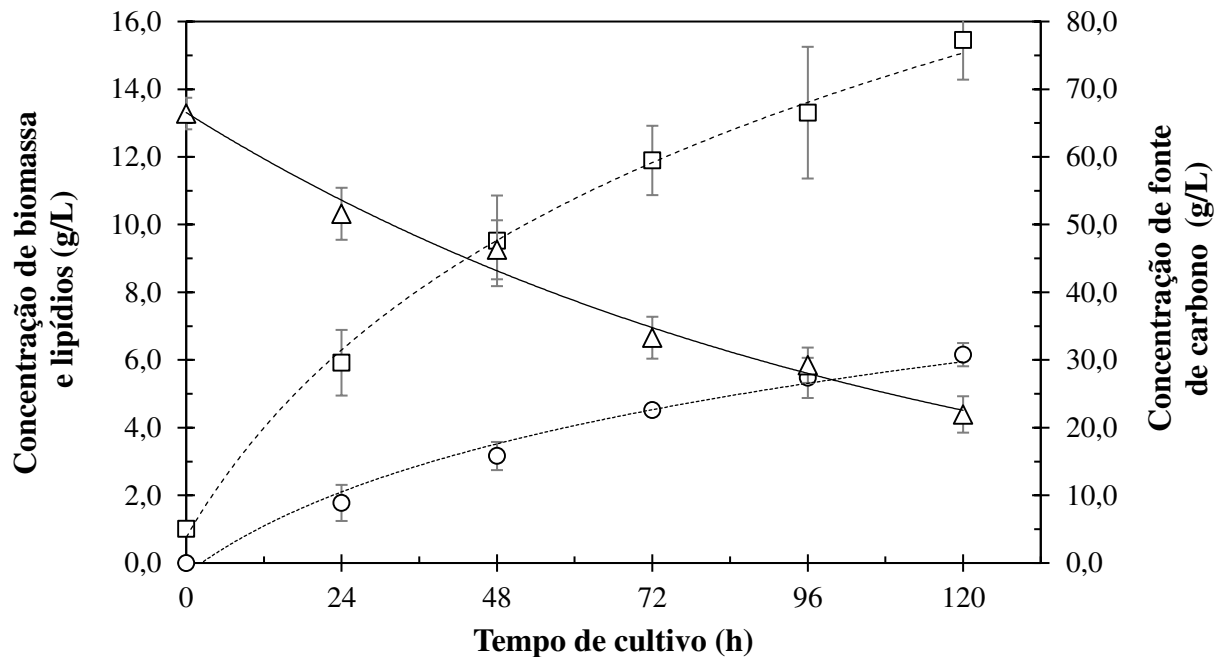


Figura 4.7: Cinéticas de consumo da fonte de carbono, produção de lipídios e crescimento celular da *R. toruloides* quando cultivados na condição ótima por 120 h. Concentrações de: □ biomassa; ○ lipídios; Δ fonte de carbono.



Entretanto as maiores produtividades lipídicas para esta cepa em HHBCA foram relatadas de 96 h a 120 h por Bonturi *et al.* (2017), sendo que o aumento na concentração lipídica observado não foi significativo após esse tempo de cultivo. Além disso, a levedura iniciava o consumo dos lipídios produzidos após o esgotamento dos carboidratos contidos no meio, e por não saber como a cepa se comportaria neste substrato, o cultivo não foi levado adiante. Os valores finais obtidos pela cinética corroboram com os valores obtidos no DCCR, sendo eles 15,45 g/L de biomassa, 6,16 g/L de lipídios, acarretando em um conteúdo lipídico de aproximadamente 40%.

Os resultados encontrados foram superiores aos relatados por Bonturi *et al.* (2017) que cultivaram a cepa em HHBCA (contendo aproximadamente 23 g/L de açúcares) suplementado com 55 g/L de glicerol, e encontraram 8,0 g/L de biomassa e 3,3 g/L de lipídios, acarretando um conteúdo lipídico similar ao encontrado neste estudo. Ao cultivar a cepa em biorreator, o conteúdo lipídico aumentou para 55%, mostrando ainda o potencial que a condição otimizada possui para aumentar ainda mais a produção lipídica.

Ao cultivar a cepa *R. fluvialis* em hidrolisado de ponteiro de cana-de-açúcar suplementado com glicerol por 216 h, Poontawee *et al.*, (2017) encontraram um conteúdo lipídico de 46,7%. O alto conteúdo lipídico se deu, pois, o hidrolisado utilizado continha uma concentração de açúcares maior que a utilizada neste estudo, além do cultivo ter perdurado mais, elevando a quantidade final de lipídios encontrada. Embora as condições fossem diferentes, a quantidade de óleo microbiano produzida foi próxima da observada no presente trabalho, 7,7 g/L comparados aos 6,16 g/L, sendo que a condição que mais se aproxima do desejado pela indústria é a apresentada neste trabalho. No presente estudo utilizou-se um hidrolisado obtido apenas por via ácida, e não enzimática como o caso do trabalho de Poontawee *et al.*, (2017), o que encareceria ou inviabilizaria economicamente o produto por adicionar uma etapa no processo. Além disso, a produtividade lipídica observada neste trabalho é maior que a observada no trabalho de Bonturi *et al.* (2017) quando cultivado em frascos agitados utilizando HHBCA suplementado com glicerol como meio de cultivo, 55 mg/(L.h) frente aos 36 mg/(L.h) (Tabela 4.16).

Ao observar a Figura 4.7, nota-se o rápido aumento da biomassa nas primeiras 24 h devido à grande quantidade da fonte de carbono disponível, além da baixa concentração dos inibidores de crescimento. Acredita-se que parte dos açúcares tenha sido destinada à manutenção celular, pela via da glicólise, aumentando a concentração da biomassa, enquanto o glicerol pode ter sido destinado diretamente à via da biossíntese lipídica (PARK *et al.*, 2017).

Através da análise da dinâmica do consumo de cada fonte de carbono (Figura 4.8) verifica-se um consumo constante e simultâneo de xilose, estaquiase e glicerol ao longo do cultivo, o que não é observado para as demais fontes de carbono (Tabela A14 do apêndice). Este consumo concomitante das fontes de carbono também foi observado por Bonturi (2016) ao cultivar a cepa em HHBCA suplementado com glicerol, embora em concentrações diferentes.

Já o glicerol, dentre todas as fontes de carbono, esboçou a maior taxa de consumo, 0,23 g/(L.h) frente a 0,15 g/(L.h) da xilose e 0,04 g/(L.h) da estaquiase até 72 h de cultivo. A preferência de consumo para a xilose e glicerol pode ser devido à estrutura mais simples destas fontes de carbono, além de o glicerol ser um precursor direto do fosfato de glicerol, participando da via de biossíntese lipídica. Ao adaptar a levedura para o crescimento em HHBCA, Bonturi (2016) também verificou um aumento de 6% no consumo de xilose o que poderia explicar a preferência por este açúcar frente a todos os outros açúcares.

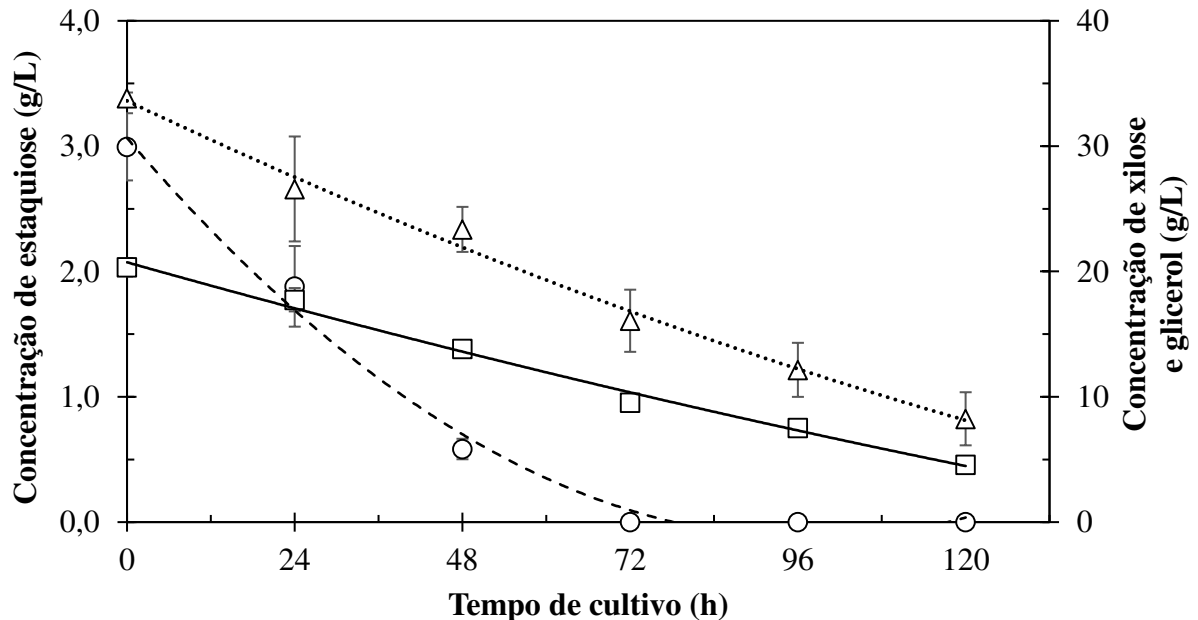
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.16: Comparação dos dados obtidos neste trabalho com os dados relatados na literatura para microrganismos oleaginosos.

