

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
BACHAREL EM ENGENHARIA QUÍMICA

LUIZ FELIPE LEITE

PRODUÇÃO DE SINGLE-CELL-OIL EM BATELADA ALIMENTADA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2019

LUIZ FELIPE LEITE

PRODUÇÃO DE SINGLE-CELL-OIL EM BATELADA ALIMENTADA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química, do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney

PONTA GROSSA

2019



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Ponta Grossa
Departamento Acadêmico de Engenharia Química



TERMO DE APROVAÇÃO

PRODUÇÃO DE SINGLE-CELL-OIL EM BATELADA ALIMENTADA

Por

LUIZ FELIPE LEITE

Monografia apresentada no dia 28 de junho de 2019 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Juliana Martins Teixeira de Abreu Pietrobelli
(UTFPR)

Prof^a. Dr^a. Sabrina Ávila Rodrigues
(UTFPR)

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
(UTFPR)
Orientador

Prof^a. Dr^a. Juliana de Paula Martins
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

- O termo de aprovação assinado encontra-se na coordenação do curso.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão, que muitas vezes sem me compreender, sempre me apoiaram, inspiraram e estiveram ao meu lado nessa jornada, nas melhores e mais difíceis situações.

A atlética XV de Outubro UTFPR-PG, a família XV, que proporcionou grandes amizades, conquistas, vitórias, derrotas, aprendizados, alegrias, tristezas, ensinamentos, enfim emoções tão fortes e diversas que é simplesmente difícil de explicar, por essas tantas emoções que me mantiveram firme e forte diversas vezes e sem as quais não seria a pessoa que me tornei.

Aos professores que acreditaram, incentivaram, não desistiram e viram além das minhas falhas, possibilitando e ajudando nessa conquista.

“Todos os deuses, todos os céus, todos os infernos, estão dentro de você”
(Joseph Campbell)

RESUMO

LEITE, Luiz. **Produção de single-cell-oil em batelada alimentada**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa

Os compostos biotecnológicos oriundos de microrganismos vêm se apresentando cada vez mais como uma alternativa a formas de produção convencionais para obtenção de produtos de interesse. Diversos microrganismos vêm sendo estudados nesse sentido por poderem ser uma fonte constante e renovável de recursos que não sofrem influências climáticas para a sua produção. A levedura *Rhodospiridium toluroides* tem se apresentado como uma importante fonte de óleo microbiano devido a sua grande capacidade de acumular lipídios intracelulares, sendo considerada um microrganismo oleaginoso. A produção e acúmulo de lipídios pela levedura *Rhodospiridium toluroides* requer que o cultivo seja realizado em um meio com carbono em excesso, para quando cessar a multiplicação celular da levedura, este carbono seja convertido em reserva energética na forma de lipídios intracelulares (single-cell-oil, SCO). A produção de SCO pela levedura *Rhodospiridium toluroides* pode ser realizada através de diversas maneiras e estratégias. O objetivo deste trabalho foi abordar a produção de SCO através da estratégia de batelada alimentada em um biorreator utilizando ureia e sacarose como fonte de nitrogênio e carbono, respectivamente. Foi realizada a otimização das concentrações de ureia e sacarose no meio de cultivo a fim de aumentar a produtividade de biomassa e acúmulo de lipídios intracelulares. Também foi verificada a eficácia da estratégia de batelada alimentada adotada utilizando três alimentações durante o período no biorreator. A fermentação em biorreator após 144 horas utilizando 3 alimentações intermitentes obteve 35,85g/L de biomassa sendo acumulados 17,87% em lipídios intracelulares.

Palavras-chave: *Rhodospiridium toluroides*, Single-Cell-Oil, Biorreator, Batelada Alimentada, Óleo Microbiano, Processo Fermentativo.

ABSTRACT

LEITE, Luiz. **Production of single-cell-oil in fed batch.** 2019. Final Paper (Bachelor Degree in Chemical Engineering) – Technological Federal University of Parana – Campus Ponta Grossa.

Biotechnological compounds derived from microorganisms are increasingly presenting themselves as an alternative to conventional forms of production to obtain products of interest. Several microorganisms have been studied in this sense, because they can be a constant and renewable source of resources that do not suffer climatic influences for their production. The yeast *Rhodospiridium toluroides* has presented itself as an important source of microbial oil due to its great capacity to accumulate intracellular lipids, being considered an oleaginous microorganism. The production and accumulation of lipids by yeast *Rhodospiridium toluroides* requires that the culture be performed in a medium with excess carbon, so that when the cellular multiplication of the yeast ceases, this carbon is converted into energy reserve in the form of intracellular lipids (single-cell-oil, SCO). The production of SCO by the yeast *Rhodospiridium toluroides* can be performed in several ways and strategies. The objective of this work was to address the production of SCO through a batch strategy fed into a bioreactor using urea and sucrose as a source of nitrogen and carbon, respectively. Optimization of urea and sucrose concentrations in the culture medium was performed in order to increase biomass productivity and intracellular lipid accumulation. The efficacy of the fed batch strategy adopted using three feeds during the bioreactor period was also verified. Fermentation in a bioreactor after 144 hours using 3 intermittent feeds obtained 35.85g/L of biomass being accumulated 17.87% in intracellular lipids.

Keywords: *Rhodospiridium toluroides*, Single-Cell-Oil, Bioreactor, Feeding Batch, Microbial Oil, Fermentation Process.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	9
2.1.OBJETIVO GERAL	9
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
3.1. O MICRORGANISMO	10
3.1.1 <i>Rhodospiridium toluroides</i>	10
3.1.2 Produção e Acúmulo de Lipídios.....	12
3.2. MEIOS DE CULTURA OU DE CULTIVO	16
3.3. PROCESSOS FERMENTATIVOS	17
3.4. ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO.....	18
3.5. QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA	20
3.5.1 Contagem de Células.....	21
3.5.2 Peso Seco da Biomassa	23
3.5.3 Turbidimetria.....	24
3.6. OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS	25
4 METODOLOGIA	26
4.1. LEVEDURA	26
4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MEIO DE CULTIVO.....	26
4.3. ESTRATÉGIA BATELADA ALIMENTADA	28
4.4. OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO	30
5.2. ESTRATÉGIA BATELADA ALIMENTADA	38
5.3. OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS	49
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A produção de microrganismo vem adquirindo cada vez mais importância devido aos seus diversos potenciais industriais. Os compostos produzidos pelos microrganismos são de interesse principalmente das indústrias alimentícia e farmacêuticas, mas está adquirindo uma maior relevância para as indústrias de combustíveis, principalmente na questão de alternativas para os combustíveis de origem fóssil.

Ratledge e Wynn (2002) esclarecem que os microrganismos que acumulam lipídios mais que 20% da sua biomassa são definidos como espécies oleaginosas. Segundo Li, Zhao e Bai (2007) algumas cepas ou estirpes de leveduras, como a *Rhodosporidium sp.*, *Rhodotorula sp.* e *Lipomyces sp.* podem acumular lipídios intracelular tão alto quanto 70% do seu peso seco em biomassa sendo que a maioria desses lipídios são triglicerídeos que contém longas cadeias de ácidos graxos que são comparáveis aos óleos vegetais convencionais. “Compostos lipídicos microbianos, conhecidos como single-cell-oil (SCO), são de interesse industrial devido a suas precisas e particulares propriedades bioquímicas e físico-químicas” (AGEITOS et al., 2011, p. 1).

A grande competição entre a produção de alimentos e a produção de óleos de interesse industrial tem sido um ponto a favor da utilização de microrganismos que acumulam lipídios. A produção de alimentos requer grandes áreas cultiváveis, enquanto que a produção de óleos de interesse industrial através de microrganismos de espécies oleaginosas não necessita de grandes áreas e podem usar como matérias primas materiais descartados nos diversos processos de produção, principalmente da agropecuária e alimentícia. Abomohra et al. (2016) relata que a utilização de biodiesel produzido a partir de plantas cultivadas, afeta dramaticamente grandes áreas de terras que são atualmente cultivadas para a produção de alimentos para os seres humanos.

Um grande número de fungos filamentosos e leveduras são capazes de acumular lipídios em sua biomassa como evidenciado por Wiebe et al. (2012), sendo que a levedura *Rhodosporidium* vem sendo relatada como modelo de microrganismo para a produção de lipídios, principalmente a *Rhodosporidium toruloides*, assim sendo alvo de diversos estudos que visam a sua produção para a obtenção de SCO.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Obtenção de single-cell-oil a partir do cultivo da levedura *Rhodosporidium toluroides* em sistema de batelada alimentada utilizando um biorreator.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições de cultivo da levedura *Rhodosporidium toluroides* utilizando a estratégia batelada em shaker (concentração de ureia e sacarose).
- Determinar melhor condição para produção de biomassa e acúmulo de lipídios.
- Identificar melhor regime de alimentação de nutrientes em termos de produtividade de lipídeos

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O MICRORGANISMO

Atualmente há o conhecimento de uma grande diversidade de microrganismos que são capazes de produzir e acumular lipídios, porém uma pequena parcela desses microrganismos consegue acumular lipídios de forma considerável, tanto que são considerados somente como microrganismos oleaginosos aqueles que conseguem acumular lipídios mais do que 20% da sua biomassa seca.

