

JOSÉ GERALDO DA CRUZ PRADELLA

Engenheiro Químico, Escola de Engenharia Mauá, 1975.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA CINÉTICA
DO CRESCIMENTO CELULAR E ACÚMULO DE
LIPÍDIOS POR *Rhodotorula gracilis*

Dissertação apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos da Univer
sidade Estadual de Campinas para ob
tenção do Título de Mestre em Enge
nharia.

Orientador: Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes

Campinas, 1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais

e à Jú

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão às seguintes pessoas e instituições:

- Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, UNICAMP*
- Departamento de Engenharia Química, UFSCar*
- Ana Maria da Costa Pereira, secretária, DEQ-UFSCar*
- Carlos Hokka, professor FEAA, UNICAMP*
- Raymundo Garbelotti Filho, desenhista, DEQ-UFSCar*
- Gráfica da UFSCar*
- Carlos Eduardo Vaz Rossel*

a minha orientadora, Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes

e, a Maria Isabel Rodrigues pela dedicação.

RESUMO

Foi feito um estudo do desenvolvimento do crescimento celular, do acúmulo de lipídio e do consumo de substrato quando cultivamos Rhodotorula gracilis em um meio de cultura quimicamente definido.

O cultivo foi realizado em um fermentador com 10 litros de volume inicial de meio de cultura, pH 5,0; 29°C; agitação de 500 rpm e aeração de 1 vvm de ar.

O crescimento celular foi modelado pela cinética de Kono e Asai e apresentou tres fases: transiente ($0 \leq \theta \leq 3,50h$); exponencial ($3,50 \leq \theta \leq 7,25h$) e de declínio ($\theta > 7,25h$).

O acúmulo de lipídio apresentou duas fases distintas: fase I, onde o acúmulo de lipídio era associado ao crescimento celular ($0 \leq \theta \leq 11,00h$) e fase II, onde o acúmulo de lipídio era não associado ao crescimento celular ($\theta > 11,00h$).

O rendimento de lipídio máximo encontrado (0,187g de lipídio/g de glicose consumida) se deu entre 17 e 19 horas.

ABSTRACT

A study of the cellular growing course, of the lipids accumulation and of substrate consumption was carried out when Rhodotorula gracilis was cultivated in a chemically defined medium.

The cultivation experiments were carried out in fermenter under the following conditions: initial volume of 10 liters; pH 5,0, 29°C; revolutions of agitator 500 rpm and air flow of 1 vvm.

The cellular growing was modelled by the Kono e Asai kinetics and showed three phases: transient phase ($0 \leq \theta \leq 3,50$ h), exponential phase ($3,50 \leq \theta \leq 7,25$ h) and declining phase ($\theta \geq 7,25$ h).

The lipids accumulation showed two distinct phases: phase I, where the lipids accumulation was associated to the cellular growing ($0 \leq \theta \leq 11,00$ h) and phase II, where the lipids accumulation was not associated with the cellular growing ($\theta \geq 11,00$ h).

The maximum lipids yield (0,187 g/g consumed glucose) occurred between 17 and 19 hours.

I N D I C E

	Pg
NOMENCLATURA PARA O MÉTODO MATEMÁTICO APLICADO	- 1 -
SUBSCRITOS	- 111 -
1. INTRODUÇÃO	- 01 -
2. REVISÃO DA LITERATURA	- 03 -
2.1. Cinética dos Processos Fermentativos	- 03 -
2.1.1. Considerações Gerais	- 03 -
2.1.2. Modelos Cinéticos Não Estruturados	- 05 -
2.2. Síntese de Lipídios por Microrganismos	- 15 -
2.2.1. Microrganismos Acumuladores de Lipídios	- 15 -
2.2.2. Mecanismo de Síntese de Lipídios	- 16 -
2.2.3. Cinética do Acúmulo de Lipídios por <u>Rhodotorula gracilis</u>	- 17 -
2.2.4. Tecnologia da Síntese de Lipídio e Biomassa por <u>Rhodotorula gracilis</u>	- 21 -
3. MATERIAL E MÉTODOS	- 29 -
3.1. Microrganismo Utilizado	- 29 -
3.2. Conservação das Culturas	- 29 -
3.3. Descrição dos Equipamentos Utilizados nos Cultivos	- 29 -
3.3.1. Agitador Incubador Rotativo	- 29 -

	Pg.
3.3.2. Fermentador de Laboratório de 20 l	- 30 -
3.3.3. Equipamentos Auxiliares	- 32 -
3.4. Meio de Cultura Utilizado	- 32 -
3.5. Procedimento Experimental	- 33 -
3.5.1. Preparo do Inóculo	- 33 -
3.5.2. Metodologia dos Cultivos	- 33 -
3.6. Métodos Analíticos	- 34 -
3.6.1. Massa Seca Total	- 34 -
3.6.2. Lipídio Total	- 34 -
3.6.2.a. Metodologia da Análise	- 35 -
3.6.2.b. Procedimento para Levantamento da Cur <u>va</u> de Calibração	- 36 -
3.6.3. Massa Seca Desengordurada	- 37 -
3.6.4. Açúcar Redutor	- 37 -
3.6.5. Nitrogênio Amoniacal	- 37 -
3.7. Métodos Matemáticos Utilizados	- 38 -
3.7.1. Crescimento Celular	- 38 -
3.7.2. Estimativa dos parâmetros \bar{X}_0 , \bar{X}_L , \bar{X}_M , θ_0 , θ_L , θ_C e $k_{\bar{X}}$	- 39 -
3.7.3. Consumo de Nitrogênio Amoniacal	- 42 -

	Pg.
3.7.4. Estimativa dos parâmetros β_{trans} , β_{exp} , β_{decl} , N_0 , N_L e N_C	- 44 -
3.7.5. Acúmulo de Lipídios	- 45 -
3.7.6. Estimativa dos parâmetros k_0 , τ , k_{P_I} , P_0 , P_L , P_C , P_* e θ_*	- 49 -
3.7.7. Rendimento lipídio acumulado- -açúcar consumido	- 50 -
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 - 51 -
4.1. Crescimento Celular	- 53 -
4.2. Consumo de Nitrogênio Amoniacal	- 55 -
4.3. Acúmulo de Lipídio	- 55 -
4.4. Composição do Lipídio	- 58 -
 5. CONCLUSÕES	 - 77 -
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 - 79 -
 ANEXO I	 - 83 -
ANEXO II	- 84 -
ANEXO III	- 85 -
ANEXO IV	- 86 -
ANEXO V	- 87 -

NOMENCLATURA PARA O MÉTODO MATEMÁTICO UTILIZADO

k_0	= constante da equação (3.24)	(h ⁻¹)
k_{pI}	= constante estequiométrica para o acúmulo de lipídio na Fase I	
k_{pII}	= constante de proporcionalidade para o acúmulo de lipídio na Fase II	(h ⁻¹)
N	= concentração de sulfato de amônio	(g/l)
P	= concentração de lipídio acumulado	(g/l)
r_N	= velocidade de variação da concentração de sulfato de amônio	(g/lh)
r_P	= velocidade de variação da concentração de lipídio acumulado	(g/lh)
$r_{\bar{X}}$	= velocidade de variação da concentração da massa seca desengordurada ou velocidade do crescimento celular	(g/lh)
S	= concentração de glicose	(g/l)
$Y_{P/S}$	= rendimento lipídio acumulado-açúcar consumido	
X	= concentração da massa seca total	(g/l)
\bar{X}	= concentração da massa seca desengordurada	(g/l)
β_C	= fator de conversão substrato-microrganismo equação (3.6)	
β_{exp}	= fator de conversão substrato-microrganismo fase exponencial	

β_{decl} = fator de conversão substrato-microrganismo
fase de declínio

β_{trans} = fator de conversão substrato-microrganismo
fase transiente

τ = constante de tempo (h^{-1}); tempo para o acúmulo
de lipídio

(h)

SUBSCRITOS

O = referente ao início do ensaio

L = referente ao limite entre as fases transiente
e exponencial

C = referente ao limite entre as fases exponencial
e de declínio

M = referente ao valor máximo atingido

* = referente ao tempo de esgotamento de sulfato
de amônio

1. INTRODUÇÃO

Durante e após a Segunda Guerra Mundial muita pesquisa foi dirigida ao problema da produção de lipídios e biomassa por microrganismos e um considerável sucesso foi obtido nesse processo a partir de algas, fungos e leveduras tanto em escala de laboratório quanto em escala piloto. Dos microrganismos investigados, provavelmente *Rhodotorula gracilis* é o mais promissor devido a relativa facilidade com que ela acumula lipídios a altos níveis de rendimentos e habilidade de assimilar diferentes substratos.

Revisões sobre o assunto são realizadas periodicamente.

Do entendimento desse processo fermentativo e da utilização de substratos economicamente viáveis e disponíveis em grandes quantidades no Brasil, tais como, resíduos celulósicos, amiláceos e açucarados de indústrias de alimentos em geral, dependerá a produção econômica de lipídios e proteínas microbianas aproveitáveis na composição de rações animais e mesmo na alimentação humana.

O objetivo desse trabalho é estudar a cinética do cultivo em batelada do acúmulo de lipídio, crescimento celular e consumo de substrato por *Rhodotorula gracilis* em um meio de cultura quimicamente definido. Dessa maneira, tentamos conseguir uma melhor compreensão desse processo para que se possa, em conjunto com estudos sobre a utilização de

substratos baratos e valor nutricional, julgar sua viabilidade econômica futura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cinética dos Processos Fermentativos

2.1.1. Considerações Gerais

Com o desenvolvimento dos processos fermentativos em escala industrial, a pesquisa de modelos matemáticos que possam descrever a cinética desses processos, se torna cada vez mais necessário para o melhor entendimento do processo fermentativo em si, pela possibilidade de simulação e otimização do processo com a ajuda de computadores e a conseqüente diminuição do trabalho experimental.

Basicamente, encontramos na literatura, dois tipos de modelos que descrevem a cinética dos processos fermentativos:

a) Modelos não-estruturados

Os modelos não-estruturados se caracterizam pelo fato de descreverem de uma maneira global a cinética de crescimento celular, formação de produtos e consumo de substrato.

Dessa maneira esses modelos lançam mão de expressões matemáticas que correlacionam quantidades (parâmetros) globais de um sistema fermentativo como, concentração da massa de células, concentração de substrato e de produto formado, não levando em conta a complexa malha de reações catalizadas pelas enzimas, que ocorrem no interior de um microrganismo.

b) Modelos estruturados

Os modelos estruturados descrevem as mudanças dos componentes químicos intracelulares em função do tempo e relacionam essas mudanças com o crescimento celular, formação do produto e consumo do substrato. Um exemplo desse tipo de modelo foi o desenvolvido por Imanaka et al⁽¹⁾ para descrever a síntese da enzima galactosidase. A velocidade da produção da enzima era proporcional à concentração do RNA_m das células dos microrganismos.

A abordagem da cinética dos processos fermentativos a esse nível permite a construção de modelos mais precisos porque eles levam em conta a mudança com o tempo da estrutura fisiológica dos microrganismos.

Por essa razão, segundo Fredrickson et al⁽²⁾, é de se esperar, a priori, que os modelos não-estruturados sejam inadequados para prever situações nas quais o estado fisiológico de um sistema microbiológico está mudando rapidamente com o tempo.

Não obstante, as vantagens apresentadas pelos modelos estruturados em relação aos não-estruturados, apenas estes serão revistos neste trabalho, pois os modelos estruturados dependem de análise acurada dos componentes celulares, técnicas extremamente complexas, que escapa ao objetivo deste trabalho.

2.1.2. Modelos Cinéticos Não-Estruturados

Muitos investigadores tem tentado fazer a classificação dos processos fermentativos de uma maneira qualitativa sem propor expressões matemáticas que descrevam a cinética do processo.

Desta maneira, Gaden⁽³⁾ classificou os processos de fermentação em tres tipos, baseando-se na relação entre formação de produto e utilização do substrato como se segue: (I) formação de produto diretamente relacionado com a utilização de substrato; (II) formação de produto indiretamente relacionado com a utilização de substrato; (III) formação de produto aparentemente não associado com a utilização do substrato.

Maxon⁽⁴⁾ classificou o processo de fermentação em tres tipos, baseado na relação entre formação de produto e crescimento celular, da seguinte forma: (I) formação de produto e crescimento celular são identicos; (II) formação de produto associado com crescimento; (III) formação de produto não associado com crescimento.

Deindoerfer⁽⁵⁾ classificou os processos fermentativos em quatro tipos, baseado nas reações que definem o processo: (I) simples, quando os nutrientes são convertidos a produto através de uma relação estequiométrica constante, sem acúmulo de compostos intermediários; (II) simultâneo, nutrientes são convertidos a produto através de uma relação

estequiométrica variável sem acúmulo de intermediários com postos; (III) consecutivo, nutrientes são convertidos em produto com acúmulo de um intermediário; (IV) degrau, nutrientes são completamente convertidos a um intermediário antes da conversão a produto, ou, nutrientes são seletivamente convertidos a produto em uma ordem preferencial.

Por outro lado, existem estudos de alguns pesquisadores que propõem relações matemáticas que descrevam a cinética dos processos fermentativos.

A equação de Michaelis-Menten⁽⁶⁾ foi a primeira das expressões desse tipo e o desenvolvimento dessa equação baseou-se no conceito da interação enzima-substrato com a formação de um complexo. Para a reação que envolve um substrato (S), uma única enzima (E) para formar um produto (P) podemos escrever:



sendo ES o complexo formado.

Denominando-se de C a concentração do complexo, E a concentração da enzima, S a concentração do substrato e P a concentração do produto formado, podemos escrever:

$$\frac{dC}{d\theta} = k_1(E-C)(S-C) - k_2C - k_3C \quad (2.2)$$

Supondo-se que a concentração do substrato seja muito maior que C, isto é, $S \gg C$, a equação (2.2) se torna:

$$\frac{dC}{d\theta} = k_1(E-C)S - (k_2 + k_3)C \quad (2.3)$$

Supondo-se que a velocidade de formação do complexo seja igual a sua velocidade de desdobraimento, isto é, $\frac{dC}{d\theta} = 0$, a equação (2.3) pode ser escrita como:

$$C = \frac{ES}{(k_2 + k_3)/k_1 + S} = \frac{ES}{k_m + S} \quad (2.4)$$

sendo:

$$k_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

A velocidade de formação do produto pode ser escrita como sendo:

$$\frac{dP}{d\theta} = k_3C = v \quad (2.5)$$

Podemos então escrever a velocidade de formação do produto, v , como sendo:

$$v = k_3E \frac{S}{k_m + S} \quad (2.6)$$

O termo k_3E é a velocidade máxima de formação do produto e é correspondente à situação em que toda a enzima se encontra na forma de complexo ($E=C$). Denominaremos o termo k_3E de $V_{m\bar{a}x}$. Dessa maneira, a equação (2.6) pode ser escrita como sendo:

$$v = \frac{V_{m\bar{a}x} S}{k_m + S} \quad (2.7)$$

A equação (2.7) é a equação de Michaelis-Menten. O termo k_m é denominado constante de Michaelis-Menten.

Monod^(2,6), utilizando-se de cultura pura de um microrganismo cultivado em meio com um único substrato limitante obteve a seguinte expressão empírica para o crescimento de microrganismos:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{d\theta} = \frac{\mu_{m\acute{a}x} S}{k_s + S} \quad (2.8)$$

onde $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade específica máxima de crescimento quando a concentração do substrato é ilimitada, k_s é a concentração de substrato para a qual a velocidade específica de crescimento vale $\mu_{m\acute{a}x}/2$ e μ_x é a velocidade específica de crescimento do microrganismo.

Podemos utilizar o conceito de fator de conversão substrato-microrganismo, $Y_{X/S}$, também chamado rendimento, para obtermos uma expressão de velocidade específica de consumo de substrato.

Dessa maneira, definimos:

$$Y_{X/S} = - \frac{dX/d\theta}{dS/d\theta} \quad (2.9)$$

Introduzindo a equação (2.9) na equação (2.8), ficaremos com:

$$\mu_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{d\theta} = - \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{m\acute{a}x} S}{k_s + S} \quad (2.10)$$

onde μ_s é a velocidade específica do consumo de substrato.

Existem na literatura muitos outros modelos propos

tos que modificam as equações de Monod para o caso de considerar: a) reações de manutenção das células, isto é, nem todo substrato é consumido para o crescimento do microrganismo; b) inibição pelo substrato, devido a altas concentrações do mesmo; c) diferentes substratos limitantes, em diferentes estágios da fermentação; d) inibição devido a alguma substância produzida pelos microrganismos no seu crescimento. Uma extensa revisão sobre esses modelos foi apresentada por Fredrickson et al⁽²⁾.

Luedeking e Piret⁽⁷⁾ estudando a cinética de produção de ácido lático em fermentação descontínua verificaram que a velocidade específica de formação do produto, μ_p , poderia ser expressa da seguinte forma:

$$\mu_p = \alpha\mu_x + \beta \quad (2.11)$$

onde μ_x é a velocidade específica de crescimento do microrganismo.

Dessa maneira a equação (2.11) pode ser escrita na seguinte forma:

$$\frac{dP}{d\theta} = \alpha \frac{dX}{d\theta} + \beta X \quad (2.12)$$

Segundo Aiba et al⁽⁶⁾, pode-se verificar dessa expressão que a velocidade de formação do produto está vinculada à concentração do microrganismo através de dois mecanismos distintos: a) formação de P associado ao crescimento ce

lular e b) formação de P não-associado ao crescimento celular. No primeiro caso, o substrato é convertido a um único produto P e a velocidade de formação do produto está relacionada com a velocidade de crescimento celular através de:

$$\frac{dP}{d\theta} = \alpha \frac{dX}{d\theta} \quad (2.12.a)$$

onde α é uma constante estequiométrica.

No segundo caso, a velocidade de formação do produto é dependente somente da concentração de microrganismo, isto é, as células microbianas possuem um sistema de enzimas constitutivas que controla a velocidade de formação do produto:

$$\frac{dP}{d\theta} = \beta X \quad (2.12.b)$$

onde β é uma constante de proporcionalidade similar à atividade enzimática.

Segundo Fredrickson⁽²⁾ a equação (2.11) proposta por Luedeking e Piret⁽⁷⁾, pode ser modificada para levar em conta o caso em que o produto é formado a partir de um substrato não limitante para o crescimento, e por um processo associado ao crescimento dos microrganismos que se utilizam de um substrato limitante.

A velocidade específica de formação de produto a partir do substrato não-limitante será simbolizada aqui por

μ_C . A equação (2.11) modificada levando-se em conta este as pecto pode ser escrita como:

$$\mu_P = \alpha\mu_X + \beta\mu_C \quad (2.12.c)$$

Kono e Asai^(*), estudando a cinética de crescimento celular e formação de produtos propuseram modelos para os seguintes tipos de processos fermentativos:

- a) formação de produto associado com crescimento e não-crescimento;
- b) formação de produto associado com crescimento;
- c) formação de produto associado com não-crescimento;
- d) formação de produto associado com crescimento e decréscimo da concentração do produto associado com não-crescimento.

As equações gerais para velocidade de crescimento e formação de produto foram assim expressas:

$$\frac{dX}{d\theta} = k_X \Phi X \quad (2.13)$$

$$\frac{dP}{d\theta} = k_{P_1} \Phi X + k_{P_2} (1 - \Phi) X \quad (2.14)$$

onde k_{P_1} e k_{P_2} são constantes da velocidade de formação, k_X é a constante da velocidade de crescimento e Φ representa um coeficiente aparente de atividade de crescimento.

Esse coeficiente possui os seguintes valores nas

várias fases de um processo de fermentação:

$$(I) \text{ Indução} \quad \Phi = 0 \quad (2.15)$$

$$(II) \text{ Transiente} \quad \Phi = \emptyset \quad (2.16)$$

$$(III) \text{ Crescimento Exponencial} \quad \Phi = 1 \quad (2.17)$$

$$(IV) \text{ Crescimento Constante} \quad \Phi = \frac{X_0}{X} \quad (2.18)$$

$$(V) \text{ Declínio} \quad \Phi = \frac{X_C}{X_M - X_C} \cdot \frac{X_M - X}{X} \quad (2.19)$$

onde na equação (2.16) Φ é um coeficiente de atividade de crescimento cujo valor aumenta, na fase transiente, de zero até a unidade.