Cepa	Meio de cultivo	Modo de cultivo	Concentração de biomassa (g/L)	Concentração de lipídios (g/L)	Conteúdo lipídico (%)	Produtividade lipídica [mg/(L.h)]	Referência
<i>R. toruloides</i> CCT7815	HHBCA+ glicerol, melão de soja e extrato de levedura	Fa	15,3	6,7	44	57	Este trabalho
	HHBCA + glicerol	Br	6,6	3,9	55	55	Bonturi <i>et al.</i> (2017)
		Fa	8,0	3,3	42	36	
<i>R. toruloides</i>	Glicose e sais	Fa	18,3	13,9	76	115	Li <i>et al.</i> (2006)
	Hidrolisado de palha de milho (tratamento enzimático) concentrado	Br	36,2	21,0	59	280	Fei <i>et al.</i> 2016
<i>R. toruloides</i> CCTA29	Glicose e sais	Br	23,4	12,5	53	260	Saran <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i> DMKU-SP314	HHBCA (tratamento enzimático) concentrado + glicerol + sais	Br	24,3	18,2	75	76	Poontawee <i>et al.</i> (2017)
		Fa	20,9	13,9	67	57	

Fa= frascos agitados; Br= biorreator.

Figura 4.8: Cinéticas de consumo da fonte de carbono por *R. toruloides* quando cultivados na condição ótima por 120 h. Concentrações de: Δ glicerol, \square xilose, \circ estaquiose.



Ainda sobre o consumo de xilose e glicerol, neste trabalho foi observado o consumo de 22% e 24% de xilose e glicerol, enquanto no trabalho de Bonturi (2016) a cepa consumiu 87% e 36%, respectivamente. A diminuição no consumo global de xilose e glicerol especificamente pode ser explicada devido à oferta de outras fontes de carbono no meio de cultivo. Saxena *et al.* (1998) estudou a preferência de consumo de açúcares da levedura *Rhodotorula minuta* comparando a taxa de crescimento específica da cepa em cada meio distinto. Os resultados obtidos indicam que a levedura demonstrava maior preferência pela glicose ($0,34 \text{ h}^{-1}$) seguido de frutose ($0,30 \text{ h}^{-1}$), sacarose ($0,22 \text{ h}^{-1}$) e galactose ($0,15 \text{ h}^{-1}$), sendo que não foi observado crescimento da cepa em lactose. Segundo Sitepu *et al.* (2014), a cepa *R. toruloides* é capaz de crescer em meio de cultivo contendo xilose, glicose, galactose, arabinose, sacarose e glicerol, tendo observado que o crescimento nos últimos três compostos é mais lento.

O aumento na concentração de rafinose ao longo do cultivo pode ser explicado pela diminuição da concentração da estaquiose. Como retratado por Góes e Ribeiro (2002) a enzima α -galactosidase é responsável pela hidrólise da ligação alfa terminal da galactose, degradando a estaquiose em uma molécula de rafinose e uma de galactose. Ainda sob a ação da enzima, a rafinose é novamente hidrolisada, gerando uma molécula de galactose e uma de sacarose. Dessa forma, acredita-se que o comportamento observado da diminuição na concentração de

estaquiose e oscilação na concentração de rafinose ao longo do cultivo seja em função da ação da enzima α -galactosidase pois, de acordo com Navarrete e Tovar-Ramírez (2014), é possível que a levedura *R. toruloides* possua tal enzima devido a relatos da presença desta em espécies da mesma família e filogeneticamente próximas à *R. toruloides*.

Após 72 h de cultivo, pode-se considerar que as concentrações de glicose, sacarose se estabilizam (Tabela A13 do apêndice), pois não possuem diferenças estatisticamente significativas em seus valores de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$. Mas, por ainda haver uma pequena oscilação, pode-se supor que ocorra o consumo destas ou que elas estejam sendo geradas a partir da hidrólise total da rafinose (produzindo uma molécula de galactose e uma de sacarose), e ainda que parte da sacarose é hidrolisada em glicose e frutose; porém este comportamento não pode ser descrito corretamente devido à limitação da metodologia utilizada em avaliar a presença de galactose e frutose.

A presença dos inibidores HMF e furfural não foi um fator que alterou o cultivo, visto que suas concentrações eram baixas a ponto de não serem identificados. A concentração de fenóis no meio utilizado era de aproximadamente 3,0 g/L, valor acima do quantificado por Bonturi *et al.* em cultivos com a mesma cepa e acima dos valores determinados como tóxicos (1,52 g/L) por Huang *et al.* (2009) para a *R. toruloides*. O teor da concentração de fenóis observado neste cultivo foi menor que o encontrado no cultivo em H_{NaOH} realizado no tópico 4.2. Todavia, há estudos do LEBp (não publicados) em que se cultivou a cepa a concentração três vezes maior de fenol e ainda assim o crescimento foi possível. Desta forma, confirma-se que a cepa adaptada, utilizada neste trabalho é mais resistente do que a cepa parental aos inibidores do HHBCA, não sendo este um fator determinante para a inibição do crescimento da cepa. A presença de ácido acético no meio de cultivo não foi quantificada, todavia acredita-se que ele não tenha causado nenhum tipo de inibição no cultivo, ou até mesmo tenha sido utilizado como fonte de carbono (HUANG *et al.*, 2012) devido ao aumento do pH no cultivo (pH_{final} 7,0) e por tal comportamento ter sido previamente discutido no tópico 4.2.

4.6. Determinação da melhor concentração celular inicial do inóculo para cultivos

Após a determinação da condição ótima de cultivo, fez-se necessária a otimização das condições do inóculo, concentração celular inicial no cultivo e fase de crescimento. Visando verificar a melhor concentração inicial de células para o cultivo, foi realizado o estudo deste parâmetro para a levedura *R. toruloides*, sendo esta cultivada por 120 h no meio otimizado, em diferentes concentrações celulares que lhes conferiam diferentes OD_{600} , sendo estas 1, 2 e 4. O estudo teve como objetivo verificar a concentração celular inicial que traria a maior produção

RESULTADOS E DISCUSSÃO

lipídica pois, uma concentração celular inicial muito baixa poderia fazer com que as células sofressem inibição de crescimento pela alta concentração de substrato e pela presença de inibidores, já uma concentração celular inicial muito alta poderia esgotar os nutrientes do meio rapidamente sem promover o conteúdo lipídico. Os resultados de produção de biomassa, produção de lipídios e produção específica de lipídios estão representados na Tabela 4.17.

Nota-se que a condição de OD₆₀₀ igual a 4 promoveu um aumento no teor de biomassa de apenas 8 vezes, e a de OD₆₀₀ igual a 2 um aumento de 15,3 vezes, duas vezes menor que o aumento observado na condição OD₆₀₀ igual a 1, cujo aumento foi de 32 vezes na concentração inicial. O aumento da biomassa está relacionado à disponibilidade de nutrientes e, uma vez que se tem mais células inicialmente, os nutrientes se esgotam mais rapidamente, além do que as células podem não conseguir acumular uma quantidade de lipídios desejável, enquanto uma baixa concentração inicial poderia promover um rápido crescimento celular (LIU *et al.*, 2012).

Tabela 4.17: Valores das concentrações finais e produção específica de lipídios ($Y_{p/x}$) após 120 h de cultivo da levedura *R. toruloides* na condição ótima em diferentes OD iniciais.

Condição	Biomassa inicial (g/L)	Biomassa final (g/L)	Concentração de lipídios (g/L)	Produtividade lipídica [mg/(L.h)]	$Y_{p/x}$
OD ₆₀₀ 1	0,48	15,35	6,76	56,3	0,44
OD ₆₀₀ 2	1,01	15,45	6,16	51,3	0,39
OD ₆₀₀ 4	2,07	18,01	6,21	51,7	0,34

Ao cultivar a levedura *Candida sp.* em YMP suplementado com xilose, Cao *et al.* (1994) observaram que quanto maior a proporção (v/v) de células inicial, maior a produção de xilitol a partir do substrato, assim como a produção de biomassa. Este comportamento foi observado também por Yamauchi *et al.* (1983) ao utilizar 50% do volume de meio como inóculo. Ele obteve 153 g/L de biomassa e 83 g/L de lipídios (54% de conteúdo lipídico) ao final de 140 h de cultivo da levedura *Lipomyces starkeyi* em biorreator, embora a cepa *L. starkeyi* GIM2.142 tenha apresentado comportamento diferente. Liu *et al.* (2012) relatou que 10% (v/v) de volume inicial de células garantia maior conteúdo lipídico, enquanto 20% (v/v) inicial de células assegurava maior produção lipídica, mesmo resultado encontrado por

Poontawee *et al.* (2017) para a levedura *R. fluvialis*. Ao contrário do constatado pelos autores, no presente trabalho o aumento da concentração celular inicial não foi benéfico na produção de lipídios.