Nas últimas décadas, a capacidade de acúmulo lipídico de leveduras tem sido alvo de muitos estudos, apesar desta capacidade já ter sido descrita muito tempo atrás. Estes estudos surgem com o intuito de entender os mecanismos envolvidos nesta habilidade a fim de melhorar e intensificar a produção de óleo microbiano, o qual pode ter várias aplicações de interesse para o homem (BEOPOULOS et al., 2009 *apud* AZAMBUJA, 2016).

Segundo Ageitos et al. (2011) apenas 5% da população de leveduras podem ser consideradas oleaginosas e produzir SCO, leveduras capazes de acumular mais do que 25% de lipídios, sendo os principais gêneros de leveduras oleaginosas a *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*.

As leveduras em comparação a outros microrganismos, principalmente fungos e bactérias, possuem vantagens para a produção de lipídios microbianos como um menor tempo de duplicação e ampliação da escala de produção assim relatado por Ageitos et al. (2011), além disso possui vantagens sobre plantas, por não serem afetadas por condições climáticas, assim podendo ser cultivadas em diversos tipos climáticos. Já para Afonso (2017) as leveduras possuem um maior número de espécies com potencial para a produção de óleo microbiano além de ter uma melhor composição de triglicerídeos.

3.1.1 *Rhodospiridium toluroides*

“Esta levedura pertence a ordem *Sporidiobolales*, filo *Basidiomycota* e reino *Fungi*, e é um telemorfo das leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula gracilis*. Foi primeiramente reportada por Banno em 1967 e isolada a partir de coníferas” (AFONSO, 2017, p. 11). Ao revisar estudos anteriores sobre a taxonomia de diversos microrganismo Sitepu et al. (2014) afirma que as espécies de leveduras *Rhodosporidium toruloides* e *Rhodotoruloa gracilis* são sinônimos para a mesma levedura. O quadro 1 demonstra a taxonomia da levedura *Rhodosporidium toruloides*, assim como seus nomes conhecidos.

Quadro 1 - Taxonomia da levedura *Rhodosporidium toruloides*

Nome científico	<i>Rhodosporidium toruloides</i>
Sinônimo	<i>Rhodotorula gracilis</i>
Outros nomes	<ul style="list-style-type: none"> • CBS 6016 • IFO 8766 • IGC 5615 • NRR Y-6987 • <i>Rhodoturola rubescens</i> • <i>Rhodoturola toruloides</i> • <i>Rhodoturola toruloides</i> (I. Banno) Q.M. Wang, F. Y. Bai, M. Groenew. E Boekout, 2015.
Linhagem	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Fungi</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Dikarya</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Basidiomycota</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Pucciniomycotina</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Microbotryomycetes</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Sporidiobolales</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Sporidiobolaceae</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Rhodotorula</i>

Fonte: adaptado de UniProt Knowledgebase (2018).

A levedura *Rhodosporidium toluroides* vem sendo alvo de diversos estudos devido ao seu potencial de acumular lipídios. Estudos demonstram que sua capacidade varia entre 7% a 79% do peso seco da sua biomassa como relatado por Afonso (2017). A forma característica da levedura é de pequenas esferas com alguns micrômetros de comprimento sendo a forma de reprodução a divisão por brotamento,

além disso possui uma cor característica, cor-de-rosa ou avermelhada, devido a pigmentação causada pela produção natural de carotenoides.

Os carotenoides presentes segundo Afonso (2017), são em sua maioria β -caroteno e podem ser usados como pigmentos naturais, precursor da vitamina A e ainda como antioxidante, além de produzir outros compostos biotecnológicos de interesse e valor comercial. Como são produtoras naturais de carotenoides, evidenciada pela cor vermelha presente nas células para Park, Nicaud e Ledesma-amaro (2018), elas podem ser usadas comercialmente como fonte de pigmentos, com aplicação em diversos setores como o cosmético e alimentício. A *Rhodospiridium toluroides* para Silva (2014) está entre as melhores produtoras de carotenoides, além de relatar que até 90% dos carotenoides produzidos são torularrudina, toruleno, γ -caroteno, β -caroteno. A Tabela 2 traz uma breve comparação da concentração de carotenoides produzidos por diferentes microrganismos.

Tabela 1 - Comparação da produção de carotenoides por diferentes microrganismos

Microrganismo	Substrato	Carotenoides (mg/L)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glicose	0,63
<i>Rhodotorula graminis</i>	Glicose	1,47
<i>Rhodotorula toluroides</i>	Glicose (batch)	1,31
<i>Rhodotourla toluroides</i>	Glicose (fed batch)	27,50
<i>Rhodotorula paludigenum</i>	Glicerol	2,99
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Glicose	0,63
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Glicose	0,61
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Glicerol	1,48

FONTE: adaptado de Park, Nicaud e Ledesma-amaro (2018)

3.1.2 Produção e Acúmulo de Lipídios

A síntese lipídica, a qual é responsável pelo acúmulo de lipídios ocorre em todos os microrganismos, mesmo nos microrganismos que não são considerados oleaginosos, a grande diferença entre os microrganismos oleaginosos e os não oleaginosos é a capacidade de acúmulo desses lipídios. Enquanto que os microrganismos não oleaginosos conseguem acumular até entorno de 10% da sua biomassa seca na forma de lipídios, alguns microrganismos oleaginosos como

reportado por Ratledge (2014) conseguem acumular acima de 70% de lipídios como reserva energética, na Tabela 1 pode ser observado a concentração de biomassa e de lipídios para alguns microrganismos de acordo com o substrato utilizado.

Tabela 2 - Comparação da capacidade de produção de lipídios entre diferentes microrganismos

Microrganismos	Biomassa seca (g/L)	Lipídios (%)	Substrato
<i>Rhodotorula toluroides</i>	15,8	65,2	Glicose
<i>Yarrowia lipolytica</i>	6,5	30,7	Glicerol
<i>Lipomyces starkeyi</i>	20,5	61,5	Glicose + xilose
<i>Magnusiomyces capitatus</i>	15,4	43,1	Glicose
<i>Candida</i> sp. 107	18,1	37,1	Glicose
<i>Cutaneotrichosporon curvatus</i>	118,0	25,0	Glicerol
<i>Cutaneotrichosporon curvatus</i>	10,2	33,2	Glicose
<i>Rhodotorula glutinis</i>	22,2	25,0	Glicerol

FONTE: adaptado de Park, Nicaud e Ledesma-amaro (2018).

“A acumulação de lipídios nos microrganismos há muito tempo é conhecida e ocorre a partir do desequilíbrio de um nutriente no meio de cultura” (RATLEDGE e WYNN, 2002, p. 13). Segundo Ratledge (2004) é necessário que o microrganismo cresça em um meio com excesso de carbono e uma quantidade limitada de nitrogênio, entretanto outros nutrientes podem ser o fator limitante. Afonso (2017) relata que o nutriente limitante geralmente é o azoto, um dos principais nutrientes para a multiplicação celular durante a fase exponencial de crescimento. Portanto quando ocorre o esgotamento do nitrogênio, fonte de azoto, no meio de cultura do microrganismo oleaginoso juntamente com o excesso de carbono, o microrganismo utiliza o carbono presente no meio de cultura e o transforma em reserva energética sobre a forma de lipídios. “A taxa de lipídio acumulado em microrganismos oleaginosos tipicamente aumenta durante a limitação de nitrogênio assimilando o excesso de carbono, mas a divisão celular é inibida, afunilando o carbono em triglicerídeos” (DONG et al., 2016, p. 1).