O valor X_0 , da equação (2.18), representa a concentração de células no limite das fases exponencial e constante de crescimento.

Os valores X_C e X_M , da equação (2.19) representam respectivamente, concentrações de células no limite das fases de crescimento exponencial e de declínio e a concentração máxima de células alcançada no processo.

De acordo com o tipo de fermentação, os valores k_{P1} e k_{P2} assumem valores nulos, positivos ou negativos de acordo com a Tabela 2.1.

Quando se introduzem os valores do coeficiente aparente de crescimento, das equações (2.15), (2.16),

(2.17), (2.18) e (2.19) nas equações gerais de velocidade de crescimento celular e formação de produto, (2.13) e (2.14) e fazendo sua integração, obtem-se, segundo Kono e Asai⁽⁸⁾ as equações para crescimento celular e formação de produto em cada fase da fermentação. Os resultados estão resumidos na Tabela 2.2.

k_{P_1}	k_{P_2}	DESCRIÇÃO
+	+	Produto associado com crescimento e não-crescimento.
+	0	Produto associado com crescimento
0	+	Produto associado com não-crescimento
+	-	Produto associado com crescimento e decréscimo do produto com não-crescimento.

TABELA 2.1. - TIPOS DE PROCESSOS FERMENTATIVOS DE ACORDO COM OS VALORES DA CONSTANTE DA VELOCIDADE DE PRODUÇÃO, k_{P_1} E k_{P_2} .

FASE	CONCENTRAÇÃO CELULAR	CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO
I	$X = X_0$	
II	$X = X_0 + (X_L - X_0) \left(\frac{\theta - \theta_0}{\theta_L - \theta_0} \right)^2$	
III	$X = X_C \exp \left[k_X (\theta - \theta_C) \right]$	$P = -\frac{k_{P_I} X_C}{k_X} \left\{ 1 - \exp \left[k_X (\theta - \theta_C) \right] \right\} + P_C$
IV	$X = \left[1 + k_X (\theta - \theta_D) \right] X_D$	$P = \left\{ k_{P_I} (\theta - \theta_D) + \frac{1}{2} k_X k_{P_{II}} (\theta - \theta_D)^2 \right\} X_D + P_D$
V	$X = X_M - (X_M - X_C) \exp \left[-k_X \frac{X_C}{X_M - X_C} (\theta - \theta_C) \right]$	$P = \left(\frac{k_{P_I}}{k_X} - \frac{k_{P_{II}} X_M}{k_X X_C} \right) (X_M - X_C) \left\{ 1 - \exp -k_X \frac{X_C}{X_M - X_C} (\theta - \theta_C) \right\} + k_{P_{II}} X_M (\theta - \theta_C) + P_C$

TABELA 2.2. - EQUAÇÕES PARA CONCENTRAÇÃO CELULAR E FORMAÇÃO DE PRODUTO PARA CADA FASE DO CRESCIMENTO CELULAR.

2.2. Síntese de Lipídios por Microrganismos

2.2.1. Microrganismos Acumuladores de Lipídios

Vários microrganismos tem sido citados como importantes do ponto de vista de produção comercial de biomassa e lipídios. Revisões sobre este aspecto tem sido realizadas periodicamente^(9, 10).

A Tabela 2.3. mostra alguns microrganismos e respectivos conteúdo de lipídio e coeficiente de lipídio.

LEVEDURAS	CONTEÚDO DE LIPÍDIO (% massa seca)	COEFICIENTE DE LIPÍDIO (*)
<i>Candida 107</i>	41	20,0
<i>Lipomyces lipofer</i>	40	-
<i>Lipomyces starkeyi</i>	65	10,3
<i>Rhodotorula gracilis</i>	60-74	18-21,0
FUNGOS FILAMENTOSOS		
<i>Aspergillus ochraceus</i>	48	13,2
<i>Penicillium lilacium</i>	56	17,0
<i>Penicillium spinulosum</i>	64	16,1

(*) g de lipídio produzido/100g de substrato (usualmente gli
cose) utilizado.

TABELA 2.3.- MICRORGANISMOS ACUMULADORES DE LIPÍDIOS, SEGUN
DO WHITWORTH E RATLEDGE

A Tabela 2.4. mostra a composição dos lipídios de *Rhodotorula gracilis* encontrados na literatura.

Ref.	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C ₂₀	C _{21:0}
(17)	<1	22,0	2,0	46,0	15,0	5,0	-	8,0
(18)	1	31,4	9,3	53,5	<1	4,6	-	-
(9)	1,1	29,8*	8,8	40,1	11,2	4,8	2,4*	-

TABELA 2.4. - COMPOSIÇÃO DOS LIPÍDIOS EM PORCENTAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS DE *Rhodotorula gracilis*.

* Soma das porcentagens de ácidos graxos (C₁₆ e C₂₀) saturados e insaturados.

2.2.2. Mecanismo de Síntese de Lipídios

Segundo Whitworth e Ratledge⁽¹¹⁾, pouco se sabe a respeito da razão porque alguns microrganismos possuem essa capacidade de acumular lipídios em excesso.

A explicação mais veiculada é que provavelmente a ausência de algum ponto regulador do metabolismo possibili-

ta o sistema biológico a funcionar fora de controle e acumular na célula microbiana altas quantidades de lipídios.

Brady e Chambliss e Hofer et al, citados em 11, pesquisando algumas espécies de *Rhodotorula* verificaram que a enzima fosfofrutoquinase estava ausente em todas as espécies examinadas.

Hofer et al⁽¹²⁾, mais tarde, demonstraram que a via da pentose fosfato era o mecanismo predominante de assimilação de carboidrato nas leveduras que não possuíam fosfofrutoquinase (Anexo III).

Dessa maneira, segundo Ratledge e Whitworth⁽¹¹⁾, *Candida 107* e *Rhodotorula sp* alcançando uma situação fora de controle acumulam excesso de lipídios, pela ausência de fosfofrutoquinase, a qual, em outros microrganismos, é regulada por inibição retroativa através de ATP, citrato e fosfoenolpiruvato.

2.2.3. Cinética do acúmulo de lipídios por *Rhodotorula gracilis*.

Enebo et al⁽¹³⁾, cultivando *Rhodotorula gracilis* e Ratledge et al^(14,15 e 16), trabalhando com *Candida 107*, verificaram que os lipídios são sintetizados dentro das células microbianas, através de todo o processo fermentativo. Além disso, observaram que, para existir um excessivo acúmulo de lipídios é necessário que a fonte de nitrogênio tenha sido

esgotada do meio de cultura. Depois da exaustão do nitrogênio o microrganismo continua a consumir a fonte de carbono e a converte em lipídios.

O curso de um processo fermentativo em batelada onde açúcar é assimilado pelos microrganismos e é armazenado intracelularmente em forma de lipídio, foi representado pela Figura 2.1.

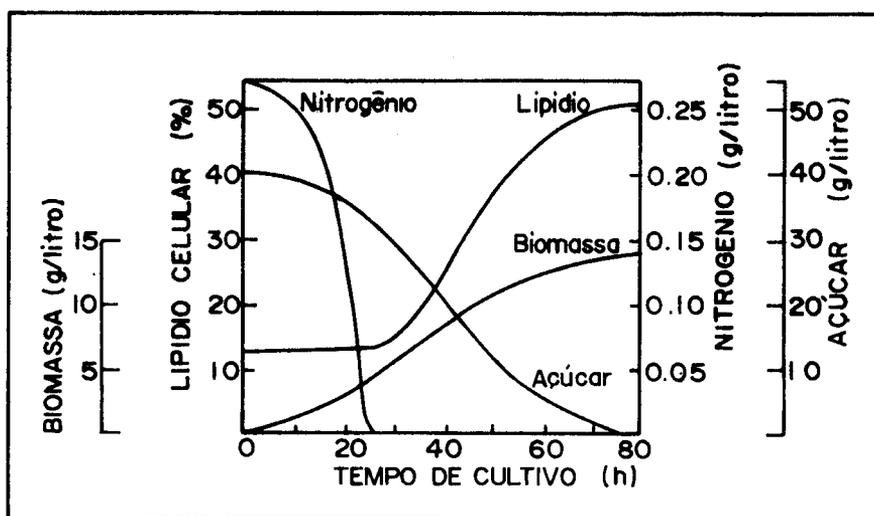


FIGURA 2.1. - EVOLUÇÃO DE UM CULTIVO DE *Rh. gracilis* COM ACÚMULO DE LIPÍDIO INTRACELULAR, SEGUNDO WHITWORTH et al⁽¹¹⁾.

Observa-se que enquanto existir nitrogênio no meio de cultura, as células acumulam um porcentagem em torno de 12% de lipídio na biomassa (base seca). Quando esse nutriente é esgotado, o açúcar continua a ser consumido e a por

centagem de lipídios nas células aumenta proeminentemente atingindo valores em torno de 50% de lipídios na biomassa (base seca).

Kessel⁽¹⁷⁾, cultivando *Rh.gracilis* e estudando o efeito de dois valores particulares de pH, 3,0 e 6,0, obtiveram resultados que estão representados nas Figuras 2.2. e 2.3.

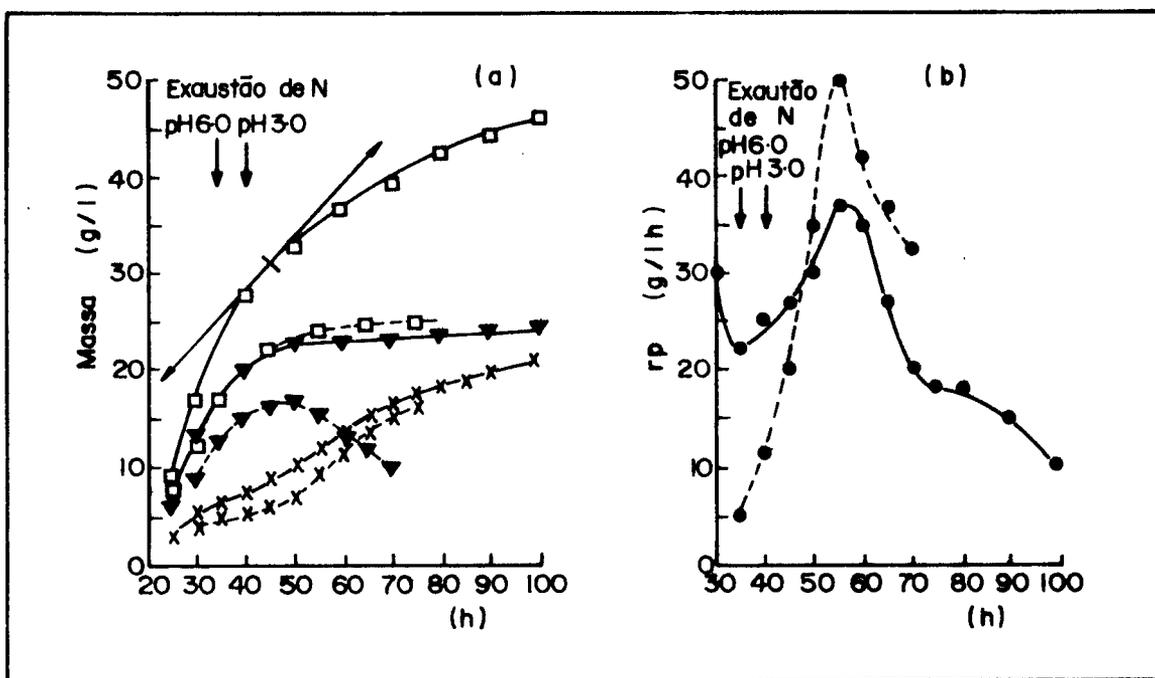


FIGURA 2.2.- EVOLUÇÃO DE UM CULTIVO DE *Rh.gracilis*. LINHAS INTERROMPIDAS, pH 3,0; LINHAS CHEIAS, pH 6,0; QUADRADOS, MASSA SECA TOTAL; TRIÂNGULOS, MASSA SECA DESENGORURADA; CRUZES, LIPÍDIO TOTAL, SEGUNDO KESSEL⁽¹⁷⁾.

FIGURA 2.3.-EVOLUÇÃO DA VELOCIDADE DE ACÚMULO DE LIPÍDIO DE UM CULTIVO DE *Rh. gracilis*: LINHAS INTERROMPIDAS, pH 3,0; LINHAS CHEIAS, pH 6,0, segundo KESSEL⁽¹¹⁾.

O autor observa na Figura 2.2. que, quando o nitrogênio amoniacal é exaurido do meio, a massa seca total desengordurada (massa seca total menos a massa de lipídio que ela contém), tende a um valor fixo para o pH 6,0 e decresce para o pH 3,0. Kessel conclui que a exaustão do nitrogênio do meio retarda eventualmente a síntese das proteínas e dos ácidos nucleicos,, e coloca que uma possível explicação para o comportamento diferenciado do sistema nos pH 3,0 e 6,0 seria que as células a pH 6,0 tem capacidade de manter um reaproveitamento de proteína depois do esgotamento do nitrogênio, enquanto que a pH 3,0, isto não acontece.

Também observou na Figura 2.3., que a pH 6,0, depois que o nitrogênio é esgotado do meio e a massa seca desengordurada permanece constante, a velocidade de produção do lipídio, que já vinha crescendo, aumenta mais rapidamente, acompanhada de um pequeno aumento da velocidade específica de produção de lipídio.

Subsequentemente, ambas as velocidades, começam a decrescer rapidamente devido, segundo Kessel, possivelmente à diminuição de atividade da porção não gordurosa das células ou o acúmulo de lipídios dentro das células ter alcançado um valor limite ou a esses dois fatores em conjunto.

A pH 3,0, a evolução das curvas de velocidade são semelhantes, observa-se, entretanto, que os valores das velocidades de produção de lipídios são bem maiores que

em pH 6,0.

Krumphanzl et al⁽¹⁸⁾ fazendo cultivos em batelada de *Rh gracilis* observaram que essa levedura representa um exemplo típico de uma fermentação em duas fases, onde o crescimento celular está não conectado com a produção de metabólitos intracelulares. Dessa maneira, na primeira fase, a fonte de nitrogênio é rapidamente utilizada para a síntese de proteínas, enquanto o conteúdo de lipídio aumenta vagarosamente. O segundo estágio é caracterizado por um decréscimo significativo no crescimento celular e intensiva formação de lipídios.

2.2.4. Tecnologia da Síntese de Lipídio e Biomassa por *Rhodotorula gracilis*

Dentre os vários microrganismos capazes de acumular lipídios intracelularmente, a levedura *Rhodotorula gracilis* tem sido a mais estudada devido a sua alta capacidade de armazenagem desses compostos quanto cultivada em meio de cultura que contenha concentrações de açúcares redutores da ordem de 3 a 4% e nitrogênio amoniacal limitante⁽⁹⁾.

Em 1943, Nilson et al⁽⁹⁾, cultivaram vários microrganismos em meio sólido e obtiveram os seguintes resultados, em porcentagem de lipídio na massa seca: *Candida pulcherrima* 16,3; *Lipomyces lipofer* 20,3; *Saccharomyces cerevisiae* 19,9; *Trichosporon pullulans* 29,3 e *Rhodotorula glutinis* 15,0%.

Essas leveduras também podiam crescer em cultura submersa com aeração tendo sido então obtidos os seguintes resultados, em porcentagem de lipídio na massa seca: *Candida pulcherrima* 5,0; *Lipomyces lipofer* 5,3 e *Rh. glutinis* 14,1%.

Em 1944, Enebo et al⁽⁹⁾ estudaram outras espécies de *Rhodotorula* em cultivo submerso e obtiveram 43% de lipídio na massa seca para *Rh. gracilis*, 33% para *Rh. suganii* e valores entre 12 e 25% para outras espécies.

Em 1946, Enebo, Anderson e Lundin⁽¹³⁾ observaram que, se os conteúdos de nitrogênio e fósforo do meio de cultura fossem reduzidos, a quantidade de lipídio de *Rh. gracilis* poderia ser consideravelmente aumentada. Nos cultivos em batelada realizados em um fermentador com 50 litros de capacidade, obtiveram-se resultados que variaram entre 50 e 60% de lipídio na massa seca com rendimentos de biomassa de 30 a 32% e coeficiente de lipídio de 16 a 18%. O meio de cultura utilizado compunha-se basicamente de sacarose invertida (4%), sulfato de amônia (0,1%), fosfato monoácido de potássio (0,1%), sulfato de magnésio (0,1%), cloreto de sódio (0,1%), cloreto de cálcio hexahidratado (0,05%), cloreto férrico hexahidratado (5ppm) e 25ml de mosto de cerveja a 20%. O pH inicial do substrato era ajustado a 4,5. Quando utilizaram um meio de cultura com relação 4:1 de açúcar para sulfato de amônia, a concentração de lipídio na massa seca foi de 9,35%.

Investigando a velocidade de respiração de *Rh. gracilis*, cultivada em vários carboidratos, para a produção de lipídios, Nielsen e Nilsson⁽¹⁹⁾, utilizando-se do método de Warburg, concluíram que, se a velocidade de respiração em relação a glicose fosse atribuído o valor 100, para outros carboidratos, os valores seriam os seguintes: levulose = 102, manose = 108, galactose = 64, sacarose = 72, maltose = 80, lactose = 0, arabinose = 21 e xilose = 29. Isso demonstrava que essa levedura poderia ser adaptada para crescer hidrolisados de madeira e, embora a xilose não fosse tão apropriada para seu crescimento, foram encontrados valores de rendimento de biomassa de 30 a 34% e coeficiente de lipídio de 7 a 9,5%.

O meio de cultura utilizado era semelhante ao de Enebo e colaboradores⁽¹³⁾, onde a sacarose invertida foi substituída por xilose e a fonte de nitrogênio por asparagina. O cultivo era realizado em agitador rotativo a 25 C por 4 a 7 dias.

Pan e Kolachov⁽²⁰⁾, estudaram a síntese de lipídio por *Rh. gracilis*, utilizando-se de melaço como fonte de carbono. Concluíram que quando eram adicionadas quantidades definidas de sulfato de amônia e fosfato diácido de potássio ao melaço, encontravam-se bons rendimentos de biomassa e coeficiente de lipídio.

Os resultados sugeriram a esses investigadores que

a concentração do sulfato de amônia no meio de cultura tem um efeito direto na síntese do lipídio, enquanto que o fosfato diácido de potássio, quando presente no meio, aumenta o efeito daquele sal na regulação da síntese do lipídio.

Blinç e Hocevar⁽⁹⁾ obtiveram altos valores de conteúdo de lipídio na biomassa (até 74%) e coeficiente de lipídio entre 16 e 21%, quando cultivaram *Rh. gracilis* utilizando-se como fonte de nitrogênio o ácido aspártico.

Husain e Hardin⁽²¹⁾ pesquisaram a influência de carboidratos e fontes de nitrogênio em leveduras que acumulam lipídios. As Tabelas 2.5. e 2.6. resumem os resultados encontrados para *Rh. gracilis*.

FORTE DE NITROGÊNIO	$Y_{X/S}$ (%)	CONTEÚDO DE LIPÍDIO NA BIOMASSA (%)	COEFICIENTE DE LIPÍDIO (%)
Sulfato de amônia	24.2	15.7	3.8
Asparagina	34.3	37.1	12.7
Ureia	29.6	34.9	10.3
Cloreto de amônia	18.6	33.8	6.3

TABELA 2.5.- EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA SÍNTESE DE LIPÍDIO POR *Rh. gracilis*, GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO, POR HUSAIN E HARDIN⁽²¹⁾.

FONTE DE CARBONO	$Y_{X/S}$ (%)	CONTEÚDO DE LIPÍDIO NA BIOMASSA (%)	COEFICIENTE DE LIPÍDIO (%)
Glicose	34.3	37.1	12.7
Sacarose	21.1	52.7	11.1
Maltose	2.5	8.6	0.2
Xilose	5.7	17.7	1.0
Arabinose	8.1	31.3	2.5

TABELA 2.6. - EFEITO DE DIFERENTES CARBOIDRATOS NA SÍNTESE DE LIPÍDIOS POR *Rh. gracilis*, ASPARAGINA COMO FONTE DE NITROGÊNIO, POR HUSAIN E HARDIN⁽²¹⁾.