As quantidades de células contidas nas concentrações celulares determinadas nas medidas por espectroscopia (OD₆₀₀) testadas neste trabalho foram baseadas nas contagens celulares retratadas na literatura por diversos autores em diferentes trabalhos realizados com a cepa *R. toruloides* cultivadas em meio sintético ou complexo. No entanto, os trabalhos utilizados para comparação do comportamento frente à alteração da concentração celular inicial apresentam seus resultados em função da proporção volumétrica da quantidade de inóculo, e não da contagem de células ou concentração celular propriamente ditas, o que dificulta a comparação dos dados. Ademais, nenhum dos cultivos foi realizado com a cepa *R. toruloides* em meio complexo, o que poderia modificar o comportamento da levedura, assim como a falta de ajuste de alguns parâmetros como o tipo de biorreator utilizado, modo de operação e aeração. Desta forma, admitiu-se OD₆₀₀ 1 como concentração celular ótima para o cultivo da cepa no meio otimizado por ter apresentado maior produtividade lipídica e conteúdo lipídico além do maior aumento da biomassa frente às outras condições.

Após a otimização do meio de cultivo e das características da levedura para o cultivo neste meio otimizado, podem-se realizar comparações do cultivo da *R. toruloides* em diferentes meios de cultivo para averiguação da melhora na produção de lipídios (Tabela 4.18).

Ao observar o cultivo da cepa *R. toruloides* CCT7815 em diferentes fontes de carbono complexas, é possível verificar que a maior produção lipídica se dá na condição otimizada. Embora o meio otimizado contenha as mesmas fontes de carbono utilizadas nos cultivos retratados acima, quando de cultivos utilizando apenas uma fonte de carbono, elas não proveem todos os nutrientes necessários para o crescimento e conteúdo lipídico da levedura. Ao fazer um balanço de cada uma dessas para a composição de um meio complexo, é possível balancear especificamente os nutrientes que cada uma possui para fornecê-los em quantidades adequadas ao microrganismo.

Tabela 4.18: Dados de produção da levedura *R. toruloides* por 120 h em diferentes meios de cultivo e concentração celular inicial OD₆₀₀ igual a 2.

Condição	Concentração de biomassa (g/L)	Concentração de lipídios (g/L)	Conteúdo Lipídico (% m/m)	Produtividade lipídica [mg/(L.h)]	Referência
HHBCA (40 g/L)	5,19	1,38	26,56	11,5	Este trabalho
Melaço (40 g/L)	5,11	0,48	9,46	4,0	Este trabalho
Glicerol (70 g/L)	15,03	4,02	26,76	33,5	Azambuja <i>et al.</i> , 2018
Glicerol (10 g/L)	5,72	1,59	27,90	13,25	Azambuja <i>et al.</i> , 2018
*Meio sintético	12,21	4,96	40,62	41,3	Este trabalho
Meio otimizado	15,45	6,16	39,80	51,3	Este trabalho
**Condição otimizada	15,35	6,76	44,00	56,3	Este trabalho

*Composição descrita no tópico 3.6.;

**Meio otimizado e concentração celular inicial OD₆₀₀ igual a 1.

O aumento na produção de lipídios observado para a condição otimizada em relação ao cultivo é HHBCA é de quase cinco vezes, isso porque apenas o hidrolisado como fonte de carbono não possui razão C/N adequada, além da baixa concentração de açúcares. Já em relação ao melaço de soja, o aumento observado em relação à condição otimizada é de 14 vezes, devido à presença de açúcares que a cepa não é capaz de consumir, falta de fonte de nitrogênio para promover o crescimento celular e razão C/N baixa, embora ainda maior que a do HHBCA. Ao realizar a suplementação de HHBCA com glicerol, Poontawee *et al.* (2017) obtiveram um aumento de apenas 3,3 vezes na produção de lipídios, inferior à observada neste trabalho. Ademais, todos os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer e a literatura retrata um aumento ainda maior (aproximadamente 2 vezes) quando a condição é cultivada em biorreator (Tabela 4.16) (BONTURI *et al.*, 2017; POONTAWEE *et al.*, 2017).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1. Conclusões

- (1) A melhor alternativa para ajuste do pH do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar é a adição de CaO, pois este provoca a precipitação de inibidores do crescimento microbiano e não provoca a perda de açúcares contidos no hidrolisado, mesmo sendo responsável por uma perda de 4% no volume de hidrolisado.
- (2) Células da fase de desaceleração (24,5 h) são o melhor inóculo para cultivo de *R. toruloides* em HHBCA por serem mais resistentes aos inibidores presentes no meio, e por isso apresentam uma menor fase *lag*, demonstrando condições mais robustas a ser exploradas para cultivo em HHBCA.
- (3) A razão C/N por si só não foi responsável pelos aumentos da produção lipídica e do conteúdo lipídico. Estes parâmetros estão relacionados, porém a composição do meio de cultivo exerce maior influência nestas variáveis, sendo necessário ter um balanço na concentração de nutrientes (fonte de carbono e fonte de nitrogênio) empregados para promover o crescimento e conteúdo lipídico nos teores desejados.
- (4) A suplementação do HHBCA com melação de soja, glicerol e extrato de levedura levou a um aumento de 4,4 vezes na produção de lipídios pela cepa *R. toruloides* em comparação ao seu cultivo em HHBCA não suplementado, aumento esse causado não somente pelo aumento da razão molar C/N, mas possivelmente também pela presença de vitaminas e nutrientes direcionados às vias metabólicas de interesse. Além disso, o meio otimizado promoveu a produção de quantidades de lipídios (6,16 g/L) superiores às obtidas em meio sintético (4,96 g/L) que mimetiza o HHBCA sem a presença de inibidores e com maior concentração de açúcares do que o HHBCA. A possibilidade de se utilizar o meio otimizado é relevante por empregar coprodutos de biorrefinaria

de baixo custo, integrando-se tanto na biorrefinaria da cana-de-açúcar quanto nas do biodiesel e soja.

(5) A cepa adaptada de *R. toruloides* apresentou preferência pelo consumo de xilose e glicerol no meio de cultivo otimizado frente aos diversos açúcares disponíveis possivelmente porque a cepa foi adaptada ao consumo de xilose e pelo glicerol ser um precursor direto na via metabólica da biossíntese lipídica.

(6) A concentração celular inicial, embora não tivesse causado grandes aumentos na produtividade lipídica, indicou maiores produtividades específicas a menores concentrações iniciais, tornando mais prático seu uso na indústria.

5.2. Sugestões de trabalhos futuros

(1) Estudos cinéticos do meio otimizado e da condição celular otimizada em biorreatores, onde a estabilidade e eficiência no tocante a transferência de massa e de calor permitirão se avaliar a adequação da levedura *R. toruloides* como produtora de OM.

(2) Verificar como se dá a dinâmica do consumo de diversas fontes de açúcar e suas respectivas vias metabólicas, para possibilitar a utilização de novas fontes de carbono. Uma sugestão seria o cultivo da cepa em soro de leite, pois como a *R. toruloides* apresentou a atividade da enzima α -galactosidase por consumir a estaquiase, acredita-se ser muito possível que a levedura também possua a enzima β -galactosidase, responsável por hidrolisar a lactose. Por não haver relatos do cultivo desta levedura em tal substrato, abundante no mundo por ser um coproduto da indústria de laticínios, a investigação se faria inédita.

(3) Uma forma de substituir o uso do extrato de levedura no processo seria realizar o reciclo dos *debris* celulares da própria *R. toruloides*, resultante da extração do óleo microbiano, como fonte de nitrogênio, estratégia já retratada na literatura embora utilizada em meio sintético. A possibilidade reduziria em grande parte o custo do meio de cultivo, por utilizar a massa seca residual obtida após a extração dos lipídios intracelulares.

CAPÍTULO 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE. Dezembro 2018. Estatísticas. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=>>

AGUIAR, R. T. Caracterização física, química e microbiológica do diesel, biodiesel e suas misturas durante a logística de distribuição. João Pessoa. Centro de ciências exatas e da natureza, Universidade Federal da Paraíba, 76 p. Dissertação (Mestrado), 2013.

ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. E.; da SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology A. Enzyme Engineering and Biotechnology*, v. 70–72, p. 89–98, 1998.

ANITHA, M.; KAMARUDIN, S. K.; KOFLI, N. T. The potencial of glycerol as a value-added commodity. *Chemical engineering journal*, v. 295, p. 119-130, 2016.

ANP. Dezembro de 2018. Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biocombustiveis/biodiesel-2018>>

ANTUNES, F.A.F.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; SANTOS, J.C.; ROSA, C.A.; da SILVA, S.S. Bioethanol production from sugarcane bagasse by a novel Brazilian pentose fermenting yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Evaluation of fermentation medium. *Hindawi Publishing Corporation, International Journal of Chemical Engineering*, v. 2014, Article ID 180681, 8 pages, 2014.