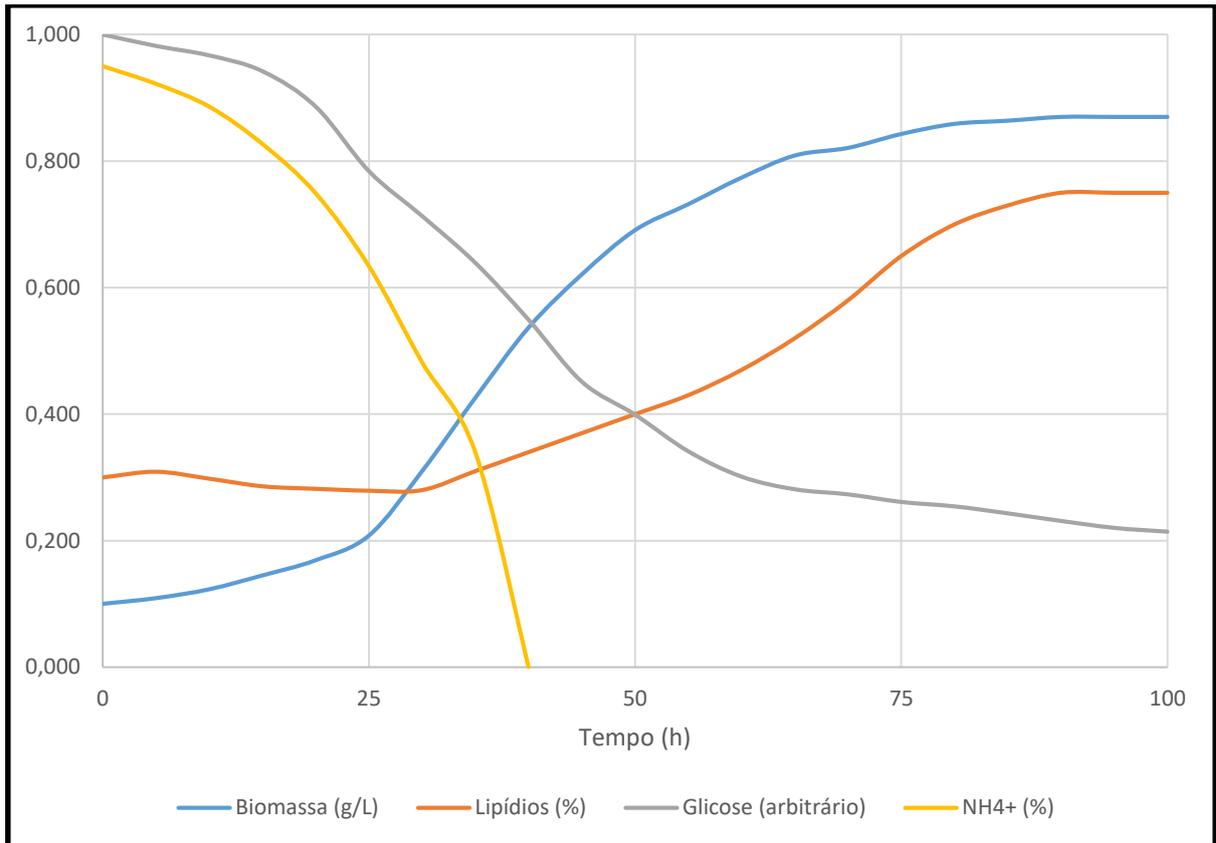
Os lipídios acumulados são encontrados no citosol das células e são majoritariamente triglicerídeos (TAG), entrono de 90%, como explicitado por Afonso (2017), enquanto que para Dong et al. (2016) os lipídios se acumulam majoritariamente não só sobre a forma de triglicerídeos, mas também como ácidos graxos livres, lipídios polares, hidrocarbonetos e pigmentos. Ainda em sua revisão

Dong et al. (2016) relata que os lipídios assim como a sua composição nos microrganismos, podem variar de acordo com o metabolismo de cada microrganismo, sendo que o metabolismo pode ser manipulado através das condições de cultivo como temperatura, fase de crescimento na coleta, nutrientes presentes e pH.

Os TAG constituintes dos lipídios neutros intracelulares de microrganismos oleaginosos são em sua maioria compostos por ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido linoleico, tendo assim uma composição similar aos TAGs encontrados em óleos vegetais, como óleo de soja ou de girassol (AFONSO, 2017, p. 9).

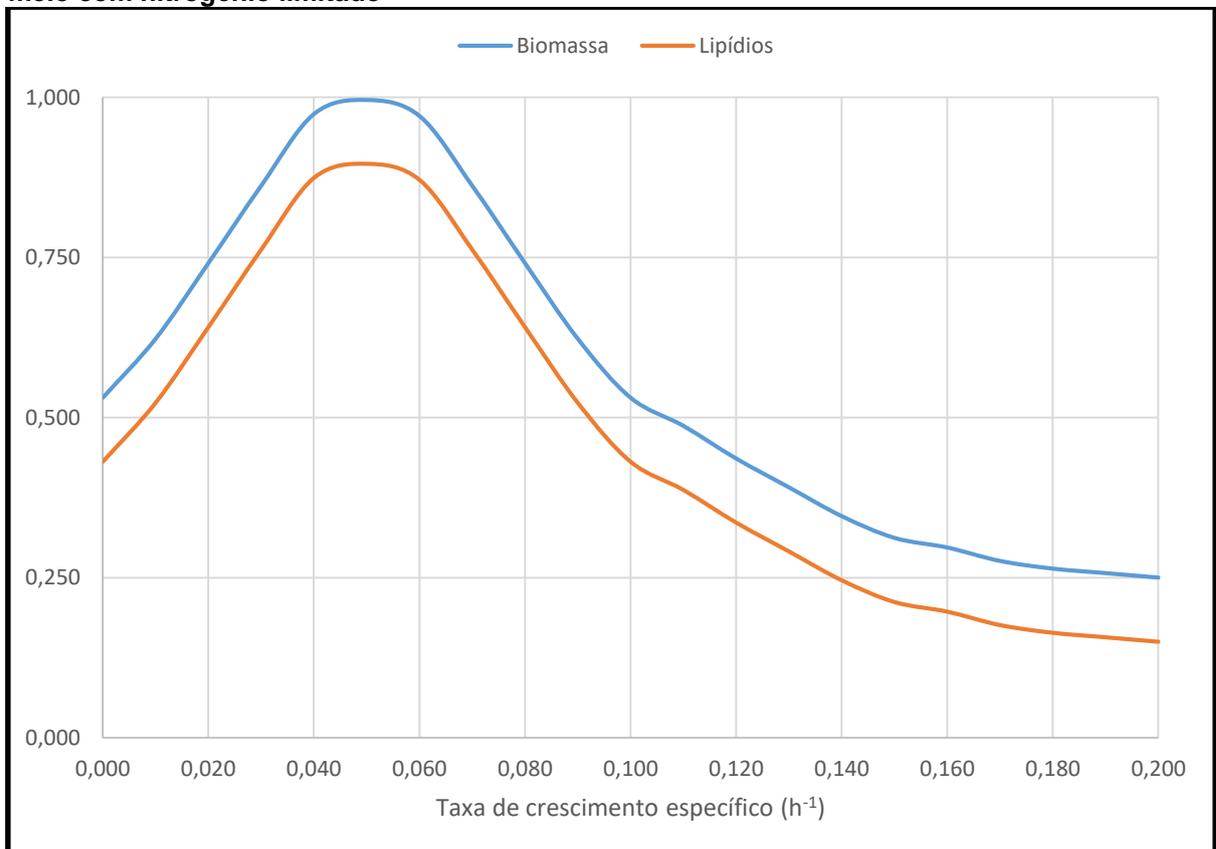
A fase de crescimento em que ocorre o acúmulo de lipídios em microrganismos tem seu início na fase exponencial tardia, quando ocorre limitação do nutriente azoto no meio de cultura e se prolonga na fase estacionária de crescimento, sendo as mesmas fases de produção e acúmulo de carotenoides segundo Freitas et al. (2014), assim produzindo dois compostos de interesse. As figuras 1 e 2 comparam o crescimento de biomassa, lipídios e a limitação de nitrogênio, que nesse caso seria o nutriente limitante ou azoto.

Figura 1 - Representação esquemática do curso de acumulação de lipídios em microrganismos oleaginosos



FONTE: adaptado de Ratledge e Wynn (2002).

Figura 2 - Modelo de acúmulo de lipídios de leveduras e fungos filamentosos crescendo em meio com nitrogênio limitado



FONTE: adaptado de Ratledge e Wynn (2002).

3.2. MEIOS DE CULTURA OU DE CULTIVO

“Os meios de cultura microbiológicos consistem de várias substâncias nutritivas que permitem o desenvolvimento de tipos particulares de microrganismos” (PELCZAR; REID; CHAN, 1980, p. 44). Os meios de cultura utilizados devem necessariamente conter uma diversidade de nutrientes para que ocorra a multiplicação e manutenção dos microrganismos, sendo que de acordo com Borzani et al. (2001) a quantidade de cada elemento é variável para cada microrganismo específico, mas geralmente a composição do meio de cultivo está relacionada com a fonte de carbono, a qual é responsável pela principal fonte de energia para os microrganismos.

Segundo Borzani et al. (2001) existe uma grande variedade de tipos nutritivos, portanto não há um meio de cultivo universal, pois o que é necessário a um microrganismo pode inibir o crescimento de outros tipos de microrganismos. Assim se faz necessário conhecer as características fisiológicas e bioquímicas do microrganismo, bem como a sua composição, para poder formular e otimizar apropriadamente o meio de cultivo. A Tabela 3 nos traz a composição elementar de bactérias e fungos, a qual pode ser encontrada na literatura ou determinada de acordo com Bastos (2010).

Tabela 3 - Composição média de bactérias e leveduras em base seca.

Elemento	Bactérias (%)	Leveduras (%)
C	53	47
O	20	30
N	12	7,5
H	7	6,5
P	3	1,5
S	1	1
Mg	0,5	0,5
Cinzas (P, Mg, Cu, Ca, Co, Fe, Mn, Mo)	7	8

Fonte: Bastos (2010).