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers com 200ml de meio que eram aerados continuamente por 72 horas a temperatura ambiente. Em todos os ensaios as concentrações das fontes de nitrogênio e carbono foram respectivamente 0,05% e 2,2%.

Steinberg e Ordal⁽²²⁾ pesquisaram a influência do pH e temperatura, entre outras variáveis, na velocidade de formação de lipídio por *Rh. gracilis*. Utilizando-se de um fermentador com controle automático de pH, esses pesquisadores expressaram o conteúdo de lipídios nas células como a razão da massa de lipídio na célula pela massa da porção

não gordurosa da célula e concluíram que esse parâmetro variava linearmente com o tempo. A velocidade de produção de lipídios variava linearmente com o pH (3,0 - 8,5) aumentando de 2,1 a 3,1g de lipídios por 100g de massa celular não gordurosa por hora. Quanto à temperatura, quando esta diminuía de 28 C para 22 C, a velocidade diminuía de 2,65 para 1,09g de lipídios por 100g de massa celular não gordurosa por hora.

Esses investigadores verificaram que glicose, frutose ou uma mistura de ambos os açúcares, não influenciaram a síntese de lipídios por *Rh. gracilis*.

Mais recentemente, Kessel⁽¹⁷⁾ estudando o efeito do pH na síntese de lipídio por *Rh. gracilis* fizeram observações representadas nas Figuras 2.2. e 2.3. e concluíram que os valores de pH do meio de cultivo tem uma influência direra no crescimento e síntese de lipídio por *Rh. gracilis*. Embora a evolução da velocidade de produção de lipídio para os pH 3,0 e 6,0 sejam diferentes, a concentração de lipídio no meio de cultura com 71 horas de cultivo é igual a 16 g/l tanto para pH 3,0 como para pH 6,0. Com esse tempo de fermentação os valores de massa seca total são 25 e 40g/l para os pH 3,0 e 6,0 respectivamente, dando uma porcentagem de lipídio na massa seca da ordem de 64 e 40%.

Os cultivos foram realizados em fermentador a 28 C, aeração de 1vvm e 1200rpm e o meio de cultura utilizado era o mesmo de Enebo et al⁽¹³⁾ com adição de ácido pantotênico

(3,3 ug/l) e tiamina (13,3 ug/l).

Krumphanzl et al⁽¹⁸⁾, estudando a produção de lipídios e biomassa por *Rh.gracilis*, em diferentes fontes de carbono, obtiveram resultados que estão apresentados na Tabela 2.7.

FONTE DE CARBONO	$Y_{X/S}$ (%)	COEFICIENTE DE LIPÍDIOS (%)	PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS (%)	MASSA SECA (g/l)
Glicose	26,7	17,1	66,4	10,64
Etanol Fermentativo	24,1	15,0	62,2	9,83
Etanol Sintético	23,8	13,9	60,0	9,71
n - Alcanos	-	-	32,2	4,96

TABELA 2.7. - COEFICIENTE DE LIPÍDIO E RENDIMENTO DE BIOMASSA ALCANÇADOS POR DIFERENTES FONTES DE CARBONO, POR KRUMPHANZL et al⁽¹⁸⁾.

Os cultivos foram realizados em um fermentador Chemap sob as seguintes condições: volume de trabalho do fermentador de 7,5 - 10,0 l; tempo de fermentação: 60 horas; temperatura entre 28 e 29 C; 1000rpm; vazão de ar de 8l/min e pH do meio de cultura entre 5,5 e 6,0.

O meio de cultura utilizado compunha-se de: fonte

de carbono (40g), KNO_3 (1,42g), $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (0,14g), K_2HPO_4 (0,33g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0g), água de maceração de milho (0,05g), água destilada até 1 litro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Microorganismo Utilizado*

Uma linhagem de *Rhodotorula gracilis* 68-259, da Universidade da Califórnia Davis (E.U.A.), fornecida pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas, foi empregada em todos os cultivos.

3.2. *Conservação das Culturas*

As culturas foram mantidas em meio composto de batata-dextrose-agar da DIFCO.

O meio era distribuído em tubos de ensaio (diâmetro 15mm comprimento 150mm) e esterilizado a 121 C por 30 minuto. Os tubos foram inclinados e esfriados até a temperatura ambiente. Os meios eram inoculados e incubados a 28 - 30 C durante 2 - 4 dias.

As culturas obtidas eram armazenadas em refrigerador à temperatura de 5-10 C, por um período máximo de 2 meses.

3.3. *Descrição dos Equipamentos Utilizados nos Cultivos*

3.3.1. *Agitador incubador rotativo*

Para o preparo de inóculos e ensaios de seleção de condições de cultura foi utilizado um agitador rotativo com as seguintes características:

Procedência: New Brunswick Scientific C.O., INC.

Denominação: Psycrotherm

Modelo: G - 27

Velocidade: 40 a 400rpm

Passo: 2,54cm

Temperatura: 0 a 60 C

3.3.2. Fermentador de laboratório de 20 l

Foi utilizada uma unidade de fermentação CHEMAP, modelo F-0020. O fermentador tem uma capacidade total de 20 litros, sendo operado com 10 litros de meio de cultura. Todas as partes em contacto com o meio de fermentação e reagentes são construídas em aço inoxidável 316L.

a) Características geométricas do tanque

O tanque tem diâmetro interno de $T = 0,240\text{m}$, sendo suas dimensões e relações geométricas (Anexo V), as seguintes:

$$D/T = 0,322; H_T/T = 2,03; H_L/T = 1,0;$$

$$H_1/T = 0,288; H_2/T = 0,625; H_A/T = 0,083;$$

$$W_b/T = 0,0825; L/D = 0,242; W/D = 0,309.$$

b) Sistema de agitação

O fermentador é montado com duas turbinas de disco de seis pás e quatro defletores. O eixo de agitação é montado no tanque mediante um selo 'Crane' inferior e uma bucha superior de teflon grafitado. Os agitadores são acionados por um motor de corrente contínua, com controle eletrônico

de velocidade, variável entre 100 e 1000 rpm.

c) Sistema de aeração

O ar é distribuído no fermentador mediante um anel com 15 orifícios, de 1,4mm de diâmetro, sendo esterilizado na entrada e saída do equipamento por filtros de porcelana porosa. A vazão foi determinada com um rotâmetro BROOKS, tipo 1355-10A-1BAB. A pressão do ar admitido ao sistema é controlada por uma válvula redutora de pressão.

d) Controle de temperatura

O elemento sensor é um termômetro de resistência de platina; o sistema de controle é com realimentação, marca HARTMANN-BRAUN, atuando sobre a admissão alternada de água de refrigeração e água aquecida por reostatos de imersão na camisa do tanque.

e) Controle de pH

O elemento sensor é um eletrodo de pH, combinado INGOLD, esterilizável, cuja leitura é amplificada por um amplificador de tensão METRHOM HERISAU modelo E450, acoplado a um controlador eletrônico de pulso METRHOM HERISAU modelo E-470.0 controlador opera uma bomba peristáltica HILOFLOW, da METERING PUMPS Ltd., de vazão ajustável, para dosagem de alcali.

3.3.3. Equipamentos Auxiliares

- Espectrofotômetro Baush & Lomb
modelo Spectronic 20
- Balanças de precisão Mettler:
P 160N (Máx. 160g, div. 1mg)
P 1000 (Max. 1000g, div. 1g)
- Esterilizador Fabbe
modelo 104, nº 1173 (pressão máxima 3 kg/cm)
- Autoclave Wisconsin Aluminium Foundry C.O., Inc.
modelo Stereoclave nº 25
- Centrífuga Excelsa da FANEN
(0 - 5000rpm) modelo 204N
- Estufa para secagem

3.4. Meio de Cultura Utilizado

No preparo do inóculo e nos ensaios efetuados foi utilizado o meio de cultura com a seguinte composição:

Glicose P.A.	40,0g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0g
KH_2PO_4	1,0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0g
NaCl	1,0g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,5g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,005g
extrato de levedura	1,5g
água destilada	1000 ml

O valor do pH é ajustado a 5,0 antes da esterilização.

3.5. Procedimento Experimental

3.5.1. Preparo do inóculo

O inóculo era preparado transferindo-se para o meio de cultura líquido com o auxílio de alça metálica, e em condições assépticas, uma alça metálica de microrganismos cultivados em tubo de ensaio contendo o meio sólido descrito em 3.2.

Cada frasco de 500ml continha 50ml do meio de cultura previamente esterilizado a 121 C por 15 minutos.

Os frascos inoculados eram colocados no agitador rotativo e incubados por 24 horas, a 29 ± 1 C e 220rpm.

3.5.2. Metodologia dos cultivos

Dentro do fermentador eram colocados 10 litros do meio de cultura descrito em 3.4. Por circulação de vapor saturado na camisa do vaso de fermentação, o meio de cultura era aquecido até 121 C e mantido por 20 minutos a essa temperatura enquanto continuamente agitado a 150rpm.

O resfriamento realizou-se através de circulação de água fria pelo camisa do vaso de fermentação, após o que as condições de fermentação eram ajustadas: temperatura de 29 C, pH 5,0, agitação de 500 rpm e aeração de 1vvm.

Um volume de 200ml da suspensão celular com 24h de cultivo, obtida como descrita no item 3.5.1., era então transferido assepticamente para o fermentador.

As amostras para realização das análises eram retiradas periodicamente através de um tubo especial para esse fim.

3.6. Métodos Analíticos

3.6.1. Massa seca total

Uma amostra de 30ml era retirada do fermentador e colocada em tubo de centrífuga previamente seco e tarado.

Procedia-se a centrifugação da amostra por 15 minutos a 3000rpm.

O sobrenadante era separado do creme e utilizado para outras análises.

O tubo de centrífuga mais o creme era colocado em estufa à vácuo e secado a 60 C e 60mmHg mmHg até peso constante.

A massa seca total era então determinada por diferença de peso do tubo mais a massa seca menos o peso do tubo vazio.

3.6.2. Lipídio total

Esse método foi adaptado ao método de Fales⁽²³⁾ para determinação do lipídio total fecal.

3.6.2.a. Metodologia da análise

Uma amostra de 10ml de meio fermentado era colocado em tubo autoclavável (comprimento 110 mm; diâmetro 30 mm) dotado de tampa rosqueada, adicionando-se 0,5ml de HCl concentrado.

O conjunto era então autoclavado por 30 minutos a 121 C para possibilitar a ruptura das células.

Depois de resfriado, era adicionado ao tubo, 20 ml de éter de petróleo mais 5ml de uma solução alcóolica a 95% em volume de álcool etílico.

O tubo era então fechado e para prevenir a evaporação dos solventes, uma fita de Teflon era colocada entre a abertura do tubo e sua tampa.

O tubo era fixado horizontalmente no agitador rotativo e a extração se processava por 3 horas, 350rpm e 10 ± 1 C.

Imediatamente após a extração de 1 a 5ml do extrato era pipetado e colocado em um becker de 50ml de volume nominal.

O solvente era então evaporado em banho maria a 65 C por 30 minutos.

Ao resíduo fixo era adicionado 2ml de uma solução de $K_2Cr_2O_7$ a 4,9% em peso e 4ml de H_2SO_4 concentrado.

O conjunto era levado para estufa a 115 C por 30

minutos e depois de esfriado por aproximadamente 3 minutos, adicionava-se 2ml de água destilada.

A solução era convenientemente diluída e sua absorvância era lida a 600nm em espectrofotômetro.

O branco para calibração do espectrofotômetro era obtido como descrito no item 3.6.2.b.

O cálculo do lípídio total era feito utilizando-se de uma curva de calibração previamente determinada.

3.6.2.b. Procedimento para levantamento da curva de calibração.

Adicionou-se um volume de 250ml de éter etílico a 100mg de ácido oleico de modo a constituir-se em uma solução padrão.

Colocou-se em beakers de 50ml de volume normal, os seguintes volumes da solução padrão; 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0ml.

O solvente foi então evaporado em banho maria a 65 C.

Adicionou-se ao resíduo fixo 2ml de uma solução de $K_2Cr_2O_7$ a 4,9% em peso e 4ml de H_2SO_4 concentrado.

Levou-se o conjunto a estufa a 115 C por 30 minutos.

Deixou-se esfriar por 3 minutos e adicionou-se 2ml de água destilada.

A absorvância foi então lida a 600nm em espectrofotômetro.

O branco para calibração do espectrofotômetro era constituído da adição 0,0 da solução padrão.

Os resultados e a curva de calibração está apresentada no Anexo I.

3.6.3. Massa seca desengordurada

A massa seca desengordurada era obtida subtraindo-se da massa seca total o valor correspondente do lípido total.

3.6.4. Açúcar redutor

O açúcar redutor foi determinado segundo o método do reagente DNS (ácido dinitrossalicílico) ⁽²⁴⁾.

A curva de calibração utilizada nesse método está no Anexo II.

3.6.5. Nitrogênio Amoniacal

O nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método de Kjeldahl.

Não se fazia, entretanto, a digestão prévia, procedendo-se diretamente a destilação por arraste de um volume conhecido do sobrenadante do centrifugado do item 3.6.1.

3.7. Métodos Matemáticos Utilizados

3.7.1. Crescimento celular

A velocidade de variação da concentração de massa seca desengordurada $r_{\bar{X}}$, foi definida como parâmetro para expressar a velocidade de crescimento celular.

Podemos escrever então, que:

$$r_{\bar{X}} = \frac{d\bar{X}}{d\theta} \quad (3.1)$$

Foi utilizada a cinética proposta por Kono e Asai⁽⁸⁾ supondo-se que o crescimento celular se dá em tres fases distintas: fase transiente, fase exponencial e fase de declínio. Para cada fase obtem-se uma equação que descreve a variação da massa seca desengordurada com o tempo. As equações são as seguintes:

a) fase transiente

$$\bar{X} = \bar{X}_0 + (\bar{X}_L - \bar{X}_0) \left(\frac{\theta - \theta_0}{\theta_L - \theta_0} \right)^2 \quad \text{p/ } \theta_0 \leq \theta \leq \theta_L \quad (3.2)$$

b) fase exponencial

$$\bar{X} = \bar{X}_C \exp \left[k_{\bar{X}} (\theta - \theta_C) \right] \quad \text{p/ } \theta_L \leq \theta \leq \theta_C \quad (3.3)$$

c) fase de declínio

$$\bar{X} = \bar{X}_M - (\bar{X}_M - \bar{X}_C) \exp \left[-k_{\bar{X}} \frac{\bar{X}_C}{\bar{X}_M - \bar{X}_C} (\theta - \theta_C) \right] \quad (3.4)$$

p/ $\theta \geq \theta_C$

3.7.2. Estimativa dos parâmetros \bar{X}_0 , \bar{X}_L , \bar{X}_M , θ_0 , θ_L , θ_C e $k_{\bar{X}}$

A estimativa dos parâmetros \bar{X}_0 , \bar{X}_L , \bar{X}_C , \bar{X}_M , θ_0 , θ_L , θ_C e $k_{\bar{X}}$ foi feita da seguinte maneira:

a) Locou-se, em papel milimetrado, os pontos experimentais obtidos da evolução com o tempo da concentração da massa seca desengordurada;

b) Plotou-se uma curva média pelos pontos assim plotados;

c) Traçou-se tangentes pela curva obtida e determinou-se graficamente, as derivadas $d\bar{X}/d\theta$ em intervalos de tempo ;

d) Plotou-se em papel milimetrado, em abscissas o valor de \bar{X} e em ordenadas o valor correspondente da derivada $d\bar{X}/d\theta$.

e) Curvas típicas obtidas através desse procedimento estão representadas nas Figuras 3.1. e 3.2.

Através da curva da Figura 3.2. são obtidos os valores de \bar{X}_0 , \bar{X}_L , \bar{X}_C e \bar{X}_M . O valor de $k_{\bar{X}}$ é dado pela tangente da reta OP.

De posse desses dados e através da curva da Figura 3.1. foram determinados valores dos parâmetros θ_0 , θ_L e θ_C , tempos correspondentes às concentrações \bar{X}_0 , \bar{X}_L , \bar{X}_C e \bar{X}_M , ob-

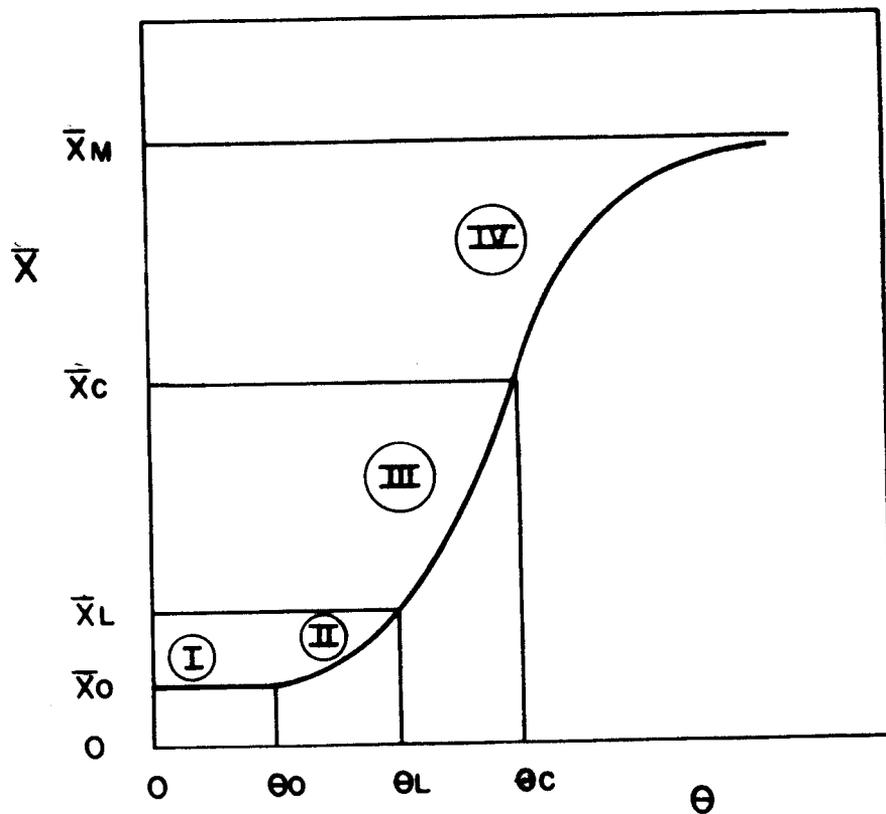


FIGURA 3.1. - CURVA CARACTERÍSTICA OBTI-
DA DO PROCEDIMENTO 3.7.2.b

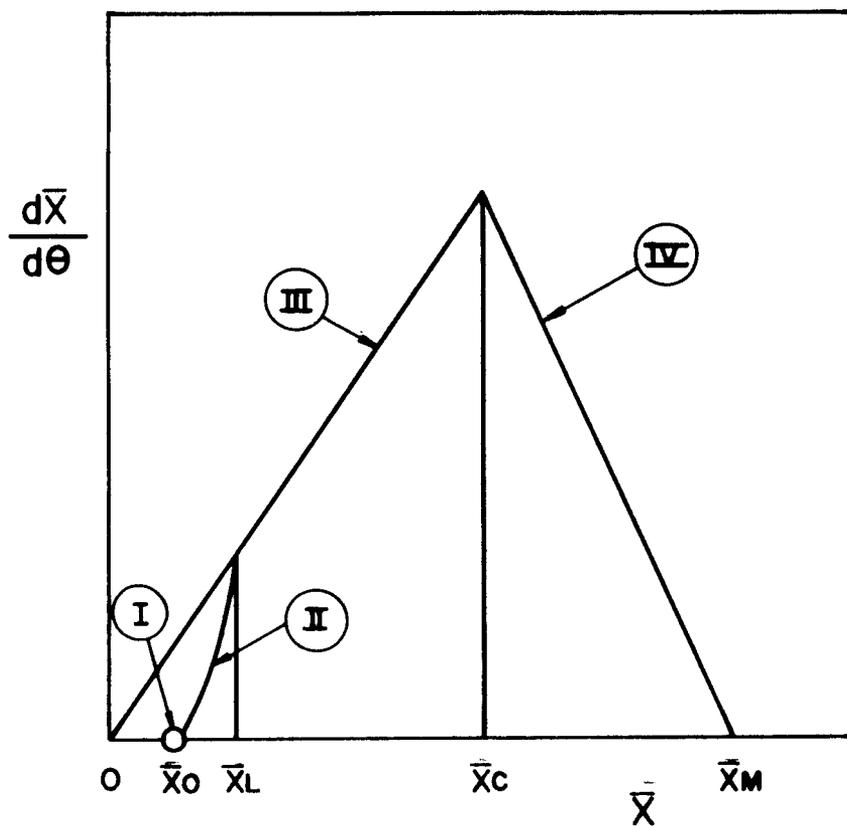


FIGURA 3.2. - CURVA CARACTERÍSTICA OBTI-
DA DO PROCEDIMENTO 3.7.2.d

tidas anteriormente.