AZAMBUJA S.P.H.; BONTURI, N.; MIRANDA, E.A.; GOMBERT, A.K. Physiology and lipid accumulation capacity of different *Yarrowia lipolitica* and *Rhodospiridium toruloides* strains on glycerol. *bioRxiv*, p. 1-18, 2018.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZAMBUJA, S. P. H. Fisiologia e capacidade de conteúdo de lipídios de diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodospiridium toruloides* em meio contendo glicerol. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 174 p. Tese (Doutorado), 2016.
- BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinaria. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, v. 25, p. 5-38, mar. 2007.
- BEN. Balanço energético nacional ano base 2017. *Ministério de Minas e Energia*. 2018
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J-L.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J-M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 48, p. 375-387, 2009.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J-M.; GAILLARDIN, C. An overview on lipid metabolism in yeasts and its impact in biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, p. 1193-1206, 2011.
- BOMMAREDDY, R.R., SABRA, W., MAHESHWARI, G., ZENG, A.P. Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microbial cell factories*, v. 14(1), p. 36, 2015.
- BONTURI, N. Produção de óleo microbiano por cepas adaptadas de leveduras oleaginosas a partir de materiais hemicelulósicos visando a sua aplicação em biorrefinarias. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 184 p. Tese (Doutorado), 2016.
- BONTURI, N., CRUCELLO, A., VIANA, A. J. C., MIRANDA, E. A. Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. *Process Biochemistry*, v. 57, p. 16-25, 2017.
- BOULTON, C., RATLEDGE, C. *Cryptococcus terricolus*, an oleaginous yeast re-appraised. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 20(1), p. 72-76, 1984.
- BRASIL. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução nº. 14, de 11 de Maio de 2012. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 Maio 2012.

BRAUNWALD, T., SCHWEMMLEIN, L., GRAEFF-HÖNNINGER, S., FRENCH, W.T., HERNANDEZ, R., HOLMES, W. E., CLAUPEIN, W. Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, p. 6581–6588, 2013.

CABRAL, M. G.; VIEGAS, C. A., TEIXEIRA, M. C., SÁ-CORREIA, I. Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae*: role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population. *Chemosphere*, v. 51, p. 47–54, 2003.

CANILHA, L., CHANDEL, A. K., MILESSI, T. S. S., ANTUNES, F. A. F., FREITAS, W. L. C., FELIPE, M. G. A, DA SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 15p., 2012.

CAO, N. J., TANG, R., GONG, C. S., CHEN, L. F. The effect of cell density on the production of xylitol from D-Xylose by yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45(46), p. 515-519, 1994.

CARON, F., GOLD, H. S., WENNERSTEN, C. B., FARRIS, M. G., MOELLERING JR., R. C., ELIOPOULOS, G. M. Influence of erythromycin resistance, inoculum growth phase, and incubation time on assessment of the bactericidal activity of RP 59500 (Quinupristin-Dalfopristin) against Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41(12), p. 2749–2753, 1997.

CHANDEL, A., DA SILVA, S., SINGH, O. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology. *BioEnergy Research*, v. 6(1), p. 388-401, 2013.

CHAUD, L. C. S. Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na detoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol. Lorena: Universidade Estadual de São Paulo, 97 p. Dissertação (Mestrado), 2010.

CHEN, H., CHEN, S. L., J. G., JIANG. Effect of Ca²⁺ Channel Block on Glycerol Metabolism in *Dunaliella salina* under Hypoosmotic and Hyperosmotic Stresses. *PLoS ONE*, v. 6(12), e28613, 2011.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, v. 51(7), p. 1412-1421, 2010.

CHIDINMA, A. Growth kinetics and lipid accumulation in *Rhodospiridium toruloides*. Manchester. Faculty of Engineering and Physical Sciences, School of Chemical Engineering and Analytical Science, University of Manchester, 61 p. Dissertação (Mestrado), 2010.

CORADINI, A., ANSCHAU, A., VIDOTTI, A., REIS, E., DA CUNHA ABREU XAVIER, M., COELHO, R., FRANCO, T. Microorganism for Bioconversion of Sugar Hydrolysates into Lipids. *Microorganisms in Biorefineries*, (Ed.) B. Kamm, Vol. 26, Springer Berlin Heidelberg, p. 51-78, 2015.

DIAS, C., SOUSA, S., CALDEIRA, J., REIS, A., DA SILVA, T.L. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology*, v. 189, p. 309–318, 2015.

EKPENI, L. E. N., NKEM-EKPENI, F. F., BENYOUNIS, K. Y., ABODERHEEBA, A. K. M., STOKES, J., OLABI, A. G. Yeast: A potential biomass substrate for the production of cleaner energy (biogas). *Energy Procedia*, v. 61, p. 1718 – 1731, 2014.

EMBRAPA SOJA. Maio 2018. Soja em números (safra 2017/2018). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>

FEI, Q., O'BRIEN, M., NELSON, R., CHEN, X., LOWELL, A, DOWE, N. Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. *Biotechnology for Biofuels*, v. 9, p. 130, 2016.

FERNANDES, G. R., MIGUEL, D. P. Detecção dos açúcares da soja. *Cadernos de Pós-Graduação da FAZU*. v. 2, p. 1-15, 2012.

FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226(1), p. 497-509, 1957.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 334-361, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GENERAL ELECTRIC. Maio 2015. Three reasons why renewable energy is so important to the power industry. Disponível em: <<https://www.gepowerconversion.com/inspire/three-reasons-why-renewable-energy-so-important-power-industry>>.

GÓES, S.P.; RIBEIRO, M. L.L. α -Galactosidase: Aspectos gerais e sua aplicação em produtos à base de soja. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 23, p. 111-119, 2002

HAJJARI, M., TABATABAEI, M., AGHBASHLO, M., GHANAVATI, H. A review on the prospects of sustainable biodiesel production: A global scenario with an emphasis on waste-oil biodiesel utilization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 72, p. 445–464, 2017.

HODGE, D. B., ANDERSSON, C., BERGLUND, K. A., ROVA, U. Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolyzates to succinic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 44(5), p. 309-316, 2009.

HOLDSWORTH, J., RATLEDGE, C. Lipid Turnover in Oleaginous Yeasts. *Journal of General Microbiology*, p. 339-346, 1988.

HU, C., ZHAO, X., ZHAO, J., WU, S., ZHAO, Z. K. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, v. 100(20), p. 4843-4847, 2009.

HUANG, C., WU, H., LIU, Z., CAI, J., LOU, W., ZONG, M. Effect of organic acids on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5(4), p. 4, 2012.

HUANG, X., WANG, Y., LIU, W., BAO, J. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*, v. 102(20), p. 9705-9709, 2011.

IEA. Março 2007. IEA bioenergy Task 42 on biorefineries: co-production of fuels, chemicals, power and materials from biomass. In: Minutes of the third Task meeting, Copenhagen, Dinamarca. Disponível em: <<http://www.biorefinery.nl/ieabioenergy-task42/>>

IEA. Março 2018. IEA Market report series, Oil 2018. Disponível em: <<https://www.iea.org/oil2018/>>

JIN, M., SLININGER, P. J., DIEN, B. S., WAGHMODE, S., MOSER, B. R., ORJUELA, A., SOUZA, L.C., BALAN, V. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends in Biotechnology*, v. 33(1), p. 43-54, 2015.

KAWA., L. Junho 2015. Resíduos da produção de cana-de-açúcar. Disponível em: <<https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/sucroenergetico/156845-residuos-da-producao-de-cana-de-acucar.html#.XCEvJ1xKjIU>>.

KAYNE, F. J., SUELTER, C. H. Effects of temperature, substrate, and activating cations on the conformations of pyruvate kinase in aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society*, v. 87 (4), p. 897-900, 1965.

KOUTINAS, A. A., CHATZIFRAGKOU, A., KOPSAHELIS, N., PAPANIKOLAOU, S., KOOKOS, I. K. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, v. 116, p. 566-577, 2014.

LEMAN, J. Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential. *Advances in Applied Microbiology*, v. 43, p. 195-244, 1997.

LESTER, R. L., B. R. WITHERS, M. A. SCHULTZ e R. C. DICKSON. Iron, glucose and intrinsic factors alter sphingolipid composition as yeast cells enter stationary phase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1831(4), p. 726-736, 2013.

LI, Y., ZHAO, Z., BAI, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41(3), p. 312-317, 2007.

LI, Y. H., LIU, B., ZHAO, Z. B., BAI, F. W. Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by *Rhodosporidium toruloides*. *Chinese Journal of Biotechnology*, v. 22(4), p. 650-656, 2006.

LING, J., NIP, S., SHIM, H. Enhancement of lipid productivity of *Rhodosporidium toruloides* in distillery wastewater by increasing cell density. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 301–309, 2013.

LIU, J., YUE, Q., GAO, B., MA, Z., ZHANG, P. Microbial treatment of the monosodium glutamate wastewater by *Lipomyces starkeyi* to produce microbial lipid, *Bioresource Technology*, v. 106, p. 69–73, 2012.