Os meios de cultivos podem ser distinguidos em duas grandes classes de acordo com Borzani et al. (2001), em meios sintéticos e em meios complexos. Para

ser considerado um meio sintético, a sua composição precisa ser muito bem conhecida, tanto quantitativamente quanto qualitativamente. Os meios complexos não possuem todos os seus componentes conhecidos de forma precisa, um clássico exemplo ocorre na utilização de extrato de levedura como um dos componentes do meio de cultivo. O extrato de levedura não tem definido todos os elementos em sua composição química de forma precisa, sendo utilizado para enriquecer o meio devido à sua grande variedade de nutrientes.

As condições sob a qual está o meio de cultivo são tão importantes quanto, pois segundo Pelczar, Reid e Chan (1980) não somente o crescimento, mas também a inibição dos microrganismos é influenciada pelas condições físicas a qual o meio de cultivo está exposto. De acordo com Borzani et al. (2001), os principais parâmetros físico-químicos que devem ser observados para as condições do meio de cultivo são o pH, a temperatura, agitação e aeração. Há outros parâmetros que podem ser observados como a concentração de reagentes, densidade da biomassa, o estado físico do meio de cultivo, mas depende da relevância desse parâmetro e sua interferência no meio de cultivo para o crescimento do microrganismo. “Assim, é necessário fornecer condições ambientais diferentes para o cultivo de cada tipo fisiologicamente diverso” (PELCZAR; REID; CHAN, 1980, p. 45).

3.3. PROCESSOS FERMENTATIVOS

“O termo fermentação é derivado do latim *fervere*, que significa ferver, devido à aparência da produção de gás carbônico pela ação de leveduras sobre extrato de frutas de grãos maltados” (BASTOS, 2010, p. 13). O termo fermentação era adotado, a princípio, apenas para processos anaeróbios sendo expandido posteriormente a outros processos microbiológicos segundo Borzani et al. (2001). Atualmente a definição de fermentação ou processo fermentativo está relacionada com a abordagem adotada para o processo microbiológico, geralmente envolve crescimento e desenvolvimento de microrganismos em processos industriais de acordo com Bastos (2010), tendo como objetivo principal o acúmulo de biomassa ou a formação de compostos de interesse. Bioquimicamente segundo Bastos (2010) a fermentação é o processo de conversão de compostos orgânicos complexos em compostos mais simples. Há diversos exemplos dessas conversões, mas a mais comum é o da fermentação alcoólica, no qual ocorre a transformação de açúcares em etanol.

“As fermentações industriais são caracterizadas pelo desenvolvimento de atividade econômica por microrganismos, para multiplicá-los ou para que produzam metabólitos úteis” (SCHMIDELL et al., 2001, p. 425). Segundo Bastos (2010), os objetivos dos processos fermentativos para a indústria podem ser a própria biomassa, a produção de enzimas, produção de metabólitos microbianos, obtenção de produtos recombinantes, a transformação ou conversão de compostos. O processo fermentativo pode ser dividido em seis etapas fundamentais de acordo com Bastos (2010), sendo elas:

- a) A formulação do meio de cultivo durante o desenvolvimento do inoculo;
- b) A esterilização do meio, do fermentador e do material auxiliar;
- c) A produção de cultura pura suficiente para inocular o tanque;
- d) O crescimento do microrganismo dentro do biorreator;
- e) A extração do produto e sua purificação;
- f) O destino dos efluentes produzidos no processo.

3.4. ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO

A produção de fermentado vem sendo realizado desde a antiguidade, principalmente para a produção de alimentos como a cerveja, queijos e vinhos. De acordo com BASTOS (2010), os processos fermentativos ocorrem nos chamados biorreatores, fermentadores ou dornas, ou seja, recipientes onde ocorrem reações bioquímicas que são catalisadas por enzimas ou envolvem o crescimento de microrganismo. Segundo Schmidell et al. (2001) são considerados biorreatores, os reatores nos quais as reações químicas que acontecem são catalisadas por biocatalisadores, sendo que esse biocatalisadores podem ser células de animais, vegetais ou microrganismos.

Segundo Bastos (2010) os biorreatores podem ter características e configurações diferentes, devido principalmente ao tipo de microrganismo utilizado, além de visar a otimização do meio de cultivo através do controle de parâmetros físico-químicos. Com isso os biorreatores podem ser classificados conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Classificação geral dos biorreatores

<p>(I) Reatores em fase aquosa (fermentação submersa)</p> <p>(I.1) Células/enzimas livres</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reatores agitados mecanicamente (STR) • Reatores agitados pneumaticamente <ul style="list-style-type: none"> ○ Coluna de bolhas ("bubble column") ○ Reatores "airlift" • Reatores de fluxo pistonado ("plug flow") <p>(I.2) Células/enzimas imobilizadas em suportes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reatores com leito fixo • Reatores com leito fluidizado • Outras concepções <p>(I.3) Células/enzimas confinadas entre membranas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reatores com membranas planas • Reatores de fibra oca ("hollow-fiber")
<p>(II) Reatores em fase não-aquosa (fermentação-sólida)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reatores estáticos (reatores com bandejas) • Reatores com agitação (tambor rotativo) • Reatores com leito fixo • Reatores com leito fluidizado gás-sólido

Fonte: adaptado de Schmidell et al. (2001).

Dentro dessa classificação geral dos reatores ainda existem outras subdivisões de acordo com a configuração adotada. Segundo Schmidell et al. (2001) os reatores mecanicamente agitados, ou stirred tank reactor (STR), são os biorreatores mais utilizados industrialmente.

As estratégias para a produção de fermentados ou processos fermentativos podem variar muito para cada tipo de microrganismo e produto desejado. As estratégias principais e mais utilizadas em processos fermentativos são a batelada e batelada alimentada. A estratégia de produção de forma batelada consiste em adicionar todo o material necessário, como o meio de cultivo e inóculo, no início do processo, sendo que os produtos obtidos são retirados somente no final do processo.

Schmidell et al. (2001) destaca que os processos conduzidos de forma batelada são importantes para o conhecimento básico da cinética do processo. Outras formas de processos fermentativos, seja batelada alimentada ou contínua, partem de um estudo prévio e bom conhecimento do processo de forma batelada. Os processos de fermentação batelada podem apresentar baixos rendimentos de acordo com Bastos (2010), pois quando o substrato é adicionado de uma única vez pode causar efeitos indesejados como a inibição ou o desvio do metabolismo, resultando em produtos indesejados e baixa produtividade.

Schmidell et al. (2001) define o processo de batelada alimentada ou descontínuo alimentado como uma técnica, na qual um ou mais nutrientes são adicionados ao meio em fermentação e permanecem até o final do processo fermentativo. A alimentação no processo batelada alimentada pode ser feita de duas maneiras segundo Pacheco (2010), de modo contínuo ou de forma intermitente. Quando a alimentação ocorre de forma contínua, o material a ser inserido ao processo entra de forma uniforme durante todo o período, enquanto que a alimentação por pulso ou intermitente, ocorre de maneira a inserir uma determinada quantidade do material desejado em um intervalo de tempo.

O controle da alimentação permite o deslocamento do metabolismo do microrganismo para não somente para obter o produto final de interesse, mas também para aumentar a sua produção. Para Schmidell et al. (2001) os processos que se visam a obtenção de alta densidade de células, a presença ou a produção de compostos tóxicos podem ser críticas, por isso o controle da alimentação ao meio impede que esses compostos tóxicos alcance níveis críticos inibindo e prejudicando o crescimento do microrganismo, além disso permite que a velocidade do crescimento do microrganismo se mantenha, aumentando a concentração de células e do produto.

3.5. QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA

Existem diversos métodos que podem ser encontrados na literatura para a quantificação de microrganismo, tanto quanto ao número de células quanto a sua biomassa. Segundo Sarrafzadeh et al. (2015) diversos métodos para medir a biomassa têm sido extensivamente desenvolvidos e aplicados, sendo que a concentração de células pode basicamente ser quantificada como massa de células ou como número de células.

De acordo com Begot et al. (1996) a quantificação de biomassa envolvendo processos onde ocorre o crescimento de microrganismo, se mostra importante para realizar diversas análises e acompanhar o crescimento microbiano. Sarrafzadeh et al. (2015) relata que a concentração de biomassa é um dos mais importantes parâmetros nos processos biotecnológicos, a sua medida depende das propriedades físico, química e biológica das células. A partir dessas análises é possível, principalmente, construir a curva de crescimento e em experimentos posteriores acompanhar em qual

fase de crescimento do microrganismo o processo se encontra. Além disso, é possível verificar se não há problemas acontecendo e tomar as medidas corretivas.