3.7.3. Consumo de nitrogênio amoniacal

Foi expressa a concentração de nitrogênio amoniacal em gramas de sulfato de amônia por litro de meio de cultura.

Definiu-se a velocidade de variação da concentração do nitrogênio amoniacal com o tempo, r_N . Pode-se escrever então que:

$$r_N = -\frac{dN}{d\theta} \quad (3.5)$$

Se o consumo do nitrogênio amoniacal está relacionado com o crescimento celular pode-se escrever então uma relação entre as velocidades de consumo do nitrogênio amoniacal e de crescimento celular, assim:

$$\frac{dN}{d\theta} = -\frac{1}{\beta_c} \frac{d\bar{X}}{d\theta} \quad (3.6)$$

onde β_c é o fator de conversão substrato-microrganismo análogo a $Y_{\bar{X}/S}$ definido na equação (2.9).

Como o crescimento celular se dá em três fases distintas, pode-se escrever a equação (3.6) para cada uma das fases do cultivo.

a) fase transiente

$$\left. \frac{dN}{d\theta} \right|_{\text{trans.}} = -\frac{1}{\beta} \left. \frac{d\bar{X}}{d\theta} \right|_{\text{trans.}} \quad (3.7.a)$$

b) fase exponencial

$$\left. \frac{dN}{d\theta} \right|_{\text{exp.}} = - \frac{1}{\beta} \left. \frac{d\bar{X}}{d\theta} \right|_{\text{exp.}} \quad (3.7.b)$$

c) fase de declínio

$$\left. \frac{dN}{d\theta} \right|_{\text{decl.}} = - \frac{1}{\beta} \left. \frac{d\bar{X}}{d\theta} \right|_{\text{decl.}} \quad (3.7.c)$$

As equações que representam a evolução da concentração do nitrogênio amoniacal com o tempo, podem ser então obtidas.

a) fase transiente

Derivando-se a equação (3.2), tem-se:

$$\left. \frac{d\bar{X}}{d\theta} \right|_{\text{trans.}} = 2(\bar{X}_L - \bar{X}_0) \quad (3.8)$$

Substituindo-se a equação (3.8) na equação (3.7.a) e procedendo-se a integração, utilizando-se da condição inicial que $N = N_0$ para $\theta = \theta_0$ vem:

$$N = N_0 - \frac{\bar{X}_L - \bar{X}_0}{\beta_{\text{trans.}}} \left(\frac{\theta - \theta_0}{\theta_L - \theta} \right)^2 \quad \text{p/} \quad \theta_0 < \theta < \theta_L \quad (3.9)$$

b) fase exponencial

Derivando-se a equação (3.3) vem:

$$\left. \frac{d\bar{X}}{d\theta} \right|_{\text{exp.}} = \bar{X}_C k_{\bar{X}} \exp \left[k_{\bar{X}} (\theta - \theta_0) \right] \quad (3.10)$$

Substituindo-se a equação (3.10) na equação (3.7.b) e procedendo-se a integração, utilizando-se da condição inicial que $N = N_L$ para $\theta = \theta_L$, vem:

$$N = N_L + \frac{\bar{X}_C}{\beta_{\text{exp.}}} \left\{ \exp \left[k_{\bar{X}} (\theta_L - \theta_C) \right] - \exp k_{\bar{X}} (\theta - \theta_C) \right\}$$

p/ $\theta_L \leq \theta \leq \theta_C$ (3.11)

c) fase de declínio

Derivando-se a equação (3.4) vem:

$$\frac{dX}{d\theta} \Big|_{\text{decl.}} = k_{\bar{X}} \bar{X}_C \exp. \left[- k_{\bar{X}} \frac{\bar{X}_C}{\bar{X}_M - \bar{X}_C} (\theta - \theta_C) \right] \quad (3.12)$$

Substituindo-se a equação (3.12) na equação (3.7.c) e procedendo-se a integração, utilizando-se da condição inicial que $N = N_C$ para $\theta = \theta_C$, vem:

$$N = N_C + \frac{\bar{X}_M - \bar{X}_C}{\beta_{\text{decl.}}} \left\{ \exp \left[- k_{\bar{X}} \frac{\bar{X}_C}{\bar{X}_M - \bar{X}_C} (\theta - \theta_C) \right]^{-1} \right\}$$

p/ $\theta \geq \theta_C$ (3.13)

3.7.4. Estimativa dos parâmetros $\beta_{\text{trans.}}$, $\beta_{\text{exp.}}$, $\beta_{\text{decl.}}$, N_0 , N_L e N_C .

A estimativa dos parâmetros $\beta_{\text{trans.}}$, $\beta_{\text{exp.}}$ e $\beta_{\text{decl.}}$ foi feita da seguinte maneira:

a) Procedeu-se analogamente ao apresentado em a), b) e c) do item 3.1.2., utilizando-se, porém, as concentrações

de nitrogênio amoniacal expressas em gramas de sulfato de amônia por litro de meio de cultura;

b) Plotou-se em abscissa os valores de $dN/d\theta$ assim obtidos e em ordenadas os correspondentes valores de $d\bar{X}/d\theta$ obtidos em 3.1.2.;

c) Ajustaram-se, por um procedimento estatístico, as melhores retas que passaram pelos pares de valores ($dN/d\theta$; $d\bar{X}/d\theta$) para cada fase do crescimento celular. Os coeficientes angulares das retas obtidas serão os valores desejados de $\beta_{trans.}$, $\beta_{exp.}$ e $\beta_{decl.}$.

d) Os valores de N_0 , N_L e N_C foram retirados da curva obtida com o procedimento em a), utilizando-se dos parâmetros θ_0 , θ_L e θ_C já obtidos anteriormente (vide item 3.7.2.).

3.7.5. Acúmulo de lipídios

A velocidade da variação da concentração de lipídios acumulados intracelularmente com o tempo é dada por r_p . Pode-se escrever então que:

$$r_p = \frac{dP}{d\theta} \quad (3.14)$$

Partiu-se da hipótese que o acúmulo de lipídio se dá em duas fases distintas. Na fase I supõe-se um mecanismo que é associado ao crescimento celular. Sendo assim, pode-se escrever uma expressão análoga à equação

(2.12.a.) .

$$\frac{dP}{d\theta} = k_{P_1} \frac{d\bar{X}}{d\theta} \quad (3.15)$$

onde k_{P_1} é uma constante estequiométrica de conversão de parte do substrato ao lipídio acumulado análogo a α definida na equação (2.12.a).

Para cada fase do crescimento celular, pode-se escrever uma equação análoga a equação (3.15):

$$\left. \frac{dP}{d\theta} \right|_{\text{trans.}} = k_{P_1} \left. \frac{d\bar{X}}{d\theta} \right|_{\text{trans.}} \quad (3.16.a)$$

$$\left. \frac{dP}{d\theta} \right|_{\text{exp.}} = k_{P_1} \left. \frac{d\bar{X}}{d\theta} \right|_{\text{exp.}} \quad (3.16.b)$$

$$\left. \frac{dP}{d\theta} \right|_{\text{decl.}} = k_{P_1} \left. \frac{d\bar{X}}{d\theta} \right|_{\text{decl.}} \quad (3.16.c)$$

As equações que representam a evolução da concentração do lipídio acumulado com o tempo podem ser então obtidas:

a) fase transiente

Combinando-se a equação (3.8) com a equação (3.16.a),

vem:

$$\left. \frac{dP}{d\theta} \right|_{\text{trans.}} = k_{P_1} 2(\bar{X}_L - \bar{X}_0) \quad (3.17)$$

Integrando-se a expressão acima, utilizando-se da condição inicial $P = P_0$ para $\theta = \theta_0$, vem:

$$P = P_0 + (\bar{X}_L - \bar{X}_0) k_{P_I} \left(\frac{\theta - \theta_0}{\theta_L - \theta_0} \right)^2 \quad p / \theta_0 \leq \theta \leq \theta_L \quad (3.18)$$

b) fase exponencial

Combinando-se a equação (3.10) com a equação (3.16.b) vem:

$$\left. \frac{dP}{d\theta} \right|_{\text{exp.}} = k_{P_I} \bar{X}_C k_{\bar{X}} \exp. \left[k_{\bar{X}} (\theta - \theta_C) \right] \quad (3.19)$$

Integrando-se a expressão acima utilizando-se da condição inicial $P = P_L$ para $\theta = \theta_L$, vem:

$$P = P_L + \bar{X}_C k_{P_I} \left\{ \exp. \left[k_{\bar{X}} (\theta - \theta_C) \right] - \exp. \left[k_{\bar{X}} (\theta_L - \theta_C) \right] \right\} \quad p / \theta_L \leq \theta \leq \theta_C \quad (3.20)$$

c) fase de declínio

Combinando-se a equação (3.12) com a equação (3.16.c) vem:

$$\left. \frac{dP}{d\theta} \right|_{\text{decl.}} = k_{P_I} \bar{X}_C k_{\bar{X}} \exp. \left[- k_{\bar{X}} \frac{\bar{X}_C}{\bar{X}_M - \bar{X}_C} (\theta - \theta_C) \right] \quad (3.21)$$

Integrando-se a expressão acima, utilizando-se da condição inicial $P = P_C$ para $\theta = \theta_C$, vem:

$$P = P_C + k_{P_I} (\bar{X}_M - \bar{X}_C) \left\{ 1 - \exp \left[- k_{\bar{X}} \frac{\bar{X}_C}{\bar{X}_M - \bar{X}_C} (\theta - \theta_C) \right] \right\}; \quad p / \theta_C \leq \theta \leq \theta_* \quad (3.22)$$

onde θ_* é o tempo de esgotamento do nitrogênio amoniacal.

Na fase II é suposto que o microrganismo acumula lipídio por um mecanismo que não é associado ao crescimento celular e, sendo assim, pode-se escrever uma expressão análoga à equação (2.12.b):

$$\frac{dP}{d\theta} = k_{P_{II}} \bar{X} \quad (3.23)$$

onde a constante $k_{P_{II}}$ é a atividade do complexo enzimático que faz a conversão açúcar-lipídio.

Supõe-se que a atividade $k_{P_{II}}$ possui um valor de atividade enzimática decrescente com o tempo, segundo a equação abaixo:

$$k_{P_{II}} = k_0 \exp(-\tau\theta) \quad (3.24)$$

Essa fase ocorre depois de esgotado o nitrogênio amoniacal do meio de cultura. Então, o microrganismo deve estar na sua fase de declínio.

Assim sendo, substituindo-se as equações (3.4) e (3.24) na equação (3.23), temos que:

$$\frac{dP}{d\theta} = k_0 \exp(\tau\theta) \left\{ \bar{X}_M - (\bar{X}_M - \bar{X}_C) \exp \left[-k_{\bar{X}} \frac{\bar{X}_C}{\bar{X}_M - \bar{X}_C} (\theta - \theta_C) \right] \right\} \quad (3.25)$$

Definindo uma condição inicial onde $P = P_*$ para $\theta = \theta_*$ e integrando a equação anterior utilizando-se dessa condição:

$$P = P_* + \frac{\bar{X}_M k_0}{\tau} \left[\exp(\tau\theta) - \exp(\tau\theta_*) \right] + \frac{(\bar{X}_M - \bar{X}_C) k_0}{(-k_{\bar{X}} \bar{X}_C / (\bar{X}_M - \bar{X}_C) + \tau)} \left\{ \exp \left[-\frac{k_{\bar{X}} \bar{X}_C}{\bar{X}_M - \bar{X}_C} (\theta_* - \theta_C) + \tau\theta_* \right] - \exp \left[-\frac{k_{\bar{X}} \bar{X}_C}{\bar{X}_M - \bar{X}_C} (\theta - \theta_C) + \tau\theta \right] \right\} \quad p/ \quad \theta \geq \theta_* \quad (3.26)$$

3.7.6. Estimativa dos parâmetros k_0 , τ , k_{P_1} , P_0 , P_L , P_C , P_* e θ_*

A estimativa dos parâmetros k_0 e τ foi feita ajustando-se estatisticamente a melhor curva da forma da equação (3.24) que passa pelos pares de valores $((dP/d\theta)/X; \theta)$;

A estimativa do parâmetro k_{P_1} foi feita ajustando-se estatisticamente a melhor curva que passa pelos pares de valores $(dP/d\theta; dX/d\theta)$.

A inclinação $dP/d\theta$ foi calculada graficamente segundo procedimento análogo a a), b) e c) do item 3.1.2.

Os parâmetros P_0 , P_L , P_C , P_* e θ_0 são constantes experimentais retiradas da curva média da evolução da concentração de acúmulo de lipídios com o tempo. As concentrações P_0 , P_L , P_C e P_* são concentrações que correspondem, respectivamente, aos tempos θ_0 , θ_L , θ_C e θ_* .

3.7.7. *Rendimento lipídio acumulado-açúcar consumido*

Definiu-se um rendimento de lipídio acumulado açúcar consumido segundo a equação abaixo:

$$Y_{P/S} = - \frac{dP/d\theta}{dS/d\theta} \quad (3.27)$$

A inclinação $dS/d\theta$ foi calculada graficamente segundo procedimento análogo a a), b) e c) do item 3.1.2.

3355

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresentamos a seguir os resultados obtidos e os cálculos a partir dos mesmos.

Nos quadros 4.1 e 4.2 apresentam-se os resultados das evoluções das concentrações de X , \bar{X} , P , S e N .

O quadro 4.3 apresenta os valores de $d\bar{X}/d\theta$, $dN/d\theta$, $dS/d\theta$, $dP/d\theta$ e $(dP/d\theta)/\bar{X}$ utilizados para os cálculos dos parâmetros cinéticos.

As Figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4 representam as curvas melhor ajustadas estatisticamente de onde foram obtidos os valores numéricos dos parâmetros cinéticos.

O quadro 4.4 resume os valores dos parâmetros cinéticos encontrados.

Os quadros 4.5 e 4.6 apresentam as equações resultantes das equações (3.2), (3.3), (3.4), (3.9), (3.11), (3.12), (3.18), (3.20), (3.22) e (3.26) quando nelas são introduzidos os valores encontrados dos parâmetros cinéticos.

As Figuras 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 apresentam a evolução com o tempo das concentrações \bar{X} , N e P . As curvas sólidas representam as equações dos quadros 4.5 e 4.6. Os pontos experimentais estão apresentados por círculos (ensaio nº 1) e triângulos (ensaio nº 2).

A Figura 4.9 representa a evolução com o tempo da concentração de glicose. A curva sólida representa a melhor curva ajustada manualmente aos dados experimentais.

As Figuras 4.10 e 4.11 representam a variação de r_p e $Y_{p/S}$ com o tempo.

4.1. Crescimento Celular

Inicialmente é necessário tecer algumas considerações sobre o substrato limitante de crescimento celular.

Usualmente o substrato limitante das fermentações é a fonte de carbono.

Entretanto, neste caso, uma comparação entre as Figuras 4.7 e 4.11 indica que a glicose parece não ser o substrato limitante desse processo fermentativo já que, enquanto o crescimento celular diminui bruscamente a partir das 7 horas e tende a zero por volta de 30 horas, a velocidade de consumo da glicose nesse intervalo de tempo se mantém a um valor praticamente constante.

Por outro lado, uma comparação entre as Figuras 4.7 e 4.8 sugere um comportamento inverso: o crescimento celular está de alguma forma relacionado com o consumo do sulfato de amônia. Esse fato sugere que esta substância é o substrato limitante do crescimento celular nesse processo fermentativo.

Os resultados apresentados pela Figura 4.7 sugerem que a cinética de crescimento celular proposta por Kono e Asai⁽⁸⁾ descreve com boa aproximação a evolução da concentração de microrganismos.

Distinguem-se três fases distintas de crescimento celular, a saber: a) transiente (0 - 3,5 horas); b) exponencial

(3,5 - 7,25 horas) e c) declínio ($> 7,25$ horas). Não foi observada a fase linear de crescimento logo após a fase exponencial encontrada por Kessel⁽¹⁷⁾, cultivando em condições de cultivo semelhantes (pH = 6,0, 28 C, oxigênio dissolvido não limitante).

Qualquer afirmação de sua existência deve ser precedida de maior coleta de dados experimentais na faixa de 8 a 16 horas de cultivo.

A fase de declínio do crescimento celular começa antes que o nitrogênio amoniacal se esgote do meio sugerindo que concentrações de sulfato de amônia por volta de 0,5 g/l aliadas a fonte de energia abundante (aproximadamente 30 g/l de açúcar) induzem a entrada do microrganismo nessa fase de crescimento celular.

Dessa maneira, os resultados obtidos estão de acordo com observações já feitas por outros investigadores⁽⁹⁾ (13), (17) onde se constata que a exhaustão do nitrogênio amoniacal do meio de cultivo implica numa diminuição do crescimento celular e até mesmo no seu completo bloqueio.

Pela Figura 4.7 parece claro que o crescimento celular sofre uma diminuição na sua taxa de crescimento a partir de 7,25 horas e tende a um valor zero por volta de 30 horas, quando alcança uma concentração máxima de massa seca desengordurada de 6,0 g/l aproximadamente.

Esse máximo valor atingido se mantém praticamente

constante até o fim do experimento como pode ser observado nos quadros 4.1 e 4.2, corroborando os experimentos de Kessel⁽¹⁷⁾ onde se conclui que a pH 6,0 a concentração da mas sa seca desengordurada se matêm constante.

4.2. Consumo de Nitrogênio Amoniacal

Como pode ser observado pela Figura 4.6, a equação (4.6) proposta e inserida na cinética do crescimento celular de Kono e Asai⁽⁸⁾, ajustou-se satisfatoriamente aos pontos experimentais nas fases transiente e exponencial. Es se ajuste do modelo proposto suporta a hipótese feita que o crescimento celular tem como substrato limitante o nitrogênio amoniacal.

Na fase de declínio (>7,25h) nota-se um comporta mento discrepante da curva teórica em relação aos resultados experimentais, observando-se numa previsão do esgotamento de sulfato de amônia a 8,25h enquanto que experimentalmente is so se dá a 11,00h.

4.3. Acúmulo de Lipídio

De acordo com vários investigadores^(8, 13, 18 e 22) *Rhodotorula gracilis* possui duas fases distintas de acúmulo de lipídio intracelular.

Na primeira fase o microrganismo se multiplica às custas de um pouco do açúcar e todo o nitrogênio amoniacal e outras substâncias do meio de cultura, acumulando uma por-

centagem de lipídios praticamente constante.

Na segunda fase é que se dá o real acúmulo de lipídios. O nitrogênio amoniacal se esgota do meio de cultura o crescimento celular diminui e até mesmo cessa enquanto que o açúcar em excesso no meio de cultura é convertido em lipídio intracelular.

A cinética do acúmulo de lipídio foi analisada levando-se em consideração esses fatos. Assim, propoz-se um mecanismo de síntese de lipídio que previa duas fases para o processo: fase I, onde o acúmulo de lipídio é associado ao crescimento celular descrita pela equação (3.15); fase II, onde o acúmulo de lipídio não é associado ao crescimento celular, descrita pela equação (3.23).

Analisados os dados experimentais, verificou-se que o acúmulo de lipídios apresentou duas fases distintas.

Na fase I, o acúmulo de lipídio estava associado com o crescimento celular e assim conectado com as tres fases do crescimento celular. Dessa maneira, a evolução da concentração de lipídio acumulado apresentou, dentro da fase I, tres fases distintas: fase transiente ($0 \leq t \leq 3,50h$); fase exponencial ($3,50h \leq t \leq 7,25h$) e fase de declínio ($7,25h \leq t \leq 11,00h$). A variação da concentração de lipídio nessas tres fases pode ser descrita pelas equações (4.7), (4.8) e (4.9) do quadro 4.6, como pode ser observado pela Figura 4.9.