- MAJI, I. K. Does clean energy contribute to economic growth? Evidence from Nigeria. *Energy Reports*, v. 1, p. 145–150, 2015.
- MANDAL, P. K.; MANDAL T.K. Anion water in gypsum ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and hemihydrate ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$). *Cement and Concrete Research*, v. 32(2), p. 313-316, 2002.
- MAPA. Novembro de 2018. Agroenergia, Setor sucroalcooleiro. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/producao>>
- MATSAKAS, L., BONTURI, N., MIRANDA, E.A., ROVA, U., CHRISTAKOPOULOS, P. High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, p. 6, 2015.
- MEESTERS, P. A. E. P., HUIJBERTS, G. N. M., EGGINK, G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45(5), p. 575-579, 1996.
- NAVARRETE, P. TOVAR-RAMÍREZ, D. Sustainable aquaculture techniques. 1 ed. Editora Intech, Cap. 5: Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture, p. 135-172, 2014.
- NIELSEN, F., TOMÁS-PEJO, E., OLSSON, L., WALLBERG, O. Short-term adaptation during propagation improves the performance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and co-fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, p. 219, 2015.
- PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74(1), p. 17-24, 2000.
- PAPANIKOLAOU, S., AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113(8), p. 1052-1073, 2011.
- PAPANIKOLAOU, S., FAKAS, S., FICK, M., CHEVALOT, I., GALIATOU-PANAYATOU, M., KOMAITIS, M., MARC, I., AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 60-71, 2008.

PARK, Y-K., NICAUD, J.-M. LEDESMA-AMARO, R. The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhouse for biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, v. 36 (3), p. 304-317, 2017.

PATEL, A.; ARORA, N.; SARTAJ, K.; PRUTHI, V.; PRUTHI, P. A. Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 62, p. 836-855, 2016.

PEREIRA JR, N.; BON, E.P.S., FERRARA, M.A. Tecnologia de bioprocessos. Rio de Janeiro, escola de química UFRJ, Séries em Biotecnologia - *Tecnologia de Bioprocessos*, 62 p, 2008.

PLACKETT, R. L. E BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, v. 33, p. 305-325, 1946.

POONTAWEE, R., YONGMANITCHAI, W., LIMTONG, S. Lipid production from a mixture of sugarcane top hydrolysate and biodiesel-derived crude glycerol by the oleaginous red yeast, *Rhodospiridiobolus fluvialis*. *Process Biochemistry*, v. 66, p 150-161, 2017.

PULSCHEN, A. A., RODRIGUES, F., DUARTE, R. T. D., ARAUJO, G. G., SANTIAGO, I. F., PAULINO-LIMA, I. G., ROSA, C. A., KATO, M. J., PELLIZARI, V. H., GALANTE, D. UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. *Microbiology Open*, v. 4(4), p. 574-588, 2015.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnologica*, v. 11(5), p. 429-438, 1991.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 92-102, 2016.

ROMÃO, B. B. Produção de etanol por hidrólise ácida de melão de soja. Uberlândia. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 93 p. Dissertação (Mestrado), 2011.

ROMÃO, B. B., SILVA, F. B., RESENDE, M. M., CARDOSO, V. L. Ethanol production from hydrolyzed soybean molasses. *Energy Fuels*, v. 26, p. 2310–2316, 2012.

SAENGE, C., CHEIRSILP, B., SUKSAROGE, T. T., BOURTOOM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, v. 46(1), p. 210-218, 2011.

SARAN, S., MATHUR, A., DALAL, J., SAXENA, R.K. Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* A29. *Fuel*, v. 188, p. 324-331, 2017.

SAUER, L. A., DAUCHY, R. T., NAGEL, W. O., MORRIS, H. P. Mitochondrial malic enzymes. Mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme activity and malate-dependent pyruvate formation are progression-linked in Morris hepatomas. *Journal of Biological Chemistry*, v. 255(9), p. 3844-3848, 1980.

SAXENA, V., SHARMA, C., BHAGAT, S., SAINI, V., & ADHIKARI. Lipid and Fatty Acid Biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75 (4), p. 501-505, 1998.

SITEPU, I., JIN, M., FERNANDEZ, J. E., DA COSTA SOUSA, L., BALAN, V., BOUNDY-MILLS, K. Identification of oleaginous yeast strains able to accumulate high intracellular lipids when cultivated in alkaline pretreated corn stover. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98(17), p. 7645-7657. 2014.

SOUZA-SARTORI, J. A., SCALISE, C., BAPTISTA, A. S., LIMA, R. B., AGUIAR, C. L. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total. *Bioscience Journal*, v. 29(2), p. 297-307, 2013.

SPEARMAN, M., CHAN, S., JUNG, V., KOWBEL, V., MENDOZA, M., MIRANDA, V., BUTLER, M. Components of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract as defined media additives that support the growth and productivity of CHO cells. *Journal of Biotechnology*, v. 233, p. 129–142, 2016.

TCHAKOUTEU, S. S., KOPSAHELIS, N., CHATZIFRAGKOU, A., KALANTZI, O., STOFOROS, N. G., KOUTINAS, A. A., AGGELIS, G. e PAPANIKOLAOU, S. *Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media: Adaptation dynamics and lipid production. *Engineering in Life Sciences*, v. 17, p. 237-248, 2017.

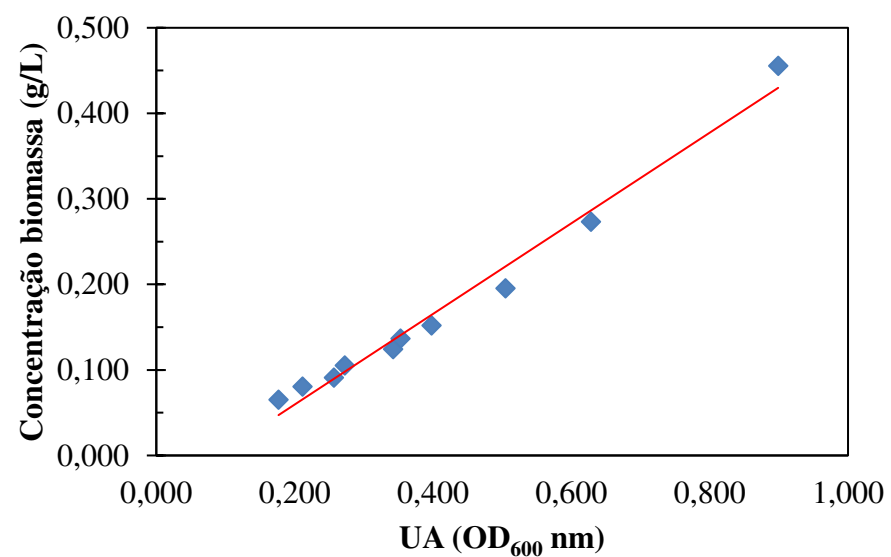
- UPRETY, B. K., DALLI, S. S., RAKSHIT, S. K. Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities. *Energy Conversion and Management*, v. 135, p. 117-128, 2017.
- URQUIAGA, S., ALVES, B., BOODEY, R. Produção de biocombustíveis A questão do balanço energético. *Revista de Política Agrícola*, v.14, p. 42-46, 2015.
- VAN DER POL, E. C., BAKKER, R. R., BAETS, P., EGGINK, G. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio) chemicals and fuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98(23), p. 9579-9593, 2014.
- WERNER-WASHBURNE, M., BRAUN, E., JOHNSTON, G. C., SINGER, R.A. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, v. 57, p. 383–401, 1993.
- WIEBE, M. G., KOIVURANTA, K., PENTTILÄ, M., RUOHONEN, L. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnology*, v. 12(1), p. 26, 2012.
- WU, H., LI, Y., CHEN, L., ZONG, M. Production of microbial oil with high oleic acid content by *Trichosporon capitatum*. *Applied Energy*, v. 88(1), p. 138-142, 2011.
- WU, S.; HU, C., JIN, G., ZHAO, X., ZHAO, Z.K. Phosphate- limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6124-6129, 2010.
- YAMAUCHI, H., MORI, H., KOBAYASHI, T., SHIMIZU, S. Mass production of lipids by *Lipomyces starkeyi* in microcomputer-aided-fed-batch culture. *Journal of Fermentation Technology*, v. 61, p. 275–280, 1983.
- ZHAO, X., PENG, F., DU, W., LIU, C., LIU, D. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35(6), p. 993-1004, 2012.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZHU, Z.; ZHANG, S.; LIU, H.; SHEN, H.; LIN, X.; YANG, F.; ZHOU, Y.J.; JIN, G.; YE, M.; ZOU, H.; ZHAO Z.K. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospodium toruloides*. *Nature Communications*, v. 3, p. 1112, 2012.

APÊNDICE

Figura A1: Curva de calibração utilizada para obtenção da concentração celular do inóculo em meio YPD.



Equação da reta:

$$y = 0,5296x - 0,0464$$

$$R^2 = 0,9811$$

Tabela A1: Valores de diluições e OD médias obtidas a partir de medida em espectrofotômetro.

Diluição	Concentração (gbiomassa /L)	UA (OD ₆₀₀ nm)
30	0,4553	0,8990
50	0,2732	0,6283
70	0,1951	0,5050
90	0,1518	0,3980
100	0,1366	0,3530
110	0,1242	0,3427
130	0,1051	0,2727
150	0,0911	0,2567
170	0,0804	0,2117
210	0,0650	0,1767

APÊNDICE

Tabela A2: Dados do cultivo de *R. toruloides* em H_{NaOH} ao longo de 120 h a 28°C e 200 rpm, OD₆₀₀ inicial igual a 2.