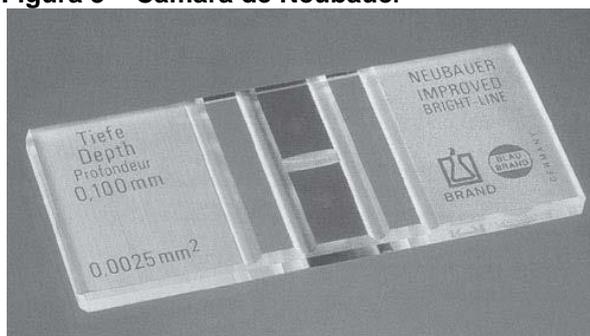
O rendimento e produtividade dos bioprocessos, processos que envolvem microrganismo, muitas vezes está relacionada com a quantidade de biomassa presente durante o processo ou a quantidade de biomassa acumulada ao final do processo.

A pesagem direta da biomassa de uma amostra com cultura é simples e mais confiável quando relativamente uma grande quantidade de amostras são avaliadas. Células em amostra líquida podem ser separadas do meio e pesadas depois de secas. Alternativamente, o número de células pode ser contado com a ajuda de microscópio utilizando um hemacitômetro ou com um contador automático de células (SARRAFZADEH et al., 2015, p. 1).

3.5.1 Contagem de Células

“O número de organismo unicelulares em suspensão pode ser determinada microscopicamente pela contagem de células individuais em um volume pequeno muito bem determinado” (STANIER et al., 1987, p. 187). Segundo Lucarini, Silva e Bianchi (2004) a contagem de células ao microscópio é um dos métodos para determinar e estimar a concentração de células do microrganismo em suspensão no meio e para realizar essa contagem utiliza-se a Câmara de Neubauer (Figura 4) que é conhecida também por câmara de contagem ou hemacitômetro, pois foi desenvolvida para a contagem de células no sangue. Borzani et al. (2001) ressalta que a contagem do número total de células envolve a contagem de células vivas e mortas, sendo que em amostras líquidas essas contagens são expressas em número de células por mililitro.

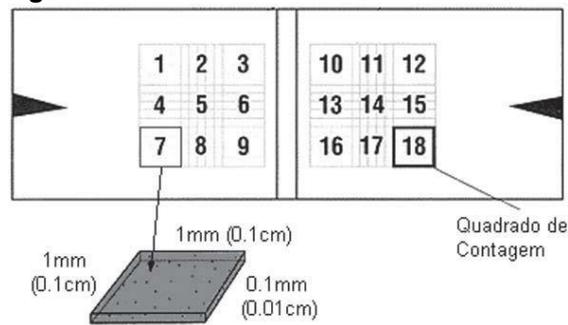
Figura 3 – Câmara de Neubauer



Fonte: Lucarini, Silva e Bianchi (2004)

A Câmara de Neubauer consiste de uma lâmina de microscopia, com espessura maior que uma lâmina padrão, onde existe uma câmara gravada no vidro (LUCARINI; SILVA; BIANCHI, 2004, p. 37). Ainda segundo Lucarini, Silva e Bianchi (2004), cada lâmina possui duas câmaras (partes escuras da Figura 4), as quais possuem marcações que dividem a câmara em diferentes quadrados para a realização da contagem. De acordo com Borzani et al. (2001) uma lamínula deve ser posicionada nas laterais da câmara e sobre as marcações gravadas na câmara conforme a Figura 5.

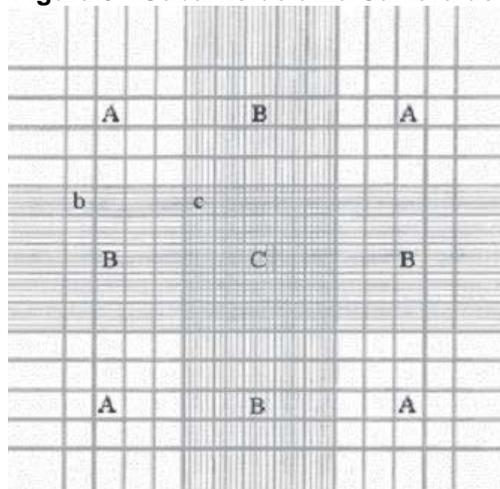
Figura 4 - Área sob a lamínula



Fonte: Lucarini, Silva e Bianchi (2004)

Seguindo o gabarito de uma Câmara de Neubauer (Figura 6) que é explicitado por Lucarini, Silva e Bianchi (2004), a contagem de células pode ser realizada em três tipos diferentes de quadrados, devido ao fato das marcações na Câmara de Neubauer possuírem dimensões diferentes, permitindo assim que a contagem de células possa ser realizada para células de diferentes tamanhos.

Figura 5 - Gabarito de uma Câmara de Neubauer



Fonte: Lucarini, Silva e Bianchi (2004)

O volume contido em cada área pode ser determinado de acordo com Lucarini, Silva e Bianchi (2004) e Borzani et al. (2001), pois as dimensões de cada quadrante de contagem são conhecidas, assim como a altura da solução disposta na câmara, permitindo dessa forma determinar com exatidão o volume de cada área, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Área e volume de cada quadrante

Quadrante	Área (mm ²)	Volume (mm ³)
A (quadrantes maiores)	0,0625	0,00625
B (retângulos)	0,0125	0,00125
C (quadrados menores)	0,0025	0,00025

Fonte: Lucarini, Silva e Bianchi (2004).

Existem diversas formas de realizar a contagem, mas sempre é necessário determinar qual padrão será utilizado e segui-lo durante todo experimento. Para realizar a contagem deve-se determinar a quantidade de quadrados a serem contados, sempre sendo de forma simétrica, como uma diagonal ou os quadrados mais externos. Além disso também deve-se determinar como as células encontradas em cima das marcações serão consideradas, deve adotar-se pelo menos duas marcações de cada quadrado como válidos para a contagem e sempre seguir esse padrão durante toda a contagem.

A partir da quantidade de células determinada para cada quadrante juntamente com o seu volume conhecido, permite que a concentração de células por mm³ seja encontrada, e segundo Lucarini, Silva e Bianchi (2004) e Borzani et al. (2001) o resultado é obtido ao fazer a contagem para diversos quadrantes, determinar as suas concentrações e obter uma média de concentrações para aquela amostra.

3.5.2 Peso Seco da Biomassa

Para Borzani et al. (2001) as estimativas obtidas com medidas da massa de material úmido não são precisas, devido à dificuldade de quantificar a água presente no material, principalmente intracelular, por isso a utilização da biomassa seca tem sido adotada, por fornecer dados mais precisos e proporcionais de biomassa. “A única forma direta de medir a massa de células é através da determinação do peso seco

celular em um volume fixo da cultura pela remoção das células do meio, secando elas, e então pesando elas” (STANIER et al., 1987, p. 186).

Segundo Zhu e Lee (1997) a quantificação de biomassa seca de células, envolve coletar uma alíquota de uma cultura em suspensão, secando a amostra para um peso constante e expressando o seu valor como peso seco de biomassa por volume da amostra, sendo esse método um importante parâmetro para estimar a concentração de biomassa e produtividade. Para facilitar o processo de secagem da amostra alguns métodos podem ser utilizados, como a centrifugação ou a filtração, a fim de separar as células do microrganismo da solução a qual se encontra, sendo a amostra então levada a uma estufa ou forno até o seu peso ser constante. A diferença entre as massas obtidas de cada amostra corresponde ao aumento da biomassa no meio como evidenciado por Rodrigues (2002).

3.5.3 Turbidimetria

Segundo Begot et al. (1996), a turbidimetria é um método estabelecido utilizado para estudar o crescimento de microrganismo desde que a medição da densidade óptica torna isso possível, permitindo acompanhar o crescimento microbiano em tempo real. Ainda de acordo com Begot et al. (1996) diversos outros métodos são usados para acompanhar o crescimento microbiano, mas eles não apresentam um resultado imediato e consomem muito tempo, especialmente quando um grande número de dados é necessário.

Turbidimetria - permite medir o aumento da biomassa em função da luz dispersa por uma suspensão de células. O aumento de turvação verificado ao longo do crescimento pode ser determinado a partir de medições de densidades ópticas em um espectrofotômetro de ultravioleta / visível a um comprimento de onda que corresponde a absorção máxima (RODRIGUE, 2002, p. 29).

Para Borzani et al. (2001), a turvação apresentada para um determinado microrganismo corresponde a turvação de uma suspensão com número conhecido de células, sendo que a turvação da amostra é comparada visualmente com a de um determinado tubo da série padrão, sendo possível a determinação da concentração

de células ou da biomassa da amostra através de uma tabela ou curva de turbidez que acompanha o conjunto de tubos padrões.