O final da fase I coincide com o tempo de esgotamento do sulfato de amônia do meio de cultura.

Na fase II, o acúmulo de lipídio apresentou um mecanismo não associado ao crescimento celular e variação da concentração de lipídio descrita pela equação (4.10) do quadro 4.6, como pode ser observado pela Figura 4.8.

A constante k_{pII} , coeficiente da equação (3.23) análoga a α da equação (2.12.b) que segundo Aiba et al⁽⁶⁾ é similar à atividade enzimática, apresentou um decréscimo exponencial com o tempo, como pode ser observado pela Figura 4.3.

Uma plotagem contra o tempo θ da velocidade de acúmulo de lipídio r_p , que é igual a $dP/d\theta$ segundo a equação (3.14), está representada na Figura 4.10. Como pode ser observado existe um aumento de r_p de 0,075 g/lh para 0,160 g/lh entre 10 e 11 horas.

Quanto ao rendimento em lipídio, $Y_{p/S}$ (Figura 4.11), verificou-se que ele possui uma tendência de diminuição com o tempo em toda a fase I, possivelmente pelo fato do microrganismo utilizar-se de parte da glicose para sua manutenção.

Quando a fonte de nitrogênio amoniacal se esgota do meio de cultura, o rendimento em lipídio, $Y_{p/S}$, aumenta de um valor de 0,050 g lipídio/g de glicose, às 11,00 horas, até 0,187 g de lipídio/g de glicose, entre 17 e 19 horas. De-

pois de atingido esse valor máximo, o rendimento decresce com o tempo até o final do processo como mostra a Figura 4.11.

Esses resultados estão próximos aos obtidos por Allen et al⁽²⁵⁾, onde se colocava que a mais eficiente conversão de açúcar lipídio se dá entre 14 e 23 horas de processo. Após esse período, o valor do rendimento em lipídio decrescia com o tempo⁽²⁵⁾.

Dessa maneira, pode-se supor que, provavelmente, a exaustão de sulfato de amônia do meio de cultura estimula de alguma forma a síntese de lipídios por *Rh. gracilis*, seja aumentando a velocidade de acúmulo de lipídios, r_p , seja aumentando o rendimento, $Y_{p/S}$. Kessel⁽¹⁷⁾ já havia levantado essa hipótese em seu trabalho. A subsequente diminuição com o tempo dos valores de r_p , $Y_{p/S}$ e k_p , parece que vem dar suporte a uma outra hipótese de Kessel⁽¹⁷⁾ onde é colocado que o decréscimo desses parâmetros se dá ou devido à diminuição da atividade da massa seca desengordurada, porção celular que contém o complexo enzimático responsável pela conversão açúcar-lipídio, ou devido a um limite de capacidade de acúmulo de lipídio por parte dos microrganismos, ou a ambos os fatores.

4.4. Composição do Lipídio

O Anexo IV mostra a análise cromatográfica do lipídio da amostra final do ensaio nº 1. Como pode ser observa-

do, a composição é bastante semelhante à encontrada na literatura resumida na Tabela 2.4.

θ (h)	P (g/l)	X (g/l)	N (g/l)	\bar{X} (g/l)	S (g/l)
0.00	0.10	0.00	1.00		40.00
3.00	0.17	1.00	-	0.83	-
6.00	0.27	2.00	0.70	1.73	37.70
8.00	0.52	-	0.20	-	35.20
10.00	-	4.20	0.07	-	-
11.00	0.70	5.00	-	4.30	-
15.30	-	6.15		.	30.20
18.00	1.90	7.00		5.10	25.10
20.00	1.90	7.50		5.60	-
22.00	2.20	7.75		5.55	20.00
24.00	2.50	8.42		5.92	17.70
26.00	-	8.71		-	-
28.00	-	-		-	15.70
30.00	3.15	9,05		5.90	15.20
32.00	3.25	-		-	-
36.00	3.50	9.52		6.02	12.50
38.00	3.80	9.68		5.88	9.80
40.00	-	-		-	-
48.00	4.15	10.00		5.85	3.40
50.00	4.20	10.15		5.95	2.30

QUADRO 4.1. - RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NO CULTIVO DE *Rhodotorula gracilis*, ENSAIO Nº

1

θ (h)	P (g/l)	X (g/l)	N (g/l)	\bar{X} (g/l)	S (g/l)
0.00	0.10	0.60	1.00	0.50	40.00
2.00	0.25	0.95	0.95	0.70	40.00
5.00	0.42	1.62	0.81	1,20	40.00
7.30	0.54	2.78	0.39	2.24	35.70
9.30	0.65	4.30	0.08	3.65	33.50
11.30	0.80	5.37	0.00	4.57	29.10
15.30	1.35	6.27		4.92	-
18.00	1.66	6.96		5.30	26.90
20.00	2.00	7.45		5.45	23.60
22.00	2.23	8.00		5.77	-
24.00	2.34	8.08		5.74	21.40
26.00	2.74	8.21		5.47	-
27.00	2.81	-		-	20.40
29.00	2.81	9.15		6.34	16.00
32.00	3.32	9.15		5.83	16.00
34.00	3.38	9.25		5.87	12.70
42.00	3.89	9.55		5.66	7.80
44.00	4.01	9.96		5.95	6.10

QUADRO 4.2. - RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NO CULTIVO DE *Rhodotorula gracilis*, EN SAIO Nº 2.

θ (h)	\bar{x} (g/l)	$d\bar{x}/d\theta$ (g/lh)	$(-dN/d\theta) \times 10$ (g/lh)	$(dP/d\theta) \times 10$ (g/lh)	$-dS/d\theta$ (g/lh)	$[(dP/d\theta)/\bar{x}] \times 10$ (h ⁻¹)	$(r_{P/S}) \times 10$
1:00	0.50	0.06	0.23	0.20	-	0.40	-
2:00	0.65	0.10	0.33	0.27	0.23	0.41	1.20
3:00	0.67	0.15	0.43	0.37	-	0.55	-
4:00	0.87	0.21	0.57	0.45	0.60	0.51	0.75
5:00	1.20	0.30	0.80	0.62	-	0.51	-
6:00	1.56	0.41	1.25	0.82	0.90	0.52	0.91
7:15	2.15	0.58	1.90	-	-	-	-
8:00	2.65	0.50	1.90	1.10	1.20	0.41	0.91
8:30	3.00	0.44	1.20	-	-	-	-
9:00	3.15	0.43	0.95	0.90	1.35	0.28	0.68
9:30	3.35	0.40	0.73	-	-	-	-
10:00	3.55	0.35	0.50	0.75	1.50	0.21	1.50
11:00	3.90	0.29	0.00	1.60	1.30	0.40	1.23
13:00	4.40	-	-	-	-	-	-
14:00	4.65	0.20	-	1.60	-	-	-
15:00	4.82	-	-	1.58	0.90	0.33	1.77
16:00	5.00	0.16	-	-	-	-	-
17:00	5.15	0.15	-	1.50	0.80	0.29	1.87
19:00	5.40	0.12	-	1.40	0.75	0.26	1.87
21:00	5.62	0.09	-	1.25	0.70	0.22	1.71
23:00	5.77	0.06	-	1.15	-	0.20	-
25:00	5.87	-	-	1.04	0.65	0.18	1.53
25:30	5.92	0.04	-	-	-	-	-
27:00	5.97	0.03	-	0.97	-	0.16	-
28:00	-	0.00	-	-	-	-	-
29:00	6.00	-	-	0.89	0.60	0.15	1.38
31:00	6.00	-	-	0.84	-	0.14	-
33:00	6.00	-	-	0.75	0.57	0.12	1.23
35:00	6.00	-	-	0.69	-	0.11	-
37:00	-	-	-	0.65	0.52	-	1.02
39:00	6.00	-	-	0.60	-	0.10	-
41:00	6.00	-	-	0.54	0.52	0.09	0.77
43:00	6.00	-	-	0.48	-	0.07	-
45:00	6.00	-	-	0.43	0.52	0.07	0.67
47:00	6.00	-	-	0.38	-	0.06	-
48:00	-	-	-	-	0.52	-	0.57
49:00	6.00	-	-	0.30	-	0.05	-

QUADRO 4.3. - VALORES NUMÉRICOS DE dX/d , dN/d e $(dP/d) \times X$ UTILIZADOS PARA O CÁLCULO DOS PARÂMETROS.

$$\begin{aligned}
\bar{X}_0 &= 0,50 \text{ g/l} \\
\bar{X}_L &= 0,70 \text{ g/l} \\
\bar{X}_C &= 2,12 \text{ g/l} \\
\bar{X}_M &= 6,15 \text{ g/l} \\
N_0 &= 1,00 \text{ g/l} \\
N_L &= 0,95 \text{ g/l} \\
N_C &= 0,45 \text{ g/l} \\
P_0 &= 0,10 \text{ g/l} \\
P_L &= 0,17 \text{ g/l} \\
P_C &= 0,42 \text{ g/l} \\
P_* &= 0,70 \text{ g/l} \\
\theta_0 &= 0,00 \text{ h} \\
\theta_L &= 3,50 \text{ h} \\
\theta_C &= 7,25 \text{ h} \\
\theta_* &= 11,00 \text{ h} \\
k_{\bar{X}} &= 0,29 \text{ h}^{-1} \\
k_0 &= 0,08 \text{ h}^{-1} \\
\tau &= 0,06 \text{ h}^{-1} \\
k_{P_I} &= 0,19 \text{ h} \\
\beta_{\text{trans}} &= 5,00 \\
\beta_{\text{exp}} &= 2,81 \\
\beta_{\text{decl}} &= 0,99
\end{aligned}$$

QUADRO 4.4. - VALORES OBTIDOS PARA OS
PARÂMETROS CINÉTICOS.

	CRESCIMENTO CELULAR	CONSUMO DE NITROGÊNIO AMONIAICAL
Fase Transiente $0 \leq \theta \leq 3,50h$	$\bar{X} = 0,50 + 0,02\theta^2$ (4.1)	$N = 1,00 - 0,03 \times 10^{-1} \theta^2$ (4.4)
Fase Exponencial $3,50 \leq \theta \leq 7,25h$	$\bar{X} = 2,12 \exp \left[0,29(\theta - 7,25) \right]$ (4.2)	$N = 1,21 - 0,75 \exp 0,29(\theta - 7,25)$ (4.5)
Fase de Declínio $\theta \geq 7,25h$	$\bar{X} = 6,15 - \left\{ 4,03 \exp \left[-0,15(\theta - 7,25) \right] \right\} \left\{ 4.3 \right\}$	$= 0,45 + 4,07 \left\{ \exp \left[-0,15(\theta - 7,25) \right] - 1 \right\}$ (4.6)

QUADRO 4.5. - EQUAÇÕES UTILIZADAS PARA DESCREVER A VARIACÃO COM O TEMPO DAS CONCENTRAÇÕES DE MASSA SECA DESENGORDURADA E NITROGÊNIO AMONIAICAL.

Concentração de nitrogênio amoniacal expresso em g de sulfato de amônia por litro de meio de cultura.

Fase I do Acúmulo de Lipídio	
Fase Transiente $0 \leq \theta \leq 3,50h$	$P = 0,10 + 0,03 \times 10,00 \theta \quad (4.7)$
Fase Exponencial $3,50 \leq \theta \leq 7,25h$	$P = 0,04 + 0,40 \exp \left[0,29(\theta - 7,25) \right] \quad (4.8)$
Fase de Declínio $7,25 \leq \theta \leq 11,00h$	$P = 0,76 \left\{ 1 - \exp \left[- 0,15(\theta - 7,25) \right] \right\} + 0,42 \quad (4.9)$
Fase II do Acúmulo de Lipídio $\theta \geq 11,00h$	$P = 4,47 + 4,52 \exp(-0,21\theta) - 8,17 \exp(-0,06\theta) \quad (4.10)$

QUADRO 4.6. - EQUAÇÕES UTILIZADAS PARA DESCREVER A VARIACÃO COM O TEMPO DAS CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDIO TOTAL EXPRESSO EM g DE LIPÍDIO ACUMULADO POR LITRO DE MEIO DE CULTURA.

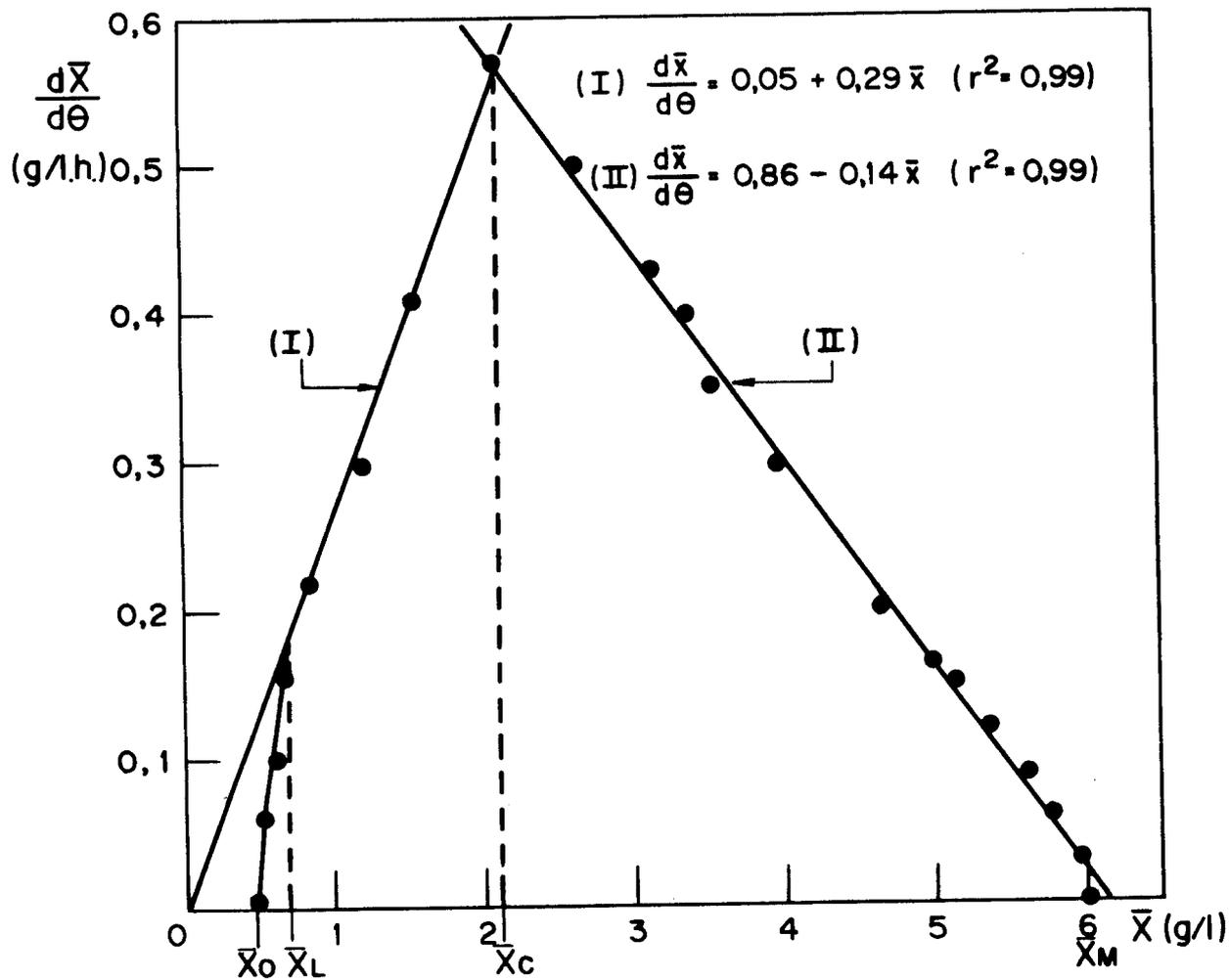


FIGURA 4.1. - ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS \bar{X}_0 , \bar{X}_L , \bar{X}_M e $k_{\bar{X}}$
 SEGUNDO PROCEDIMENTO DESCRITO EM 3.7.2.

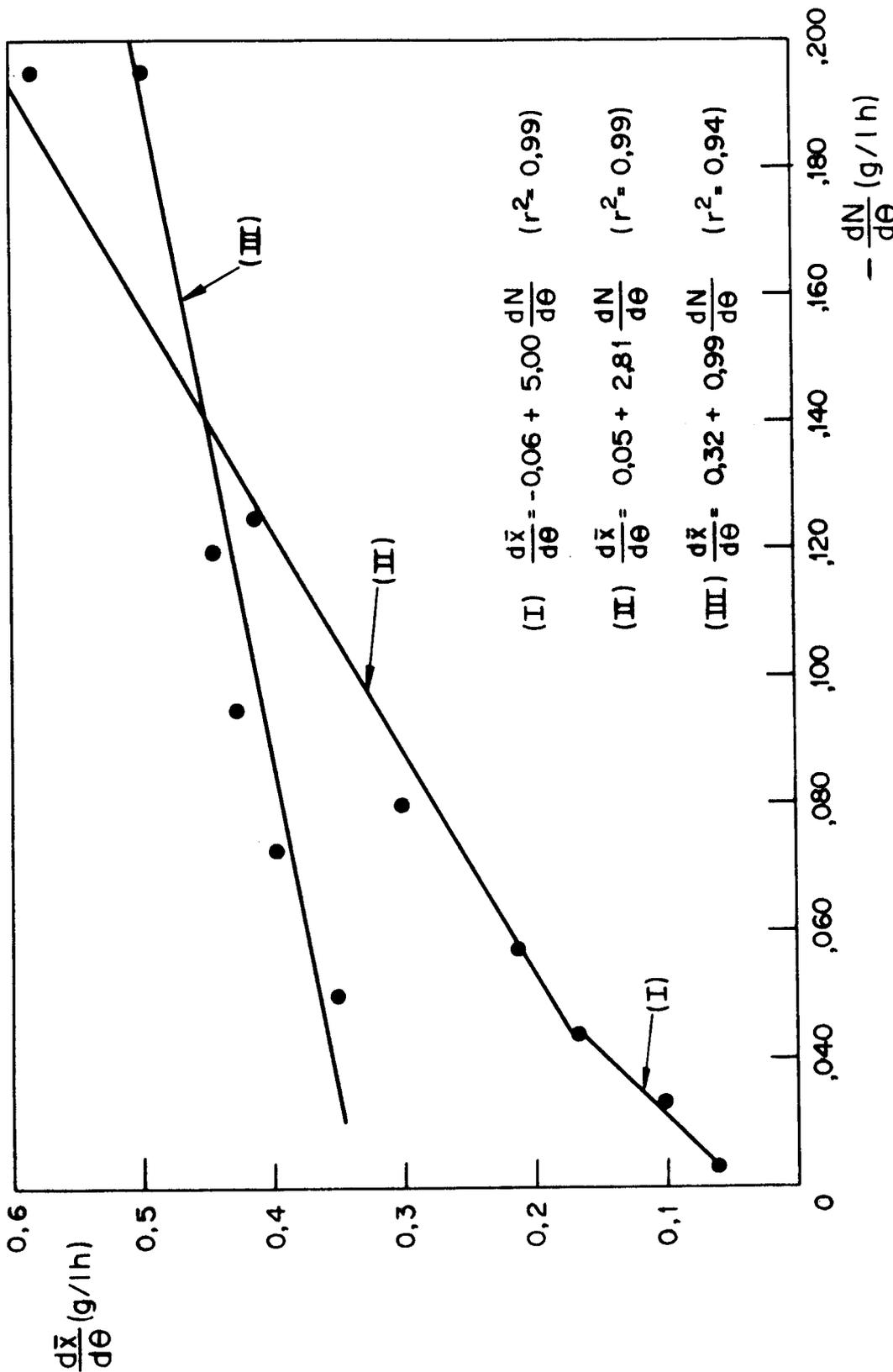


FIGURA 4.2. - ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS β_{trans} , β_{exp} e β_{decl} SEGUNDO PROCEDIMENTO DESCRITO EM 3.7.4.