Tempo (h)	Concentração de biomassa (g/L)	Concentração de xilose (g/L)	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de ácido acético (g/L)	pH
0	1,482	16,118	0,717	2,935	6,000
24	5,520	11,509	0,077	0,007	
48	6,719	7,634	0,045	0,005	
72	8,498	5,826	0,011	0,002	
96	8,330	4,942	0,016	---	
120	8,639	4,497	0,022	0,014	8,820

Tabela A3: Dados do cultivo de *R. toruloides* em H_{NaOH} ao longo de 120 h a 28°C e 200 rpm, OD₆₀₀ inicial igual a 2.

Tempo (h)	Concentração de biomassa (g/L)	Concentração de xilose (g/L)	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de ácido acético (g/L)	pH
0	1,406	20,856	0,912	3,768	5,500
24	7,389	14,241	0,050	0,070	
48	9,610	8,170	0,024	0,027	
72	11,684	4,516	0,037	0,016	
96	11,384	2,413	0,017	0,011	
120	10,599	1,662	0,024	0,014	7,670

APÊNDICE

Tabela A4: Descodificação das variáveis para a concentração dos substratos utilizados na metodologia proposta por Plackett e Burman (1946), realizados em triplicatas.

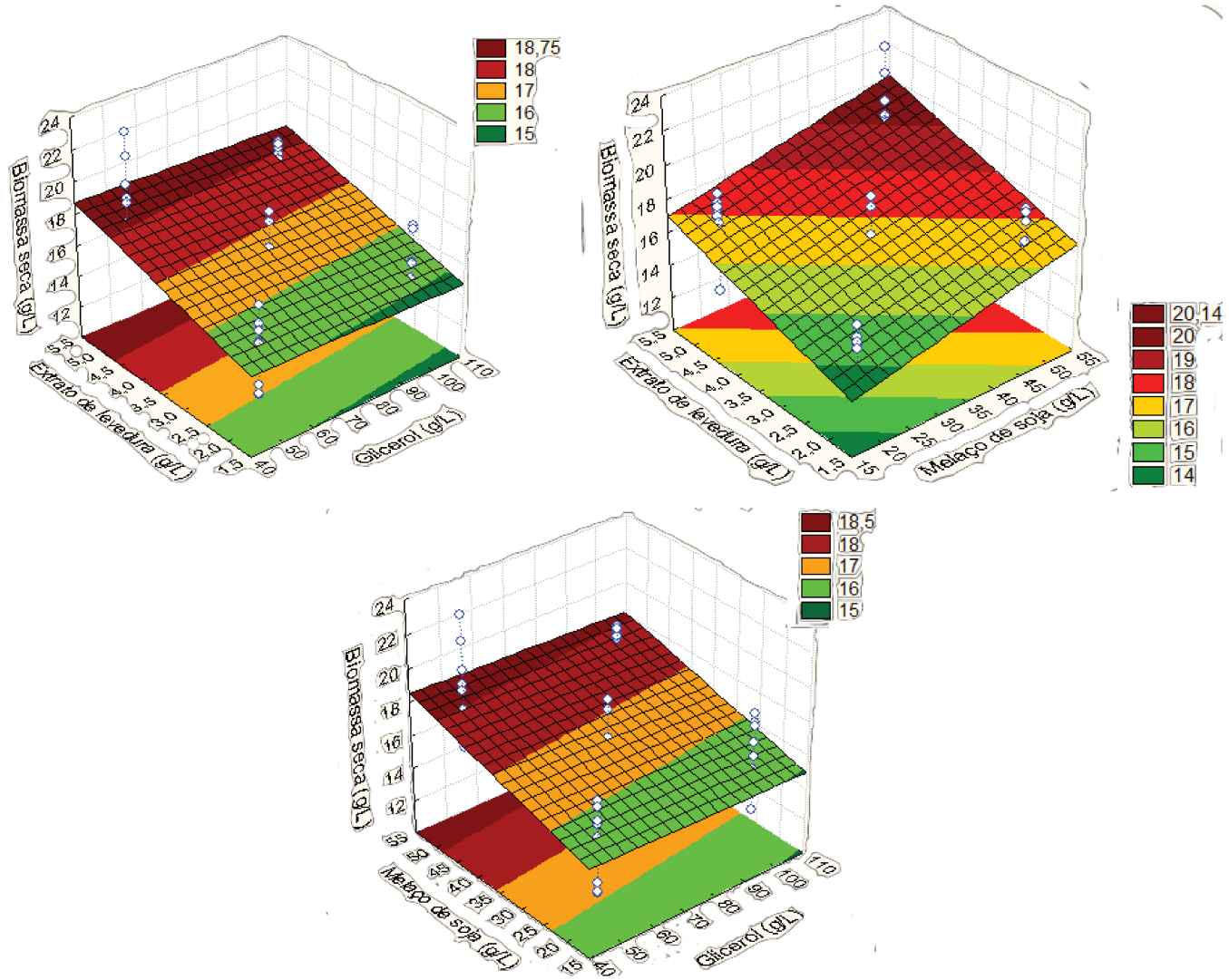
Ensaio	Glicerol (g/L)	Melaço de soja (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	MgSO₄. 7H₂O (g/L)	FeCl₃ (g/L)	K₂SO₄ (g/L)	VI1	VI2	VI3	VI4	VI5
1,00	100,00	10,00	5,00	0,00	0,00	0,00	1	1	1	-1	1
2,00	100,00	50,00	2,00	3,00	0,00	0,00	-1	1	1	1	-1
3,00	50,00	50,00	5,00	0,00	1,00	0,00	-1	-1	1	1	1
4,00	100,00	10,00	5,00	3,00	0,00	3,00	-1	-1	-1	1	1
5,00	100,00	50,00	2,00	3,00	1,00	0,00	1	-1	-1	-1	1
6,00	100,00	50,00	5,00	0,00	1,00	3,00	-1	1	-1	-1	-1
7,00	50,00	50,00	5,00	3,00	0,00	3,00	1	-1	1	-1	-1
8,00	100,00	10,00	5,00	3,00	1,00	0,00	1	1	-1	1	-1
9,00	100,00	10,00	2,00	3,00	1,00	3,00	-1	1	1	-1	1
10,00	50,00	10,00	2,00	0,00	1,00	3,00	1	-1	1	1	-1
11,00	100,00	50,00	2,00	0,00	0,00	3,00	1	1	-1	1	1
12,00	100,00	10,00	2,00	0,00	0,00	0,00	-1	-1	-1	-1	-1
13,00	75,00	30,00	3,50	1,50	0,50	1,50	0	0	0	0	0

VI = Variáveis independentes previstas na metodologia para permissão do cálculo dos efeitos principais por aumentar o grau de liberdade.

Tabela A5: Valores médios e desvios padrões das respostas das triplicatas do PB-12.

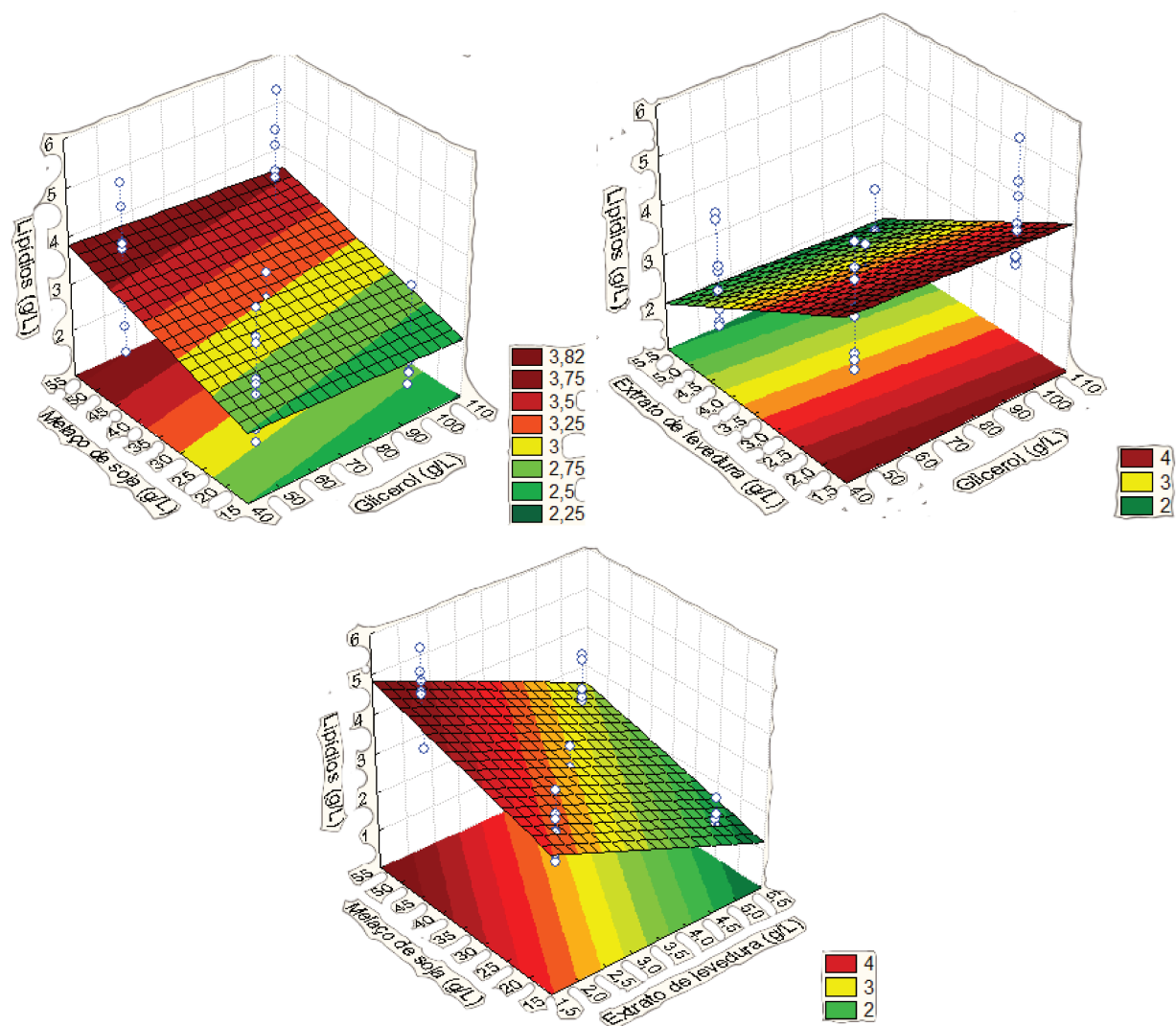
Ensaio	Concentração de biomassa (g/L)	Desvio padrão para biomassa	Concentração de lipídios (g/L)	Desvio padrão para lipídios	Conteúdo lipídico (% m/m)	Razão C/N	Produtividade lipídica [mg/(L.h)]
1	17,69	0,88	1,58	0,14	8,97	70,54	13,17
2	16,39	1,91	3,90	0,69	23,82	92,54	32,49
3	20,74	2,15	3,44	0,67	16,52	41,85	28,63
4	15,38	2,57	1,62	0,34	10,50	70,54	13,49
5	16,17	1,94	4,88	0,85	30,69	92,54	40,69
6	18,48	0,41	2,35	0,53	12,68	63,18	19,55
7	18,77	2,87	2,13	0,63	11,18	41,85	17,76
8	17,01	0,61	1,93	0,34	11,36	70,54	16,08
9	13,17	1,90	2,80	0,17	21,47	130,20	23,36
10	14,92	0,24	3,37	0,01	22,57	72,56	28,07
11	16,51	1,15	4,54	0,64	27,43	92,54	37,86
12	14,55	1,73	3,97	0,38	27,38	130,20	33,09
13 (C)	17,78	1,17	2,86	0,61	16,14	65,72	23,87