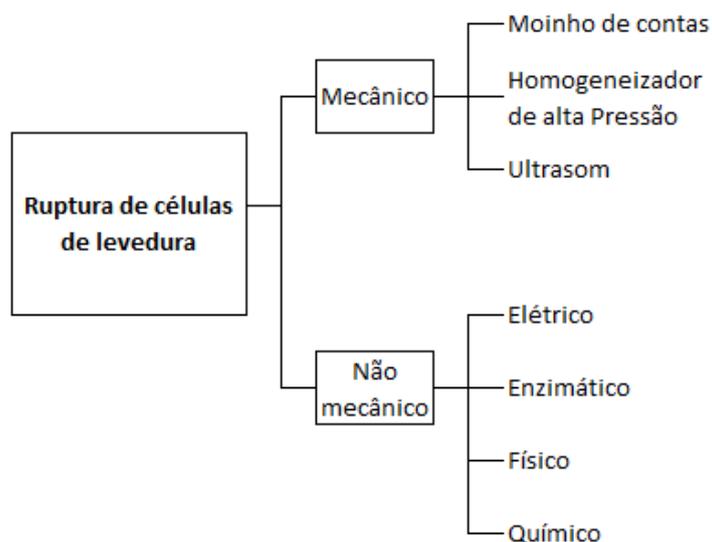
3.6. OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS

“A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas constitui-se numa das etapas mais complexas do processo, dadas às variadas características do meio de cultivo e das biomoléculas de interesse” (BASTOS, 2010, p. 143). A importância dos produtos biotecnológicos é relatada por Borzani et al. (2001) como o incentivo ao desenvolvimento de vários processos de purificação, devido ao fato da grande variedade de produtos produzidos além da sua localização na célula. “Como resultado dessa diversidade não há processos de purificação de aplicação geral” (SCHMIDELL et al., 2001, p. 493).

Os microrganismos são capazes de sintetizar tanto produto extracelular quanto produto intracelular de acordo com Yellapu et al. (2018), quando o produto é extracelular ele pode ser facilmente separado por filtração ou centrifugação, enquanto que a recuperação de produtos intracelulares necessita do rompimento ou enfraquecimento da parede celular. Sitepu et al. (2014) e Park et al. (2017) evidenciam em seus estudos que a levedura *Rhodospodium toruloides* acumula lipídios de forma intracelular. Com a definição da localização do produto de interesse é possível realizar a escolha do método que será usado para a sua recuperação.

Quando o produto de interesse, no caso lipídios, se encontra de forma intracelular, é necessário e crucial realizar o rompimento da parede celular para que os lipídios intracelulares possam ser recuperados conforme explicitado por Yellapu et al. (2018). Segundo Dong et al. (2009) a ruptura da parede celular geralmente se faz necessária para os lipídios intracelulares serem tornarem mais acessível na extração por solventes. “A liberação de compostos intracelular requer a destruição de compostos que fornecem forças a parede celular das leveduras” (LIPKE, OVALLE, 1998 *apud* LIU et al., 2016, p. 183). Segundo Liu et al. (2016) os métodos para a ruptura da parede celular podem ser classificados em mecânicos e não mecânicos, conforme a classificação apresentada na Figura 8.

Figura 6 – Classificação dos métodos para rompimento celular em leveduras



Fonte: Liu et al. (2016)

Os métodos não mecânicos segundo Liu et al. (2016) são mais seletivos e sutis, sendo geralmente usados em escalas laboratoriais. A extração de lipídios de forma satisfatória pode ser obtida segundo Jacob (1992) ao utilizar a hidrólise ácida das células, permitindo um acesso fácil aos lipídios intracelular para os sistemas de extração com solventes. Para Jacob (1992) o uso de células hidrolisadas com ácidos e uma subsequente extração com soxhlet utilizando solvente pode ter uma recuperação de lipídios satisfatória, além de que este procedimento tem a perda durante o processo minimizada.

4 METODOLOGIA

4.1. LEVEDURA

A levedura utilizada foi a *Rhodospiridium toluroides* DAEBB 5533, cedida pelo Laboratório de Processos Fermentativos da UFPR. A levedura foi incubada em Placas de Petri em meio sólido YM para a sua manutenção, sendo o meio YM composto por 3,0g/L de extrato de levedura e extrato de malte, 5,0g/L de peptona, 10,0g/L de dextrose e 20,0g/L de ágar. O repique da *Rhodospiridium toluroides* foi realizado mensalmente para sempre estar disponível colônias novas e livres de contaminação.

4.2. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo realizado foi composto por ureia, extrato de levedura, sulfato de magnésio, fosfato de potássio e sacarose. Para encontrar as melhores condições do meio de cultivo, assim otimizando o desenvolvimento e o crescimento da levedura e por consequência o acúmulo de biomassa e lipídios, foram realizados experimentos de forma a analisar as melhores concentrações de ureia e sacarose. A quantidade de inoculo utilizada para os experimentos na fase de otimização foi de 10ml de um meio cultivo líquido previamente preparado, sendo o meio de cultivo prévio preparado a partir de uma colônia das Placas de Petri utilizadas para a manutenção da *Rhodospiridium toluroides*.

A análise da concentração de ureia foi realizada de forma a manter os demais compostos do meio de cultivo fixos, sendo alterado a concentração de ureia para cada experimento, assim encontrando a máxima concentração de ureia tolerável e resultando em satisfatória duração da fase de crescimento exponencial da levedura.

Tabela 5 – Concentração de cada componentes nos experimentos realizados para obter a máxima concentração de ureia no meio

Experimentos		E1	E2	E3	E4	E5	E6
Ureia	(g/L)	0,00	1,00	3,00	5,00	10,00	3,00
Extrato de Levedura	(g/L)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Sulfato de magnésio	(g/L)	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Fosfato de potássio	(g/L)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sacarose	(g/L)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	80,00

Fonte: autoria própria.

A partir da determinação da concentração máxima de ureia, foi realizado o experimento para analisar a máxima concentração de sacarose no meio de cultivo, para a fase de crescimento exponencial da levedura. Nessa etapa foi mantido fixos os demais compostos, inclusive a concentração de ureia determinado no experimento anterior, e variando apenas concentração de sacarose no meio de cultivo.

Tabela 6 - Experimentos realizados para obter a melhor concentração de sacarose, os valores descritos como fixos são os resultados obtidos para a da máxima concentração de ureia.

Experimentos		E6	E7	E8	E9	E10
Ureia	(g/L)	Fixo	Fixo	Fixo	Fixo	Fixo
Extrato de Levedura	(g/L)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sulfato de magnésio	(g/L)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Fosfato de potássio	(g/L)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Sacarose	(C/N)	0/1	4/1	8/1	16/1	32/1

Fonte: autoria própria.

As análises da ureia e da sacarose ocorreram durante oito dias, sendo retiradas alíquotas entorno de 1ml como amostras nos dias 0, 2, 4 e 7 de cada concentração para a contagem de células e a construção da curva de crescimento para cada experimento. Estes experimentos foram realizados em frascos agitados utilizando uma estratégia de batelada. Para isso foram utilizados erlenmeyers de 250ml contendo o meio de cultivo e o inoculo com um volume total útil de 100ml, os quais foram levados a um shaker e mantidos com agitação de 120 rpm e com controle de temperatura mantido em 30°C.

O método escolhido para os experimentos que visam a otimização do meio de cultivo foi a contagem de células através da Câmara de Neubauer, a qual permitiu acompanhar o desenvolvimento da levedura ao longo do tempo, além de ser possível a visualização de contaminantes presentes na amostra.

A contagem de células ocorreu nos quadrantes um, três, sete e nove de forma diagonal de cima para baixo e da esquerda para direita conforme a Figura 5. Sendo considerado dentro do quadrante as células que estão nas bordas superior e direita de cada quadrado contado.

4.3. ESTRATÉGIA BATELADA ALIMENTADA

Para a produção de SCO foi utilizada a estratégia de batelada alimenta, sendo utilizado um biorreator mecanicamente agitado com aeração do seguinte modelo TEC-Bio-3,0V (Tecnal, Brasil), operado com taxa de aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto).

O biorreator utilizado possui um volume total de 2,5L, mas foi utilizado um volume útil de 1,5L, para garantir a segurança e um bom controle do meio fermentativo, além de evitar que a espuma formada durante o processo provoque mau funcionamento dos sensores presentes dentro do biorreator.

Para um volume total de 1,5L, foi preparado um volume de 300ml de inoculo de forma batelada com um sistema de aeração utilizando bombas de aquários, sendo o meio de cultivo do inoculo o mesmo que será utilizado no biorreator. O meio de cultivo foi preparado utilizando a mesma concentração dos nutrientes conforme os resultados obtidos na otimização do meio de cultivo, sendo que foi preparado um volume total de 1,2L. O meio de cultivo foi esterilizado previamente em autoclave

assim como todo o material que foi necessário, como soluções para o controle de pH e antiespumante.

Para o controle de pH foram utilizadas soluções de 1M de NaOH e de H₃PO₄, mantendo o valor de pH em 5,0±0,2. Para o controle de temperatura foi utilizada uma manta térmica e um banho frio e controle da temperatura o qual foi realizado automaticamente através de um termostato presente no meio, sendo a temperatura ajustada para a temperatura de 30°C. A agitação foi mantida por controle tipo cascata com o oxigênio dissolvido, o qual foi de no mínimo 30%, com agitação entre 100 e 500rpm.