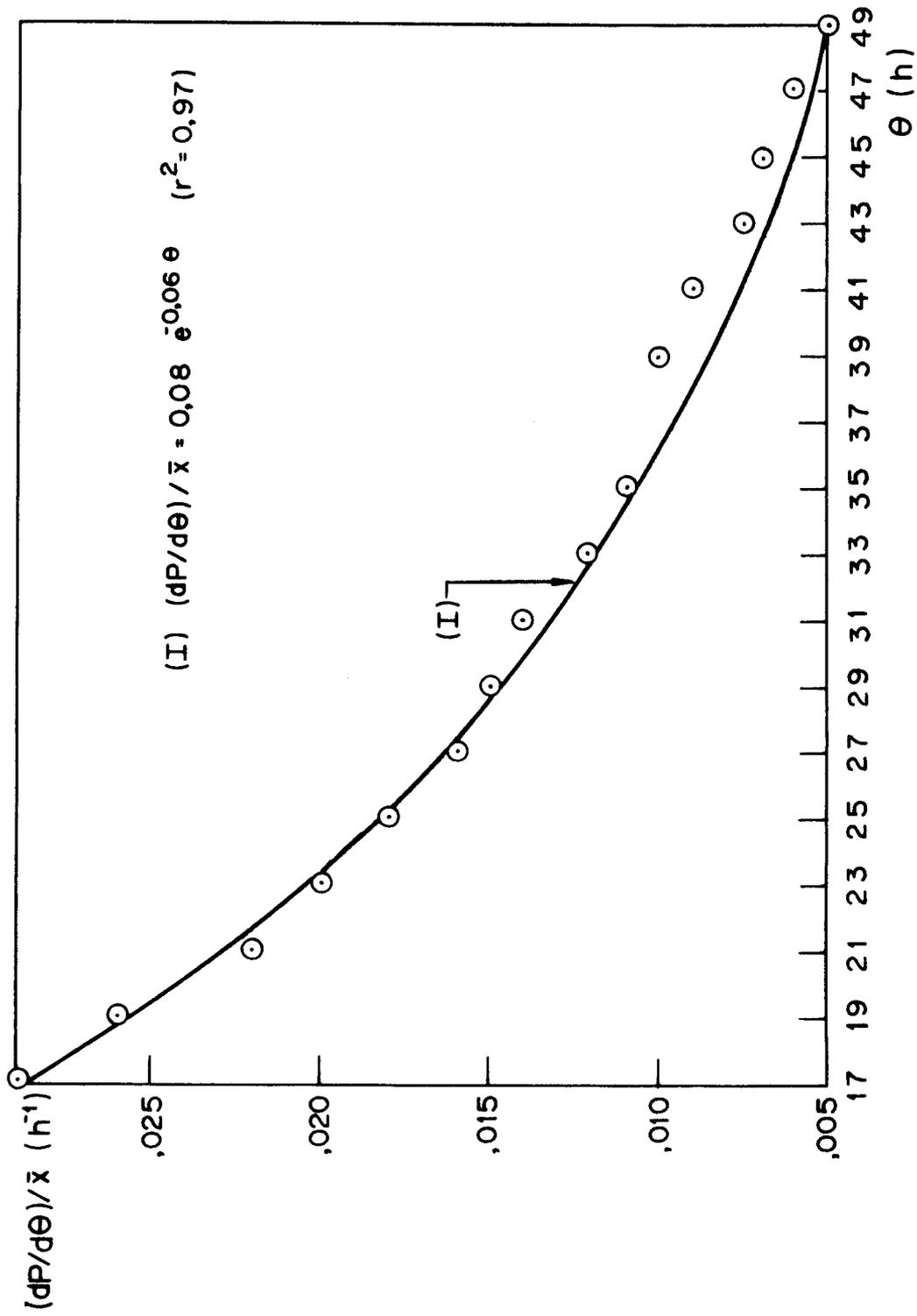


FIGURA 4.3. - ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS k_0 e τ SEGUNDO PROCEDIMENTO DES-
CRITO EM 3.7.6.

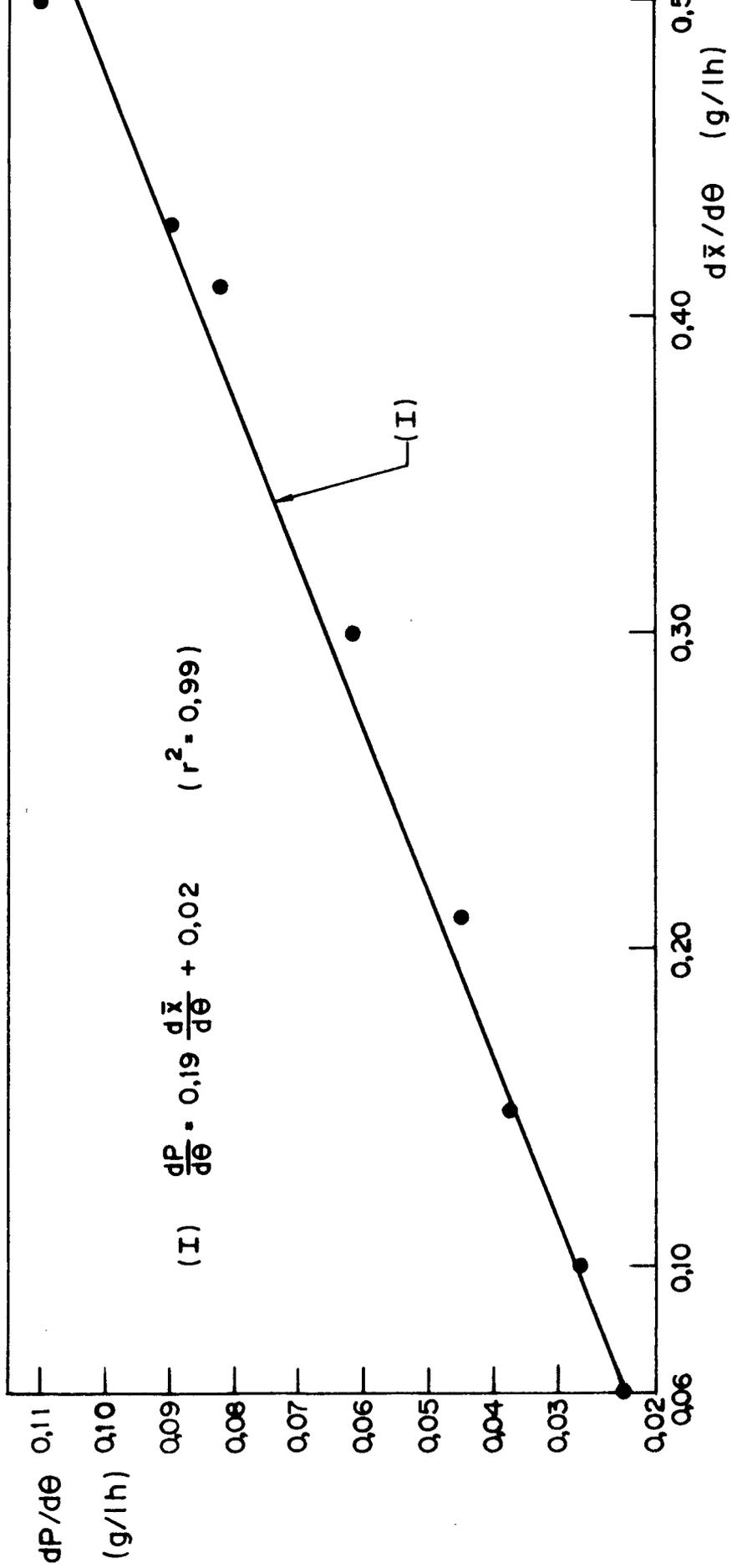


FIGURA 4.4. - ESTIMATIVA DO PARÂMETRO k_{P_I} SEGUNDO PROCEDIMENTO DESCRITO EM 3.7.6.

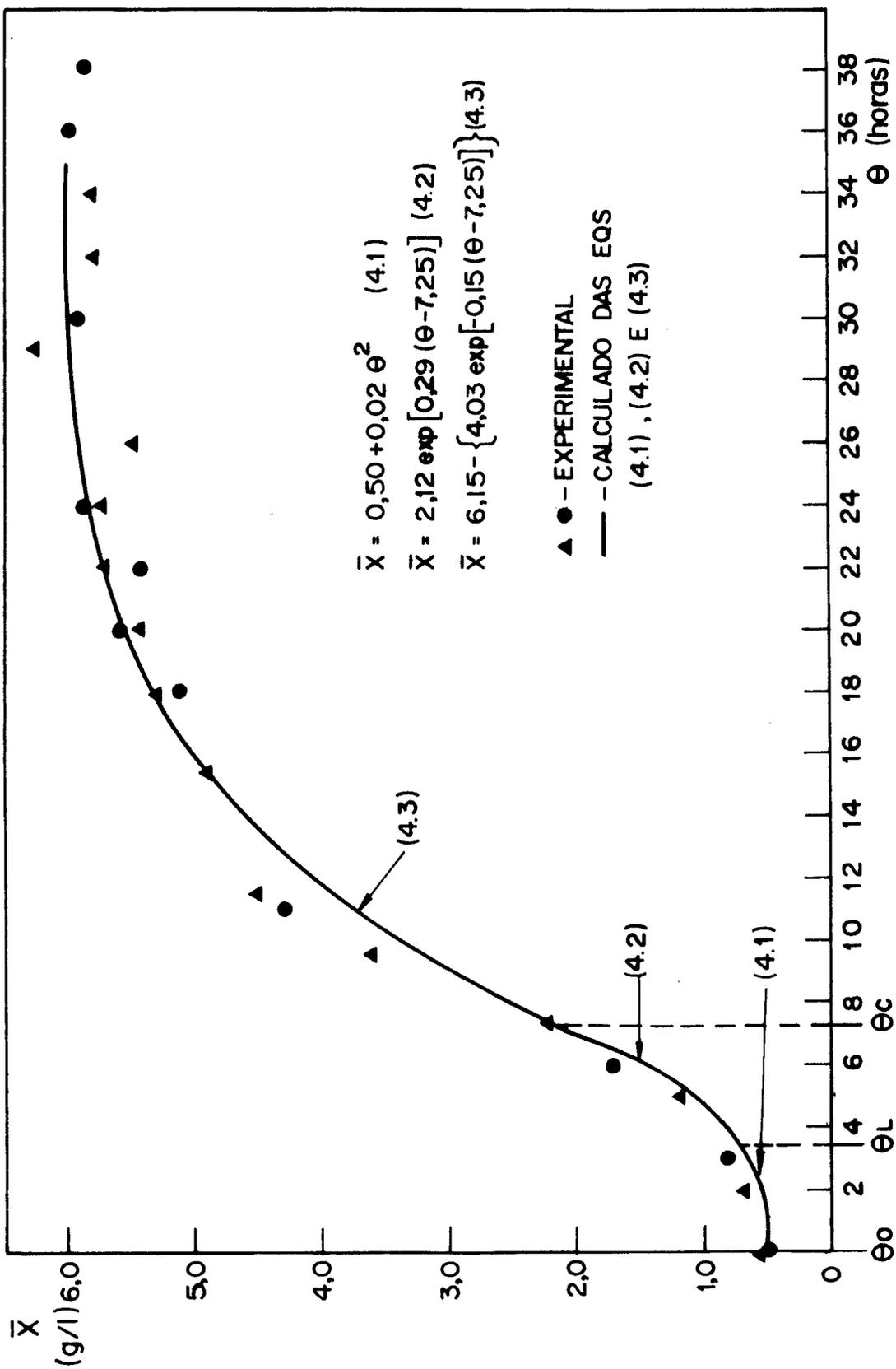


FIGURA 4.5. - COMPORTAMENTO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA MASSA SECA DESENGORDURADA COM O TEMPO.

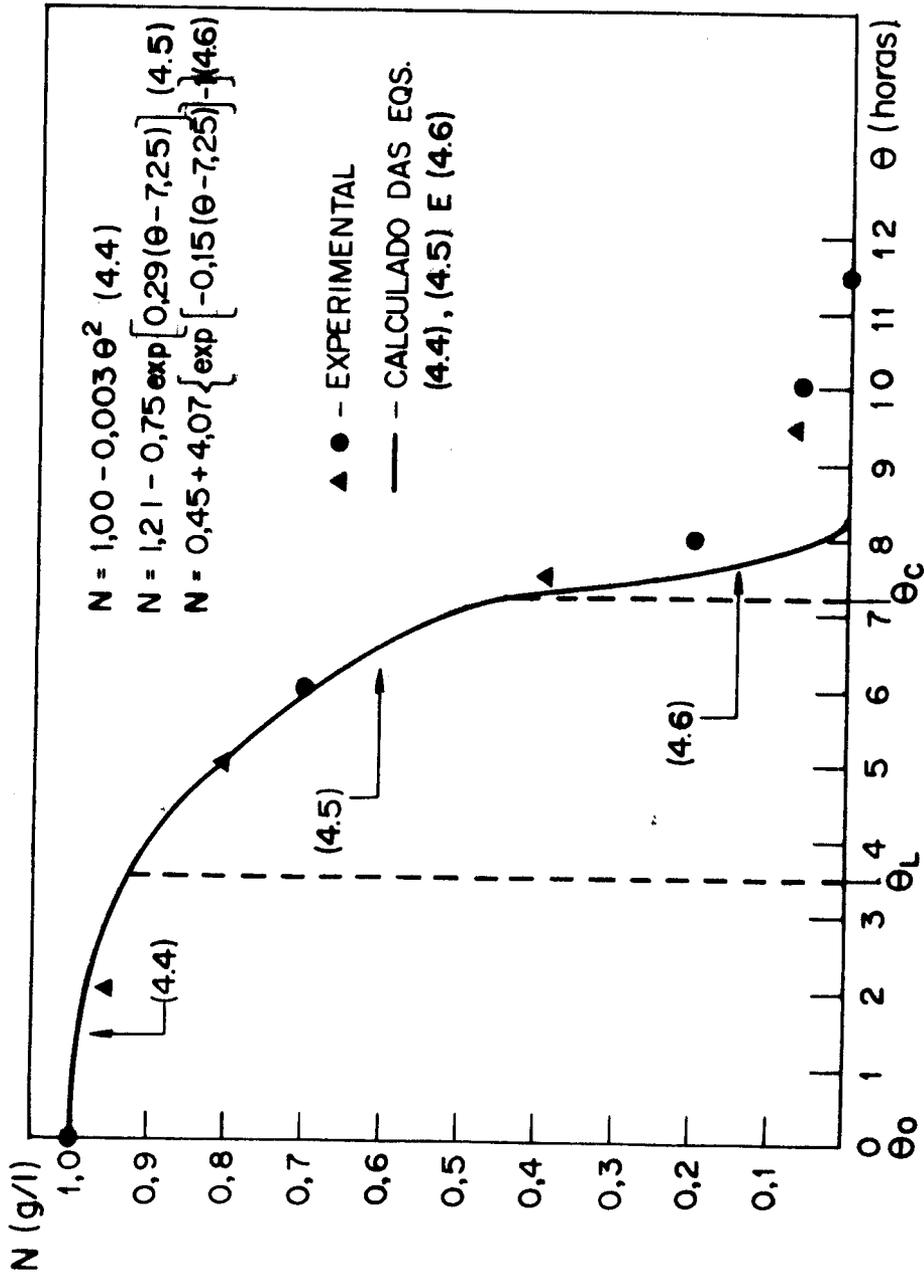


FIGURA 4.6. - COMPORTAMENTO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO NITROGÊNIO AMONÍACAL COM O TEMPO.

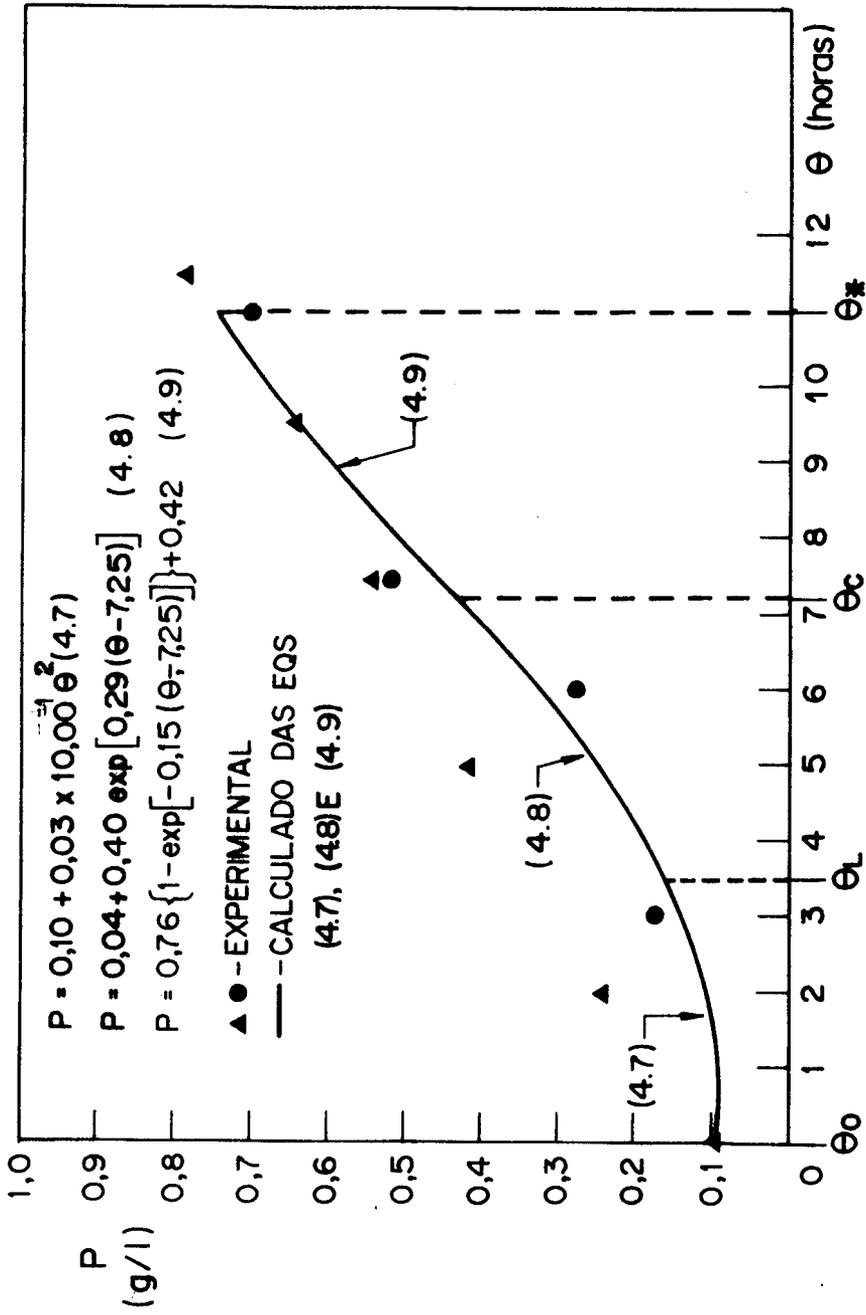


FIGURA 4.7. - COMPORTAMENTO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO LIPÍDIO TOTAL COM O TEMPO, FASE I.