Figura A2: Respostas da variável dependente concentração de biomassa em função da concentração de extrato de levedura, melaço de soja e glicerol no planejamento de experimentos inicial (PB-12).



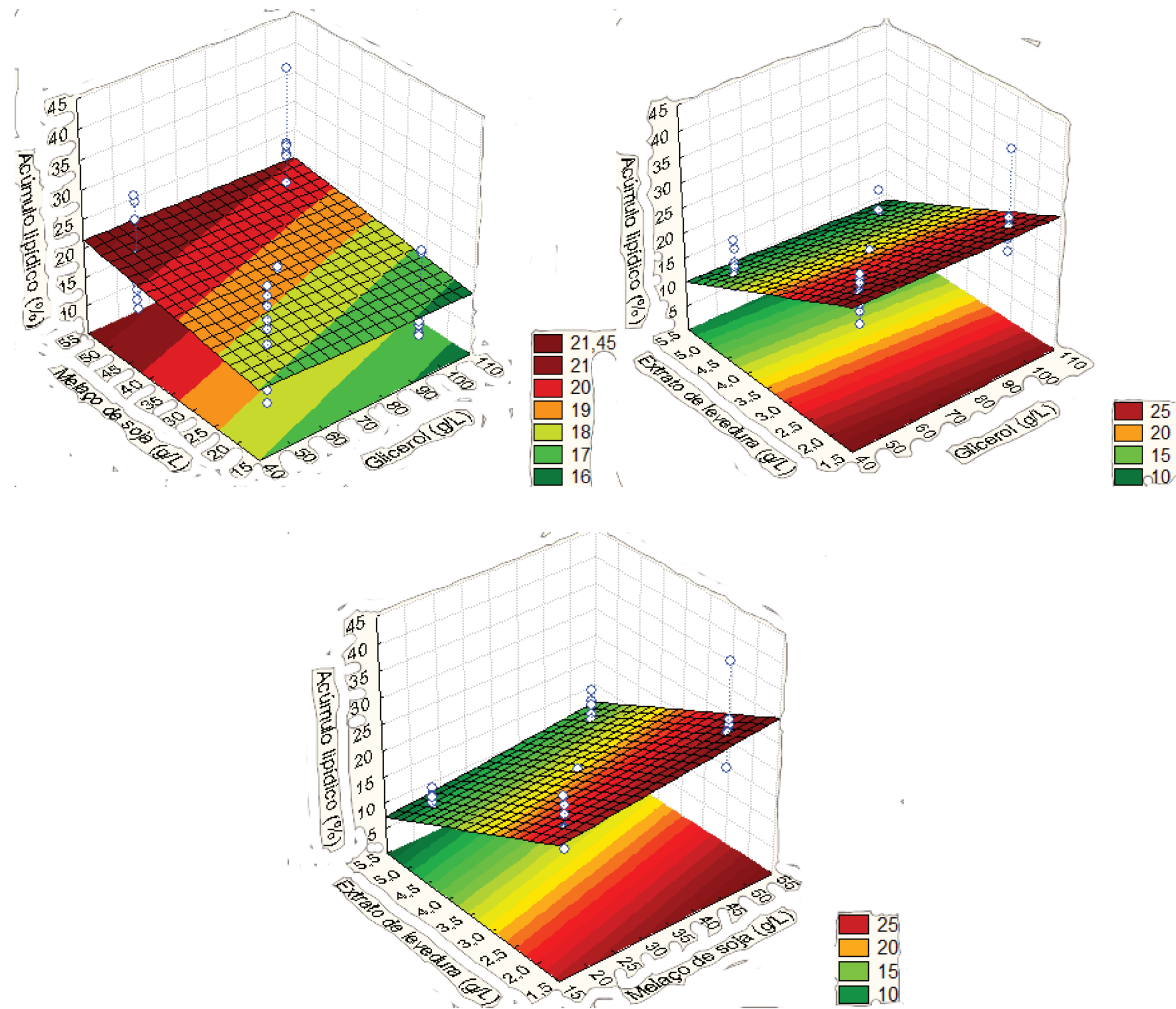
APÊNDICE

Figura A3: Respostas da variável dependente concentração de lipídios em função da concentração de extrato de levedura, melado de soja e glicerol no planejamento de experimentos inicial (PB-12).



APÊNDICE

Figura A4: Respostas da variável dependente conteúdo lipídico em função da concentração de extrato de levedura, melago de soja e glicerol no planejamento de experimentos inicial (PB-12).



APÊNDICE

Tabela A6: Descodificação das variáveis para concentração dos substratos utilizados no DCCR determinados pelo software Statistica 8.0 (StataSoft Inc., Tulsa, EUA). Experimentos realizados em triplicatas.

Ensaio	Concentrações (g/L)		
	Glicerol	Melaço de soja	Extrato de levedura
1	36,00	50,00	0,43
2	36,00	50,00	2,60
3	64,00	50,00	0,43
4	64,00	50,00	2,60
5	30,00	50,00	1,50
6	69,80	50,00	1,50
7	50,00	50,00	0,00
8	50,00	50,00	3,03
9	50,00	50,00	1,50
10	50,00	50,00	1,50
11	50,00	50,00	1,50

Tabela A7: Valores médios e desvios padrões das respostas das triplicatas do DCCR.

Ensaio	Concentração de biomassa (g/L)	Desvio padrão para biomassa	Concentração de lipídios (g/L)	Desvio padrão para lipídios	Conteúdo lipídico (% m/m)	Razão C/N	Produtividade lipídica (g/(L.h))
1	11,57	0,90	4,88	0,42	42,16	68,47	0,041
2	14,77	1,24	3,89	0,63	26,30	47,42	0,032
3	11,51	0,73	5,53	0,96	48,03	92,55	0,046
4	13,89	3,24	4,39	0,85	31,60	63,67	0,037
5	13,28	0,40	3,11	0,94	23,39	52,01	0,026
6	12,91	1,32	4,06	1,07	31,43	79,52	0,034
7	11,57	0,72	4,13	1,15	35,70	88,62	0,034
8	14,70	2,43	3,13	1,06	21,30	52,38	0,026
9	13,20	1,11	5,81	0,72	43,98	65,77	0,048
10	12,90	1,05	6,17	0,47	47,81	65,77	0,051
11	13,30	0,97	6,03	0,54	45,36	65,77	0,050

Tabela A8: ANOVA parametrizada para a variável dependente concentração de biomassa.

	SQ	GL	QM	F	p- valor	F_{calc}	F_{tab}
Blocos	3,86889	2	1,93444	14,6039	0,004949		
Glicerol (g/L) (L)	0,81199	1	0,81199	6,1300	0,048072		
Extrato de levedura (g/L) (L)	37,48660	1	37,48660	283,0021	0,000003		
Falta de ajuste	46,92585	22	2,13299	16,1029	0,001166	16,101	7,3
Erro Puro	0,79476	6	0,13246				
Total	89,88809	32					

SQ – Soma dos quadrados; GL – grau de liberdade; QM – Quadrado médio.