A alimentação contendo o meio de cultivo foi realizada de forma intermitente, mas especificamente por pulso de forma sempre manter a concentração ótima para a produção de SCO. Para isso foi utilizado duas alimentações com alta concentração de ureia e sacarose, previamente determinada de acordo com os experimentos anteriores, devido ao fato de ocorrer a diluição dessa concentração no volume do meio fermentativo. A alimentação foi trocada por uma solução com alta concentração de sacarose, interrompendo o crescimento da levedura e iniciando o processo de acúmulo de lipídios.

A produção de SCO através da batelada alimentada teve o tempo de 144 horas e 40 minutos ao todo, sendo realizada a coleta de amostras com entorno de 40ml para acompanhar o crescimento e acúmulo da biomassa e para a construção da curva de crescimento do microrganismo. As amostras foram coletadas uma vez por dia e após cada alimentação para a realização de análises de turbidimetria, peso seco e contagem de células.

4.4. OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS

A extração dos lipídios das células do microrganismo foi realizada através do método desenvolvido por Dalmas Neto et al. (2019). Resumidamente, consiste do rompimento da membrana celular, realizando-se a hidrólise provocada por utilização de ácidos minerais, de forma a liberar o óleo intracelular, seguido de uma recuperação em um extrator utilizando solventes.

Ao término da fermentação, o lodo contendo alta concentração de células foi recuperado e hidrolisado a pH 2,0 utilizando ácido clorídrico (HCl) e colocado em autoclave (15min, 121°C). Após a hidrólise os lipídeos intracelulares foram

recuperados através de extração líquido-líquido com clorofórmio. Após separação das fases, os lipídios extraídos foram quantificados após secagem em estufa a 80°C por 24h.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

O primeiro passo realizado foi a determinação da tolerância de ureia no meio de cultivo. A ureia é importante para o meio de cultivo pois é uma fonte de nitrogênio, um dos elementos essenciais para a multiplicação e crescimento celular da levedura *Rhodospiridium toluoides*. Porém a ureia pode ser tóxica em altas concentrações, pois libera amoníaco durante seu processo de degradação, sendo um fator de morte celular e impeditivo de crescimento da levedura no meio de cultivo, assim se faz necessário conhecer qual a concentração máxima de ureia que pode ser utilizado, de forma a proporcionar o crescimento celular sem que ocorra a inibição ou morte do microrganismo. Sendo que a máxima concentração com relação a ureia foi

determinada através da fixação da quantidade dos outros nutrientes adicionados ao meio de cultivo sendo variada apenas as quantidades de ureia presente para cada meio de cultivo conforme o demonstrado na Tabela 5. Foi realizado também um experimento para analisar se a quantidade de ureia com relação a sacarose teria alguma influência sobre o meio de cultivo no experimento E6.

A quantificação de células de leveduras presente em cada meio de cultivo foi realizada através da Câmara de Neubauer, sendo realizada a contagem de células durante o período de oito dias conforme o Quadro 3 e o fator de diluição das amostras foi de um mililitro de amostra para 100ml no total (1/100). Para uma análise melhor os dados obtidos a partir da contagem de células pela Câmara de Neubauer foram convertidos para número de células por mililitros de caldo fermentado.

Com base nos dados obtidos a partir dos experimentos para a máxima concentração de ureia no meio de cultivo, foi possível construir Gráfico 1 de crescimento celular da levedura *Rhodospiridium toluroides*, o qual relaciona as concentrações iniciais da ureia com a quantidade de células para cada meio de cultivo de acordo com dia da contagem.

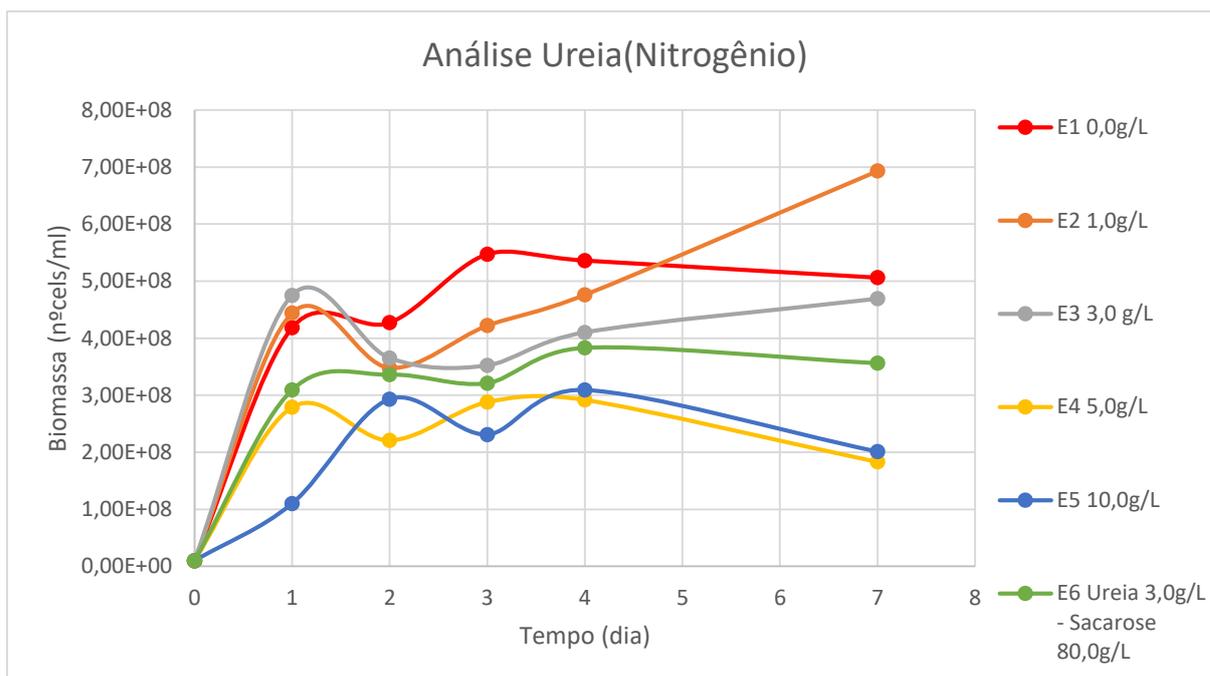
Quadro 3 – Dados obtidos para máxima concentração de ureia no meio de cultivo.

EX PE RI ME	EXPERIMENTO E1 - 0,0 g/L		
	Dia	nº de células	Células/ml
	0	61,8125	9,89E+06
	1	26,125	4,18E+08
	2	26,6875	4,27E+08
	3	34,1875	5,47E+08
	4	33,5	5,36E+08
	7	31,625	5,06E+08
EXPERIMENTO E2 - 1,0 g/L			
Dia	nº de células	Células/ml	
0	61,8125	9,89E+06	
1	27,75	4,44E+08	
2	21,75	3,48E+08	
3	26,375	4,22E+08	
4	29,75	4,76E+08	
7	43,3125	6,93E+08	
EXPERIMENTO E6 - 0,0 g/L			
Dia	nº de células	Células/ml	

	0	61,8125	9,89E+06
	1	29,6875	4,75E+08
	2	22,8125	3,65E+08
	3	22	3,52E+08
	4	25,625	4,10E+08
	7	29,3125	4,69E+08
EXPERIMENTO E4 - 5,0 g/L	Dia	nº de células	Células/ml
	0	61,8125	9,89E+06
	1	17,4375	2,79E+08
	2	13,8125	2,21E+08
	3	18	2,88E+08
	4	18,25	2,92E+08
	7	11,4375	1,83E+08
EXPERIMENTO E5 - 10,0 g/L	Dia	nº de células	Células/ml
	0	61,8125	9,89E+06
	1	6,875	1,10E+08
	2	18,3125	2,93E+08
	3	14,4375	2,31E+08
	4	19,3125	3,09E+08
	7	12,5625	2,01E+08
EXPERIMENTO E6 - Ureia 3,0 g/L - Sacarose 80,0 g/L	Dia	nº de células	Células/ml
	0	61,8125	9,89E+06
	1	19,3125	3,09E+08
	2	21	3,36E+08
	3	20,0625	3,21E+08
	4	23,9375	3,83E+08
	7	22,25	3,56E+08

Fonte: autoria própria.

Gráfico 1 – Relação da concentração de células ao longo do tempo para cada experimento descrito na Tabela 05.



Fonte: autoria própria.

Os dados obtidos a partir da Tabela 2 e do Gráfico 1, permite realizar uma série de análises. A primeira análise realizada, a partir dos experimentos E4 e E5, foi a identificação do limite de concentração de ureia que o meio de cultivo suporta, as curvas de crescimento celular apresentam menores números de células por mililitros entre os experimentos E4 e E5, então a concentração de ureia no meio de cultivo deve ser menor que cinco gramas por litro (5g/L). Analisando os dados obtidos para o experimento E3 e E6, fica evidente que não há relação entre a concentração da ureia com a concentração de sacarose presente inicialmente no meio de cultivo da levedura, pois as curvas de crescimento da levedura durante o período se mantêm próximas, além de obter resultados semelhantes.