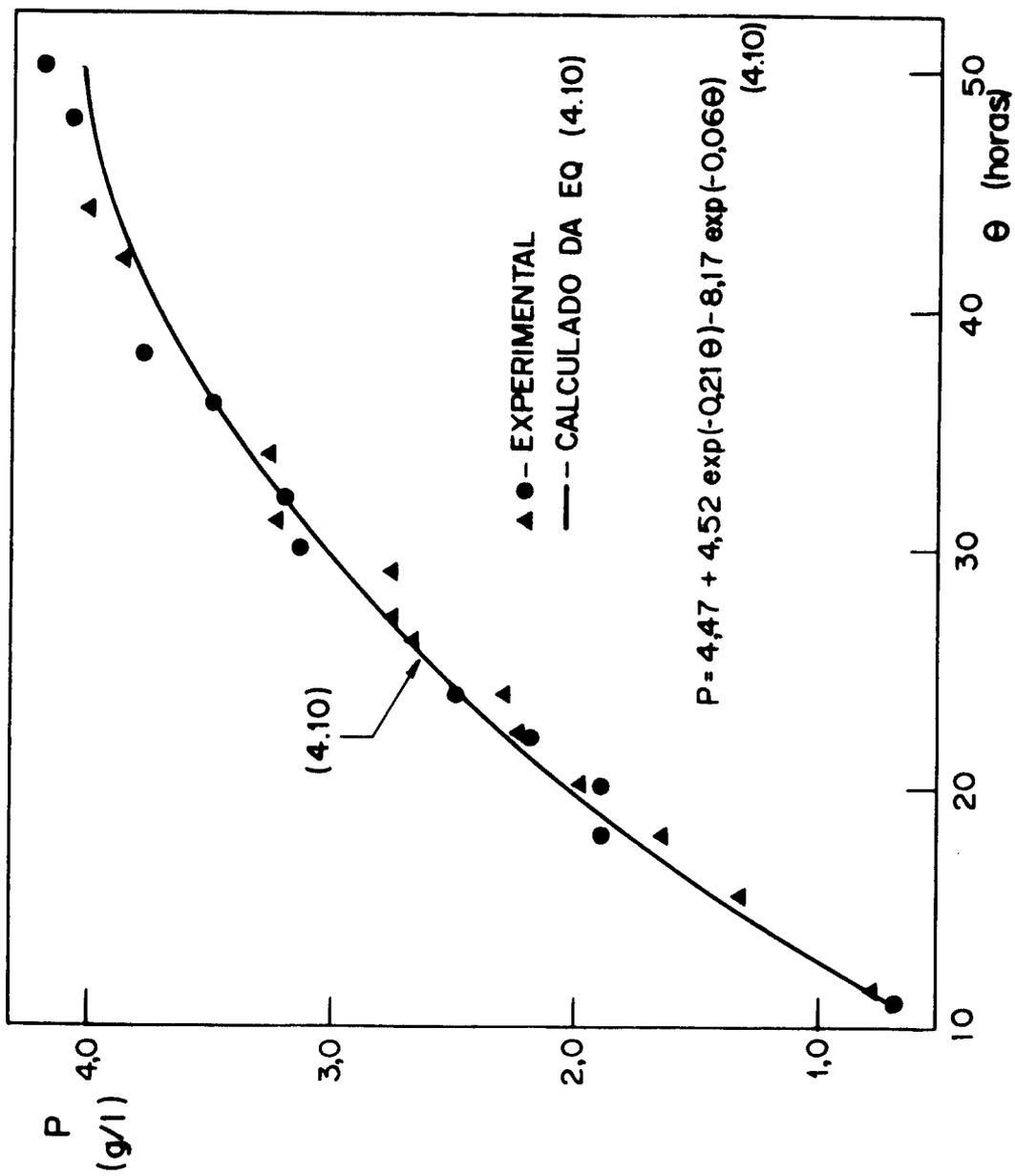


FIGURA 4.8. - COMPORTAMENTO TEÓRICO E EXPERIMENTAL DA EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO LIPÍDIO TOTAL COM O TEMPO, FASE II.

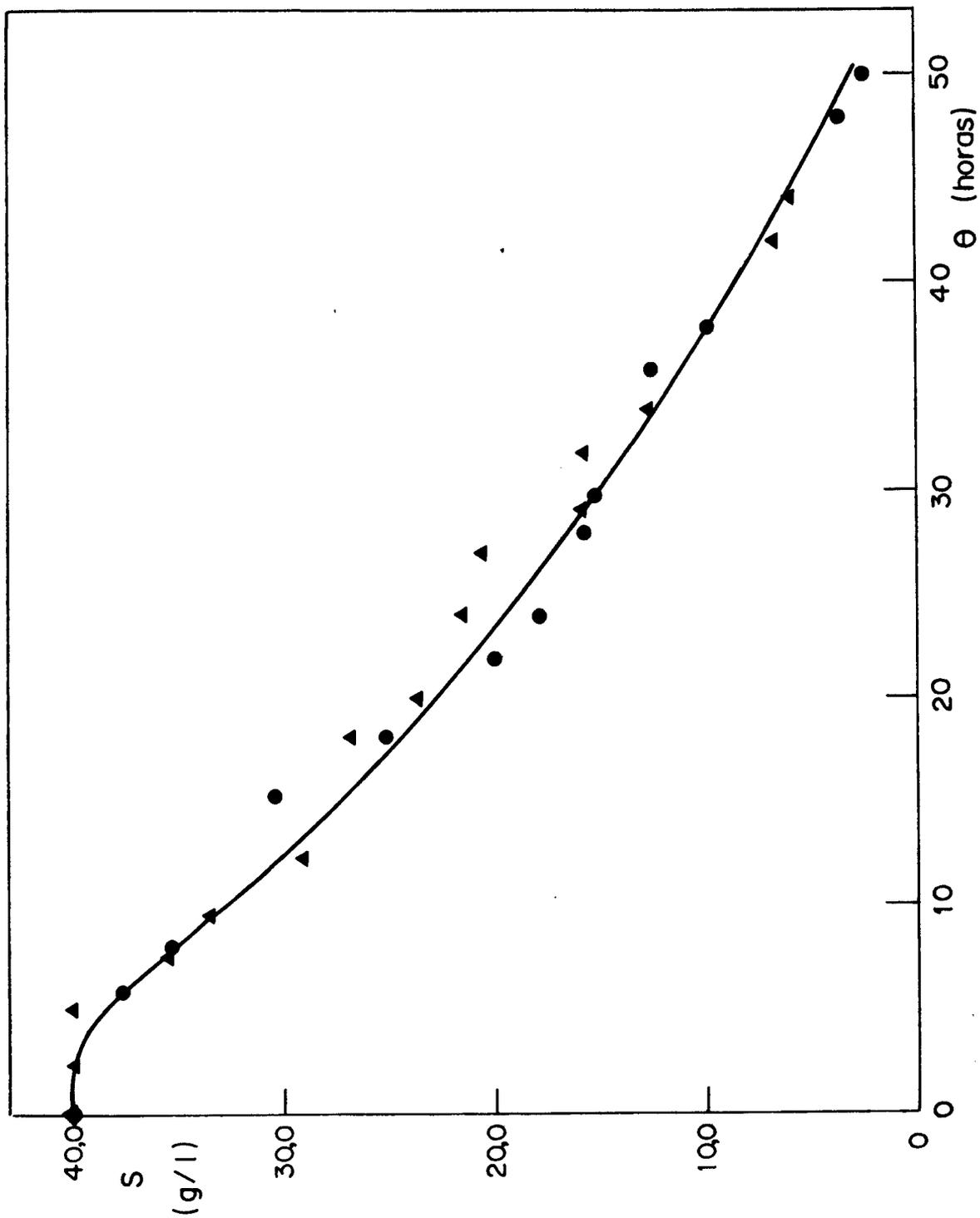


FIGURA 4.9. - COMPORTAMENTO EXPERIMENTAL DA EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE COM O TEMPO.

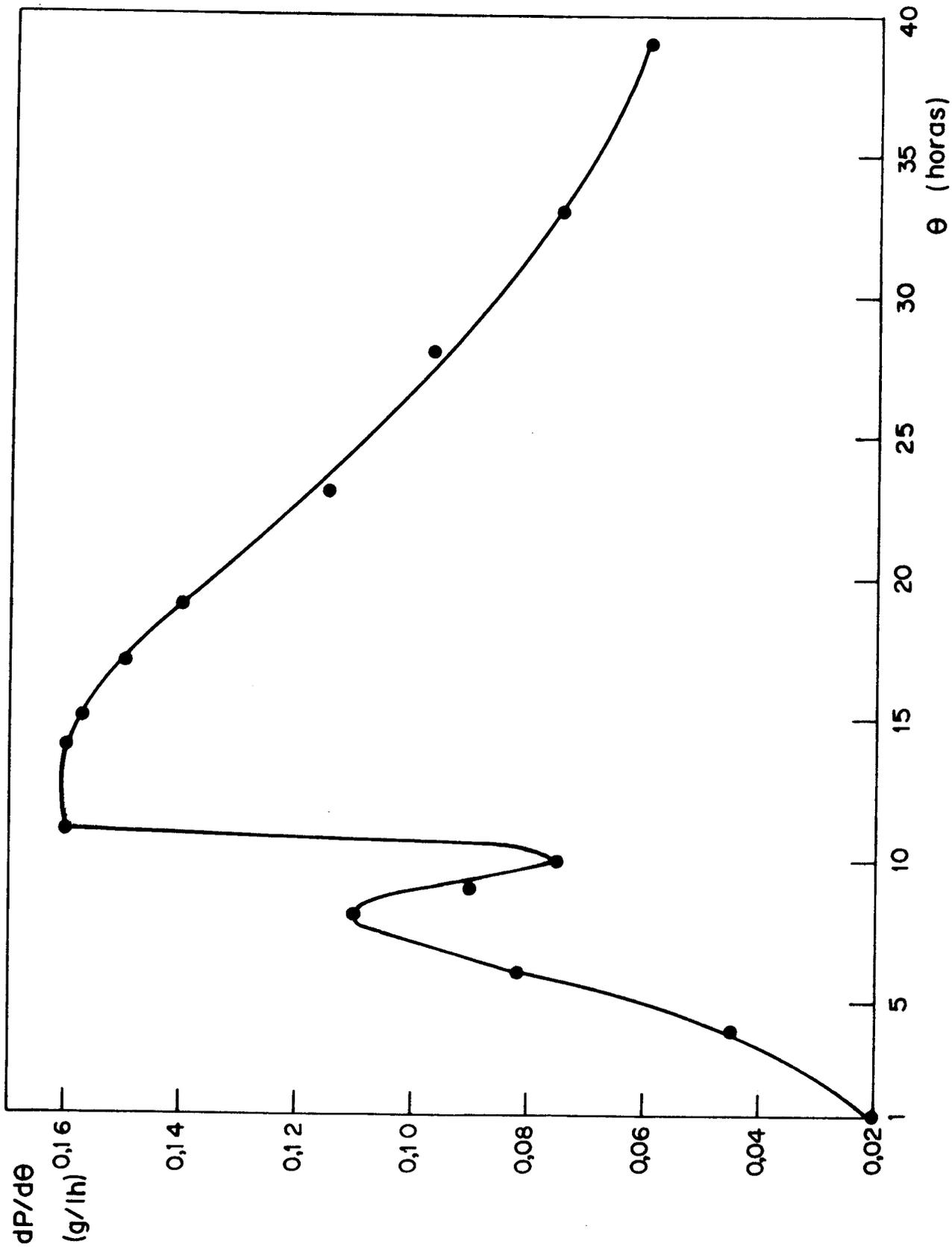


FIGURA 4.10. - EVOLUÇÃO COM O TEMPO DA VELOCIDADE DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

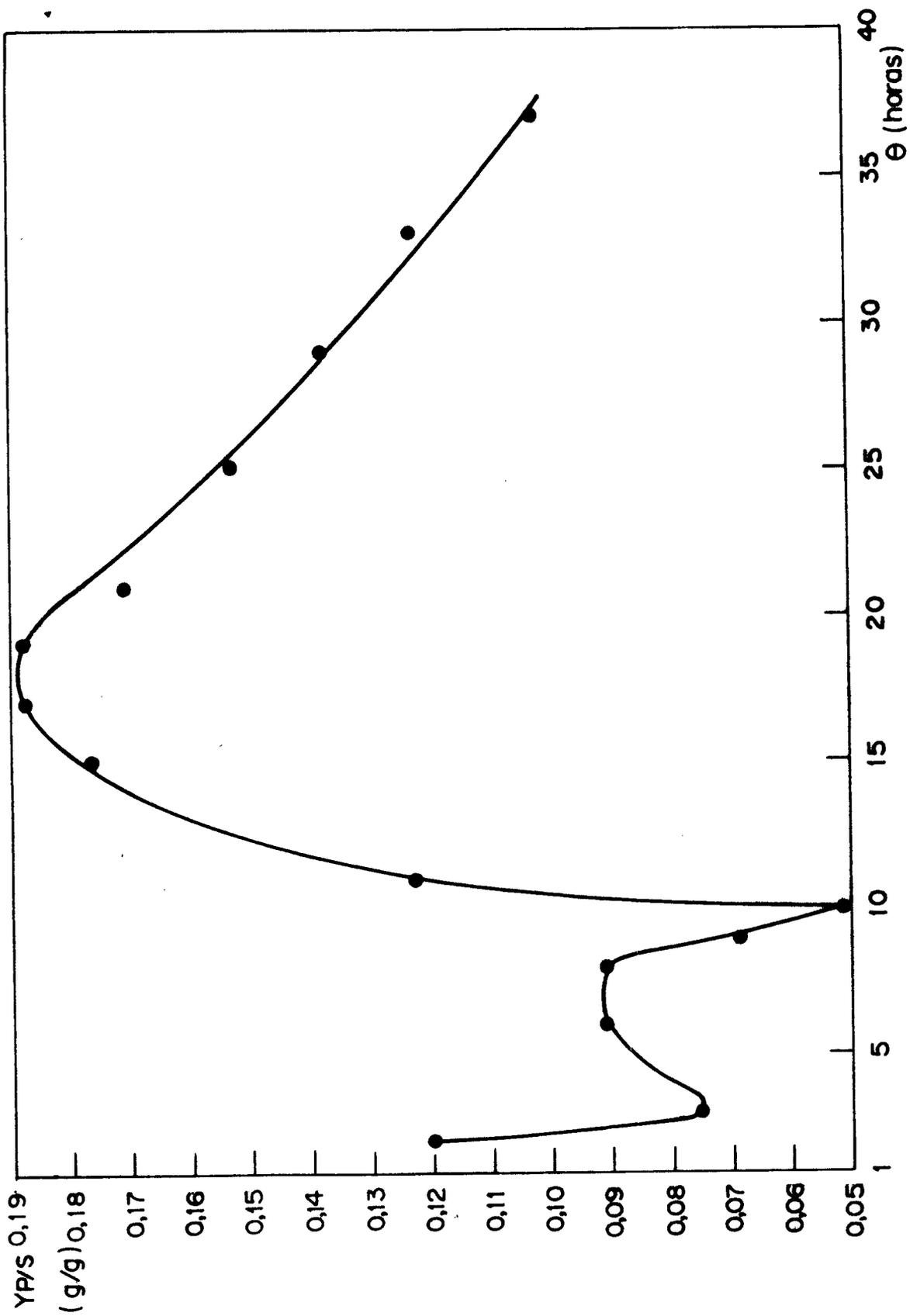


FIGURA 4.11. - EVOLUÇÃO COM O TEMPO DO RENDIMENTO LIPÍDIO ACUMULADO-AÇÚCAR CONSUMIDO.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, chegamos às seguintes conclusões:

1. A evolução do crescimento celular com o tempo de *Rh. gracilis* é satisfatoriamente descrita pela cinética de Kono e Asai
2. Foram encontradas tres fases de crescimento celular: transiente ($0 \leq \theta \leq 3,50h$); exponencial ($3,50 \leq \theta \leq 7,25h$) e de declínio ($\theta \geq 7,25h$), descritas, respectivamente, pelas equações (4.1), (4.2) e (4.3).
3. O acúmulo de lipídio se dá em duas fases. A fase I apresenta um mecanismo de acúmulo de lipídio associado ao crescimento celular e é descrita pelas equações (4.7), (4.8) e (4.9). A fase II apresenta um mecanismo de acúmulo de lipídio não associado ao crescimento e é descrita pela equação (4.10). A passagem da fase I para a fase II se dá a θ igual a 11 horas.
O rendimento de lipídio máximo encontrado (0,187 g de lipídio/g de glicose consumida) se dá entre 17 e 19 horas.
4. O consumo do sulfato de amônia está relacionado com o crescimento celular. As equações (4.4) e (4.5) descrevem a evolução da concentração des

sa substância,

5. No final do processo obteve-se uma concentração de massa seca total igual a 10,0 g/l e de lipíídio igual a 4,0 g/l. A porcentagem de lipíídio acumulada na massa seca era, dessa maneira, da ordem de 40,0%.

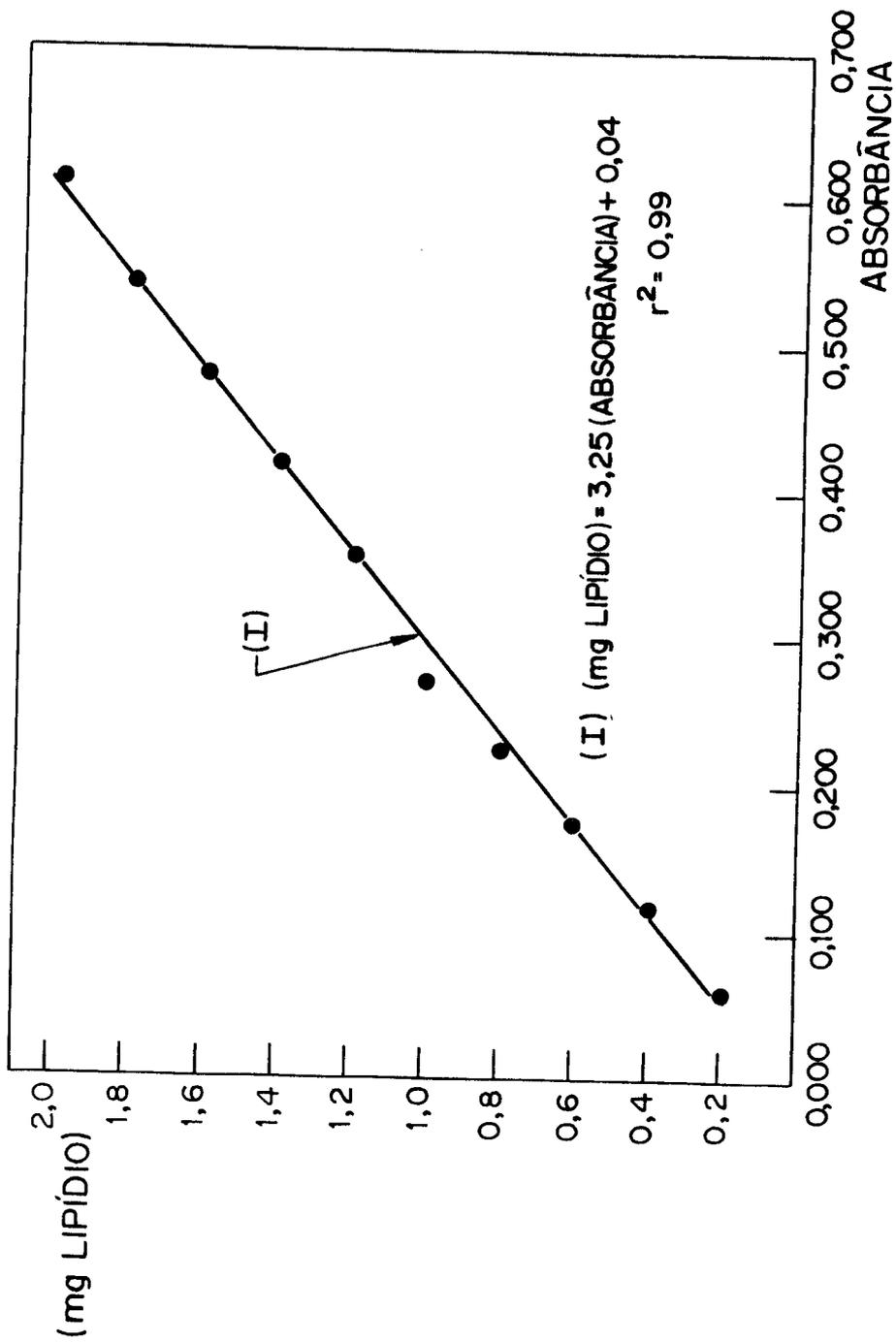
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Imanaka, T; Kaieda, T.; Sato, K; Taguchi, H. - Optimization of α -galactosidase production by mould, J. Ferment. Technol., 50, 633, 1972.
- (2) Fredrickson, A.G.; Megee, R.D. e Tsuchiya, H.M. - Mathematical Models for Fermentation Processes, Adv.Appl. Microbiol., 13, 419, 1971.
- (3) Gaden, E.L., Jr. - Fermentation kinetics and productivity, Chem. & Ind., 7, 154, 1955.
- (4) Maxon, W.D., in Kinetics of Fermentation Process, Biotech. Bioeng., 11, 293, 1969.
- (5) Deindoerfer, F.H. - Fermentation kinetics and model process, Adv. Appl. Microbiol., 2, 321, 1960.
- (6) Aiba, S.; Humphrey, A.E. e Millis, N.F., Biochemical Engineering, p. 93, Academic Press, 1973.
- (7) Luedeking, R. e Piret, E.L. - A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH, J. Biochem. Microbiol. Tech. & Eng., 1, 393, 1959.
- (8) Kono, T. e Asai, T. - Kinetics of Fermentation Processes, Biotech. Bioeng., 11, 293, 1969.