Tabela A9: Teste de F para a anova parametrizada da variável dependente concentração de biomassa.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}
Regressão	42,16748	4	40,233032	23,60667198	2,15
Erro residual	47,72062	28	1,704308		
Total	89,88809	32			

SQ – Soma dos quadrados; GL – grau de liberdade; QM – Quadrado médio.

APÊNDICE

Tabela A10: ANOVA parametrizada para a variável dependente concentração de lipídios.

	SQ	GL	QM	F	p- valor	F_{calc}	F_{tab}
Blocos	0,87607	2	0,43803	4,5687	0,06227		
					2		
Glicerol (g/L) (L)	2,34077	1	2,34077	24,4144	0,00260		
					1		
Extrato de levedura (g/L) (L)	4,88476	1	4,88476	50,9484	0,00038		
					1		
Glicerol (g/L) (Q)	13,42048	1	13,42048	139,976	0,00002	11,724	2,8
				6	2	4	3
Extrato de levedura (g/L) (Q)	12,72796	1	12,72796	132,753	0,00002		
				6	6		
Falta de ajuste	22,48190	20	1,12409	11,7244	0,00288		
					5		
Erro puro	0,57526	6	0,09588				
Total SS	51,18274	32					

SQ – Soma dos quadrados; GL – grau de liberdade; QM – Quadrado médio.

Tabela A11: Teste de F para a anova parametrizada da variável dependente concentração de lipídios.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}
Regressão	34,25002	6	33,811988	38,1275	2,01
Erro residual	23,05716	26	0,886814		
Total	57,30718	32			

SQ – Soma dos quadrados; GL – grau de liberdade; QM – Quadrado médio.

Tabela A12: ANOVA parametrizada para a variável dependente conteúdo lipídico.

	SQ	GL	QM	F	p- valor	F_{calc}	F_{tab}
Blocos	38,533	2	19,267	5,8011	0,039605		
Glicerol (g/L) (L)	182,192	1	182,192	54,8573	0,000311		
Extrato de levedura (g/L) (L)	1064,87	1	1064,871	320,6277	0,000002		
Glicerol (g/L) (Q)	595,974	1	595,974	179,4451	0,000011	17,449	2,83
Extrato de levedura (g/L) (Q)	469,879	1	469,879	141,4784	0,000021		
Falta de ajuste	1159,07	20	57,953	17,4495	0,000947		
Erro puro	19,927	6	3,321				
Total SS	3274,37	32					

SQ – Soma dos quadrados; GL – grau de liberdade; QM – Quadrado médio.

Tabela A13: Teste de F para a anova parametrizada da variável dependente conteúdo lipídico.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}
Regressão	2351,44936	6	2332,182741	51,43092579	2,01
Erro residual	1178,99397	26	45,345922		
Total	3530,44332	32			

SQ – Soma dos quadrados; GL – grau de liberdade; QM – Quadrado médio.

Figura A5: Valores preditos em função dos observados relativos à resposta concentração de lipídios.

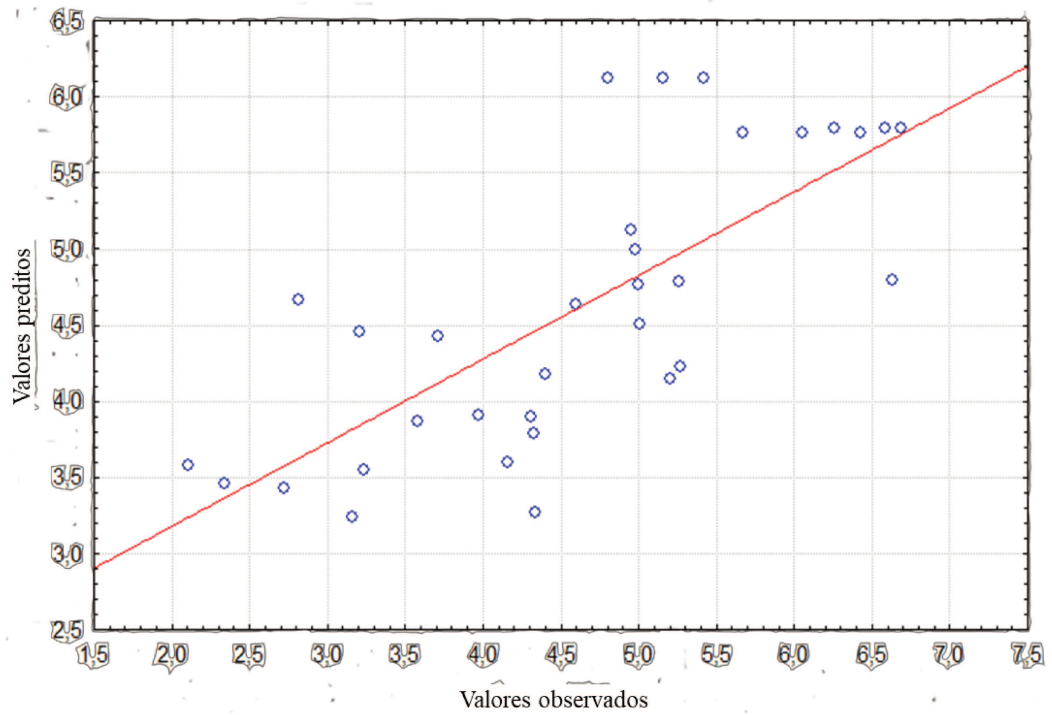


Figura A6: Valores preditos em função dos observados relativos à resposta conteúdo lipídico.

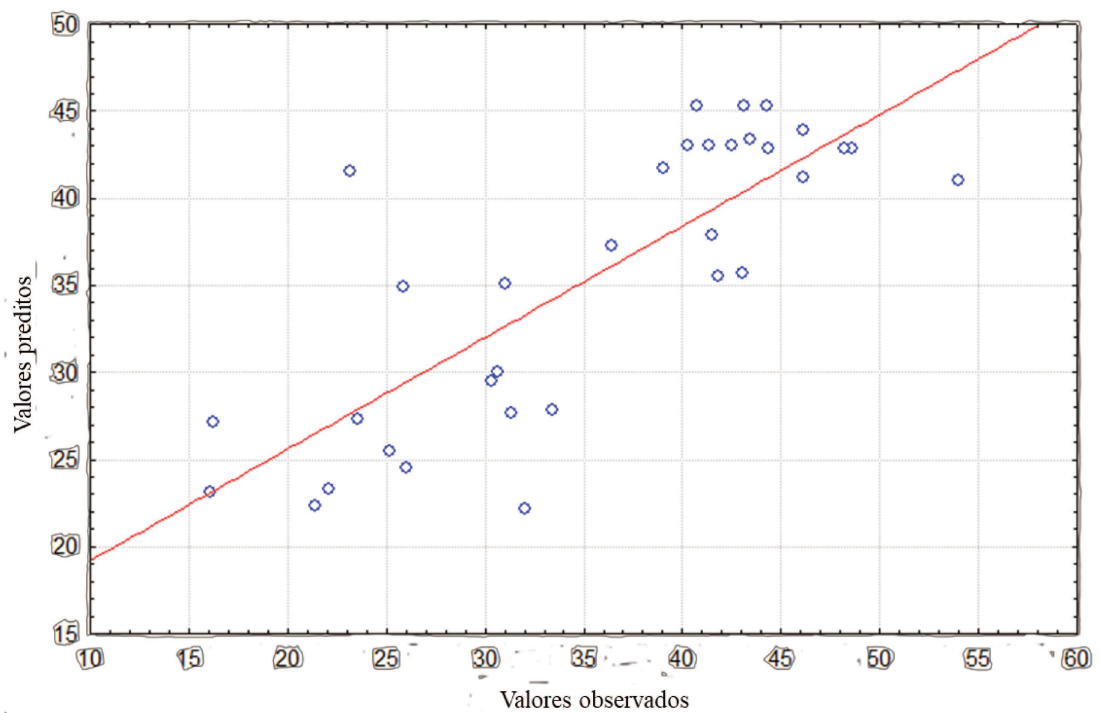


Tabela A14: Concentração dos açúcares do meio otimizado ao longo do tempo para cultivo com a levedura *R. toruloides*.

Tempo	Concentrações (g/L)					
	Estaquiase	Rafinose	Sacarose	Glicose	Xilose	Glicerol
0	2,99± 0,27	3,31± 0,05	4,88±0,23	1,06	20,34±0,74	33,82±0,46
24	1,88± 0,32	2,56±0,20	1,99±0,11	0,83±0,08	17,75±0,93	26,59±4,19
48	0,58±0,08	4,56±0,51	2,87±0,02	1,09±0,28	13,82±0,49	23,36±1,8
72	0,00	4,08±0,10	2,58±0,08	1,02±0,02	9,54±0,43	16,07±2,48
96	0,00	4,90±0,12	3,27±0,12	1,37±0,05	7,52±0,28	12,15±2,16
120	0,00	4,68±0,15	3,12±0,13	1,33±0,07	4,57±0,50	8,25±2,12