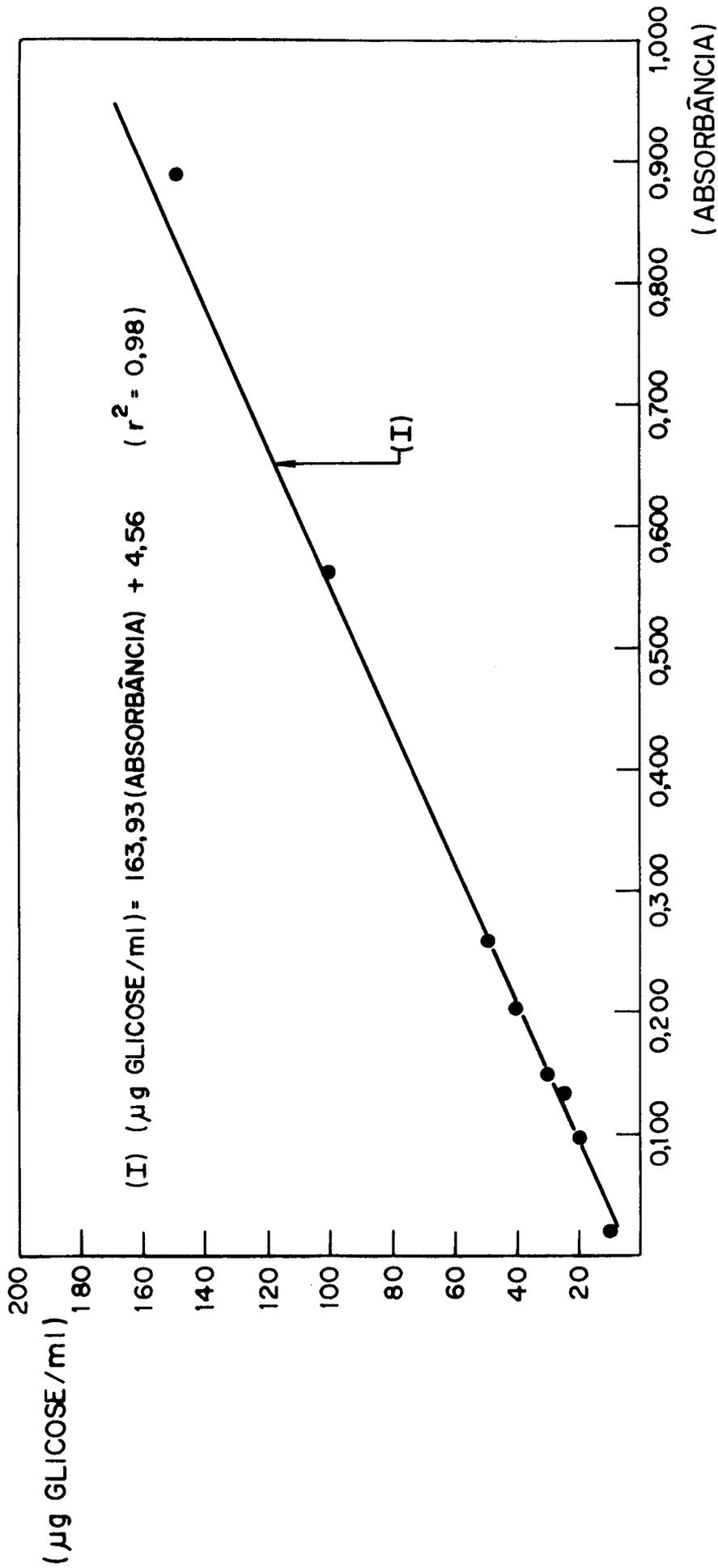
- (9) Woodbine, M. - Microbial Fat: Micro-organisms as Potential Fat Producers, Prog. Ind. Microbiol., 1, 181, 1959.
- (10) Whitworth, D.A. e Ratledge, C. - Microorganisms as a Potential Source of Oils and Fats, Proc. Biochem, 11, 14, 1974.
- (11) Whitworth, D.A. e Ratledge, C. - Activities of Regulatory Enzymes in Alkanes - utilizing and lipid - accumulating yeasts and Moulds, J.Gen.Microbiol, 90, 183, 1975.
- (12) Hofer, M.; Brand, K.; Dreckner, K. e Becker, J.U. - Importance of pentose phosphate pathway for D -glucose catabolisin in the obligatory aerobic yeast Rhotorula gracilis, Biochem. J., 123, 855, 1971.
- (13) Enebo, L.; Anderson, L.G. e Lundin, H. - Microbial Fat Synthesis by Means of Rhotorula Yeast, Arch.Biochem., 11, 383, 1946.
- (14) Ratledge, C. - Production of Fatty Acids and Lipid by a Candida sp. Growing on a Fraction of n-Alkanes Predominating in Tridecane, Biotechnol. Bioeng., 10, 511, 1968.
- (15) Gill, C.O.; Michael, J.H. e Ratledge, C. - Lipid Accumulation in an Oleginous Yeast (Candida 107) Growing on Glucose in Single-Stage Continuous Culture, Appl.Env. Microbiol., 33 (2), 231, 1977.

- (16) Hall, M.J. e Ratledge, C. - Lipid Accumulation in an Oleaginous Yeast (Candida 107) Growing on Glucose Under Various Conditions in a One and Two- Stage Conditions Culture, Appl. Env. Microbiol., 33 (3), 577, 1977.
- (17) Kessel, R.H.J. - Fatty Acids of Rhotorula gracilis: Fat Production in Submerged Culture and the Particular Effect of pH value, Appl. Bacteriol., 31, 220, 1968.
- (18) Krumphanze, V.; Grégr, V.; Pelechová, J. e Uher, J. - Biomass and Fat Production in Rhodotorula gracilis, Biotechnol. Bioeng. Symp. n° 4, 245, 1973.
- (19) Nielsen, N.; Nilsson, N.G. - Investigations on Respiration, Growth, and Fat-Production of Rhodotorula gracilis When Cultivated in Media Containing Different carbohydrates, Arch. Biochem., 25, 316, 1950.
- (20) Pan, S.C.; Andreasen, A.A. e Kolachov, P. - Factors Influencing Fat Synthesis by Rhodotorula gracilis, Arch. Biochem., 23, 419, 1949.
- (21) Husain, S.S. e Hardin, M.M. - Influence of carbohydrate and Nitrogen Sources upon Lipid Production by Certain Yeastes, Food. Res., 17, 60, 1952.
- (22) Steinberg, M.P. e Ordal, Z.J. - Microbial Fat Production: Effect of Fermentation Variables on Rate of Fat Formation by Rhodotorula gracilis, J. Agric. Food. Chem., 2(17), 873, 1954.

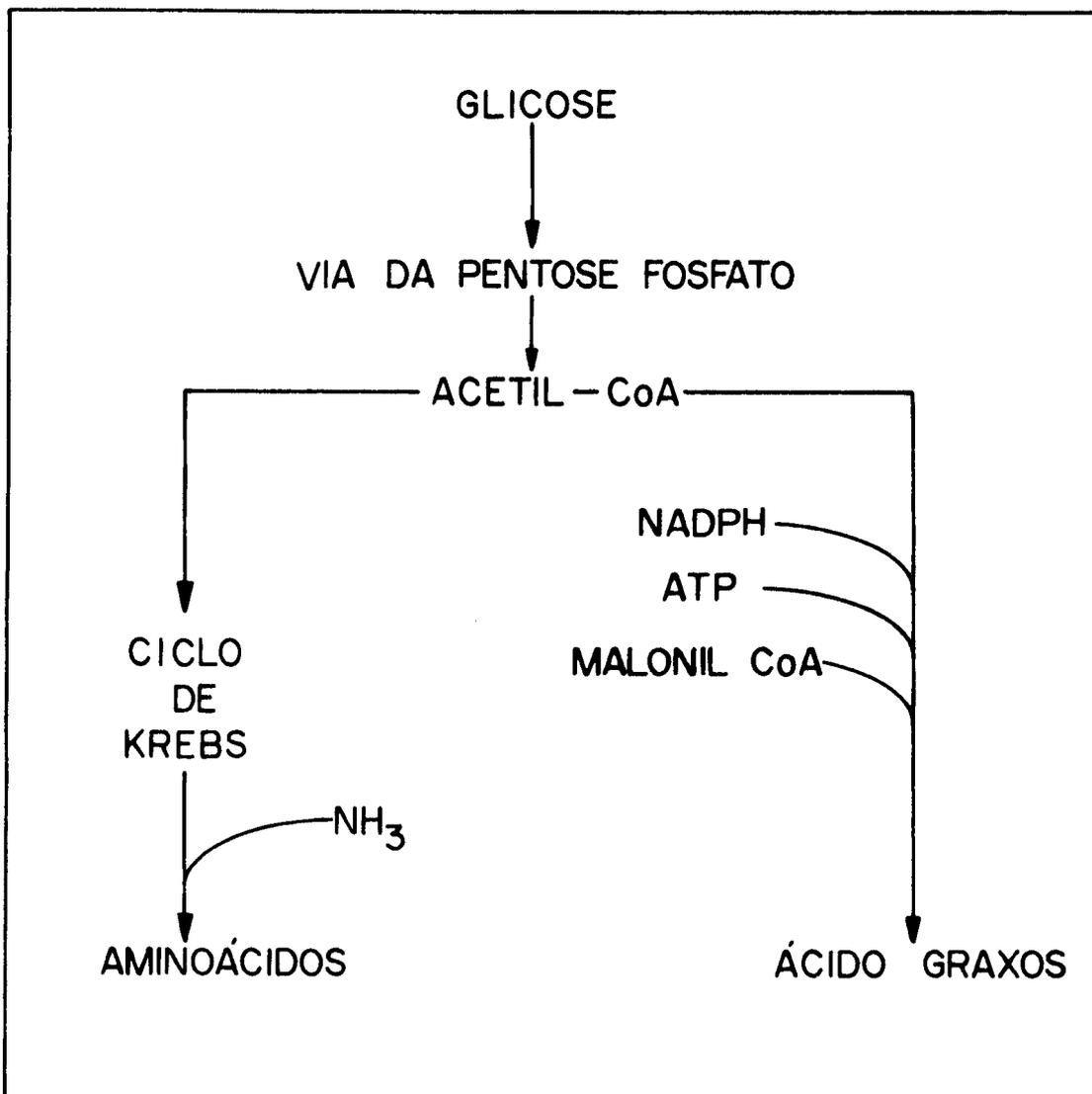
- (23) Fales, F.,W. - Evaluation of a Spectrophotometric Method for Determination of Total Fecal Lipid, Cl. Chem., 17, 1103, 1971.
- (24) Summer, J.B. e Somers, G.F. - Laboratory Experiments in Biological Chemistry, Academic, 1944.
- (25) Allen, L.A.; Barnard, N.H.; Fleming, M. e Hollis, B. - Factors Affecting the Growth and Fat Formation of Rhodotorula gracilis, J.Appl. Bact., 27(1), 27, 1964.



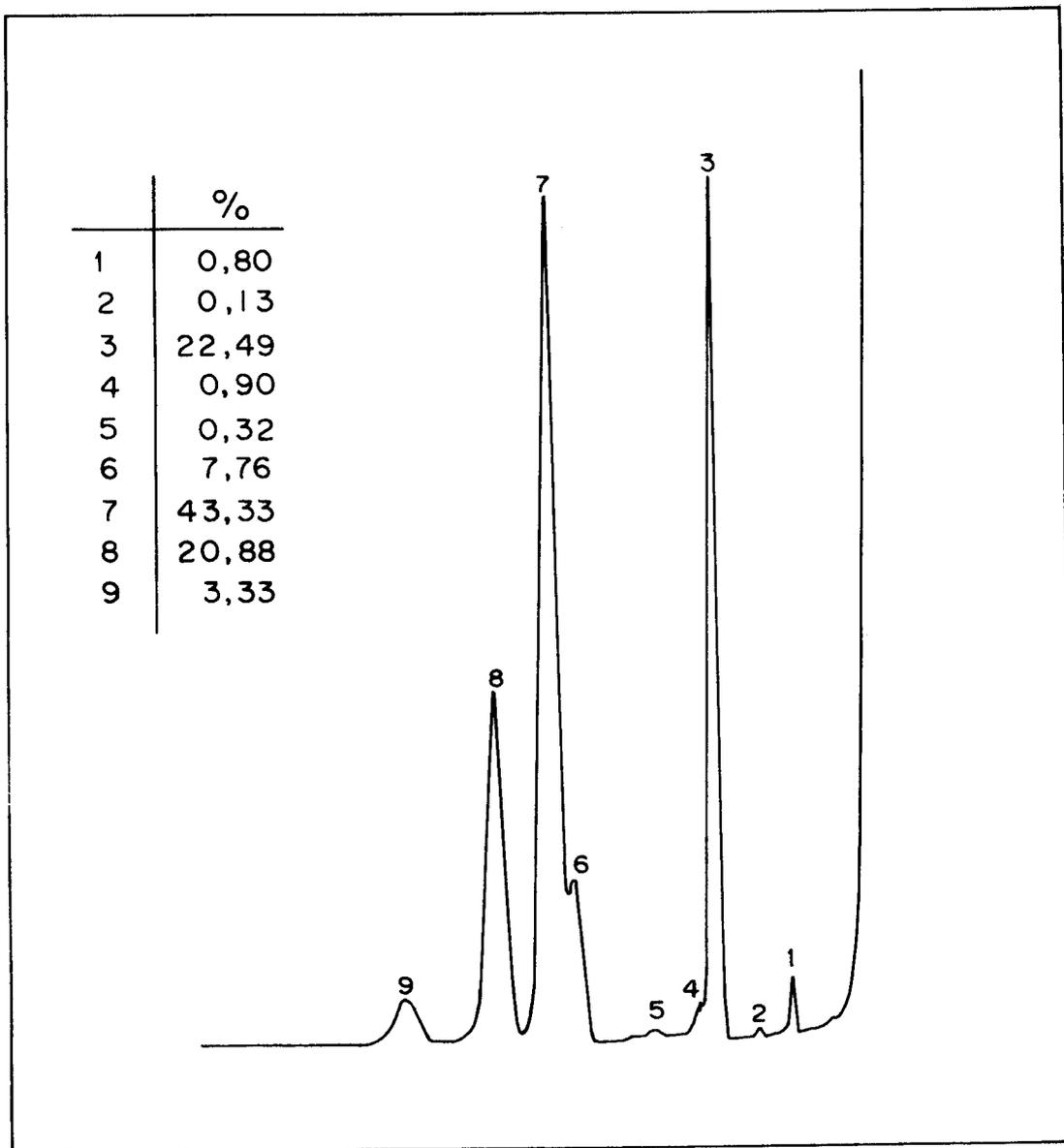
ANEXO I - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO DE ANÁLISE DO AÇÚCAR REDUTOR.



ANEXO II - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O MÉTODO DE ANÁLISE DO LIPIDIO ACUMULADO.

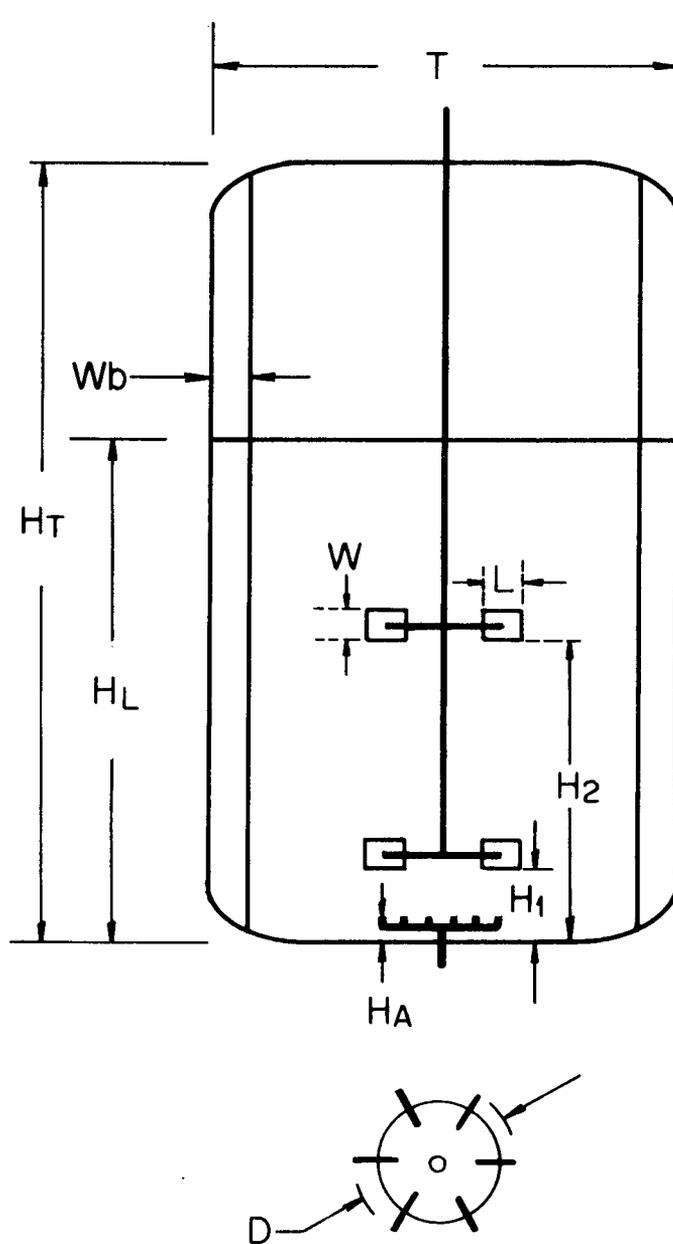


ANEXO III - PROPOSTA PARA O ESQUEMA DO METABOLISMO DA GLICOSE POR *Rhodotorula gracilis*.



ANEXO IV - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO LIPÍDIO DE *Rh. gracilis*.

- | | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1. C _{14:0} | 4. C _{16:1} | 7. C _{18:1} |
| 2. C _{15:0} | 5. C _{17:0} | 8. C _{18:2} |
| 3. C _{16:0} | 6. C _{18:0} | 9. C _{18:3} |



ANEXO V - DIAGRAMA DO FERMENTADOR UTILIZADO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA CINÉTICA
DO CRESCIMENTO CELULAR E ACÚMULO DE
LIPÍDIOS POR *Rhodotorula gracilis*.

ERRATA

Pg.	Local	Únde se lê	Leia-se
11	5ª Linha	; tempo...	; θ = tempo (h)
6	eq. (2.1)	$E + S \longrightarrow$	$E + S \rightleftharpoons$
15	Tabela 2.3.	...Ratledge	...Ratledge ⁽¹⁰⁾
18	Figura 2.1.	...intravelular...	...intracelular...
19	Figura 2.3.	...Kessel ⁽¹¹⁾	...Kessel ⁽¹⁷⁾
23	10ª Linha	...crescer hidrolisados...	...crescer em hidrolisados...
29	12ª Linha	...minuto.	...minutos.
20ª	Linha	...inóculos e ensaics de sele-	...inóculos foi utilizado...
		ção de condições de cultura foi	
		utilizado...	
34	15ª Linha	...mmHg mmHg...	...mmHg...
39	8ª Linha	Plotou-se...	Passou-se...
43	eq. (3.10)	$(\theta - \theta_0)$	$(\theta - \theta_c)$
44	eq. (3.13)	$(\theta - \theta_c)^{-1}$	$(\theta - \theta_c) - 1$
62	Quadro 4.3	$dX/d\theta, dN/d\theta$ e $(dP/d\theta) \times$	$d\bar{X}/d\theta, dN/d\theta$ e $(dP/d\theta)/\bar{X}$
63	Quadro 4.4.	$k_{P_1} = 0.19h$	$k_{P_1} = 0.19$
64	eq. (4.5)	$0,29(\theta - 7,25)$	$[0,29(\theta - 7,25)]$
65	eq. (4.7)	$0,03 \times 10,00 \theta$	$0,03 \times 10,00^{-1} \theta^2$
81	9ª Linha	Krumphanze...	Krumphanz}...