A determinação da máxima concentração de ureia no meio de cultivo, para otimizar o crescimento celular, não ficou totalmente esclarecido. Assim foi necessário a realização de um segundo experimento para avaliar e determinar a máxima concentração de ureia no meio de cultivo, conforme a Tabela 7, repetindo os experimentos E1, E2 e E3.

Tabela 7 – Segundo experimento realizado para a máxima contração de ureia no meio de cultivo.

Experimentos	Er1	Er2	Er3
--------------	-----	-----	-----

Ureia	(g/L)	0	1	3
Extrato de Levedura	(g/L)	0,5	0,5	0,5
Sulfato de magnésio	(g/L)	1,5	1,5	1,5
Fosfato de potássio	(g/L)	1	1	1
Sacarose	(g/L)	40	40	40

Fonte: autoria própria.

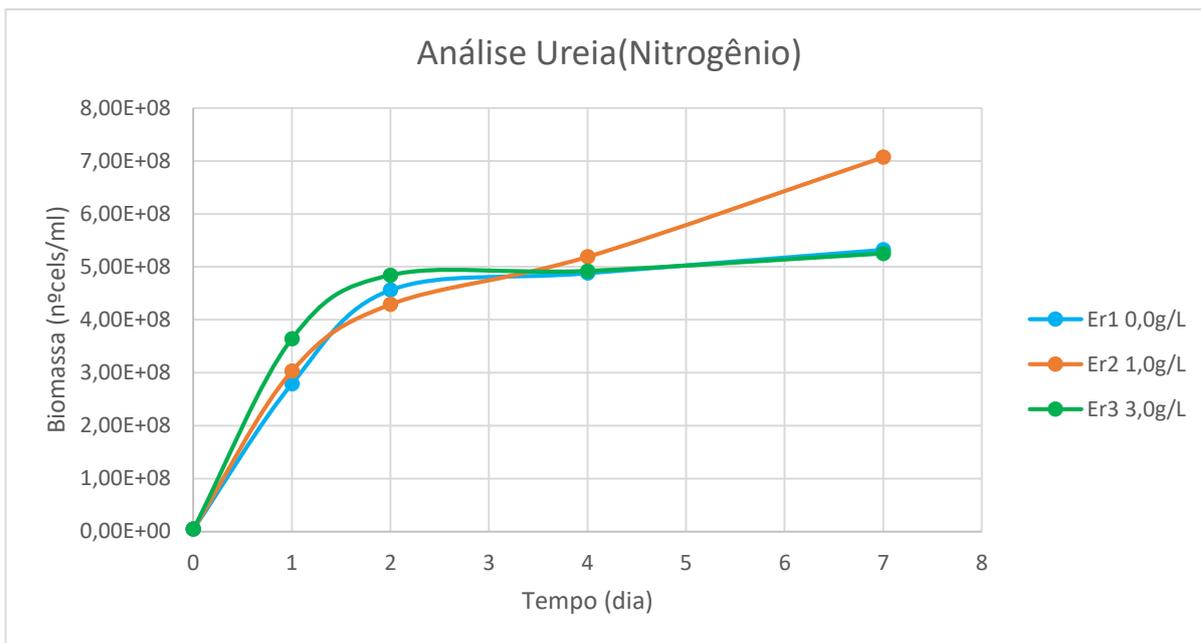
Os dados obtidos a partir do segundo experimento para a máxima concentração de ureia, demonstrados no Quadro 4, foram utilizados para a construção de uma segunda curva de crescimento celular da levedura *Rhodosporidium toluroides*, representada no Gráfico 2, sendo o fator de diluição o mesmo do experimento anterior.

Quadro 4 – Relação da quantidade de células quantificada de acordo com as concentrações iniciais em relação ao tempo para o segundo experimento para a máxima concentração de ureia no meio de cultivo.

EXPERIMENTO Er1 - Ureia 0,0 g/L	Dia	nº de células	Células/ml
	0	27,125	4,34E+06
1	17,4375	2,79E+08	
2	28,5	4,56E+08	
4	30,5	4,88E+08	
7	33,25	5,32E+08	
EXPERIMENTO Er2- Ureia 1,0 g/L	Dia	nº de células	Células/ml
	0	27,125	4,34E+06
1	18,9375	3,03E+08	
2	26,8125	4,29E+08	
4	32,4375	5,19E+08	
7	44,1875	7,07E+08	
EXPERIMENTO Er3 - Ureia 3,0 g/L	Dia	nº de células	Células/ml
	0	27,125	4,34E+06
1	22,75	3,64E+08	
2	30,25	4,84E+08	
4	30,75	4,92E+08	
7	32,8125	5,25E+08	

Fonte: autoria própria.

Gráfico 2 – Relação da quantidade de células quantificada de acordo com as concentrações iniciais em relação ao tempo.



Fonte: autoria própria.

Ao analisar os dados obtidos e a curva de crescimento da levedura, do segundo experimento realizado para determinar a máxima concentração de ureia, observa-se que a maior concentração de células ao final dos sete dias, foi o experimento Er2 com concentração inicial de uma grama por litro (1,0g/L) de ureia, seguido pelo experimento Er3 com concentração inicial de ureia de três gramas por litro (3,0g/L) de e o experimento Er1 com concentração inicial de ureia de zero grama por litro (0,0g/L), sendo que os experimentos Er1 e Er3 possuem resultados finais muito próximos. A curva de crescimento para o experimento Er1, mesmo não tendo ureia como fonte de nitrogênio no meio de cultivo, acontece devido ao fato de um dos componentes do meio de cultivo, extrato de levedura, possuir entre seus elementos o nitrogênio como descrito por Kaspro, Lange e Kirwan (1998), componente essencial para o crescimento o celular.

Dentre os resultados para máxima concentração de ureia no meio de cultivo foi determinada a concentração de três gramas por litro (3,0g/L) como a máxima concentração de ureia. Foi observado não somente a concentração em si, mas o comportamento da curva de crescimento em relação ao tempo. Portanto devido ao fato da certeza da presença de nitrogênio no meio de cultivo, assim não dependendo de uma fonte de nitrogênio não mensurável e também ao analisar a curva de crescimento, observa-se que uma maior quantidade de células por mililitro de caldo fermentado é obtida para o experimento Er3 em um tempo menor. Essa é uma

importante análise e informação, pois o objetivo na fase do biorreator será concentrar a maior quantidade de lipídios e para isso será necessário em um determinado período cessar o crescimento celular para iniciar o acúmulo de lipídios, assim até esse momento será importante o caldo fermentado possuir a maior concentração celular.

Após a determinação da máxima concentração de ureia no meio de cultivo, foi realizado um experimento para verificar a melhor concentração de carbono, neste caso sacarose, do meio de cultivo para o crescimento da levedura *Rhodospordium toluroides*. Sendo a condição do meio avaliada com relação a razão entre carbono e nitrogênio (C/N). Assim, foi fixada a concentração de ureia (nitrogênio) para todos os experimentos, com o valor determinado no experimento para a máxima concentração de ureia e a concentração de carbono foi diferente para cada meio de cultura como apresentada na Tabela 8. Portanto temos diferentes razões entre carbono e nitrogênio presente para cada meio de cultivo.

Tabela 8 - Experimentos realizados para obter a melhor concentração de sacarose, os valores descritos como fixos são os resultados obtidos para a da máxima concentração de ureia.

Experimentos		E6	E7	E8	E9	E10
Ureia	(g/L)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Extrato de Levedura	(g/L)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sulfato de magnésio	(g/L)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Fosfato de potássio	(g/L)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Sacarose	(C/N)	0/1	4/1	8/1	16/1	32/1

Fonte: autoria própria.

A quantidade mássica de carbono presente na sacarose, bem como a quantidade mássica de nitrogênio presente na ureia são relativos aos seus pesos moleculares, entorno de 42,11% e 46,65% respectivamente. Então para determinar a quantidade de sacarose (m_{sac}) para cada razão de C/N foi utilizado métodos matemático, os quais relacionam o percentual de carbono presente na sacarose ($\%C_{sacarose}$), o percentual de nitrogênio na ureia ($\%N_{ureia}$), massa de ureia (m_{ureia}) e a razão entre carbono e nitrogênio (C/N) desejada. Assim obteve-se a fórmula da Eq.1 e a massa de sacarose para cada razão de C/N conforme a Tabela 9.

$$m_{sac} = \frac{\%N_{ureia}}{\%C_{sacarose}} \cdot \left(\frac{C}{N}\right) \cdot m_{ureia}$$

$$m_{sac} = R_{\%} \cdot (C/N) \cdot m_{ureia} \text{ (Eq.1)}$$

Tabela 19 – Massa de sacarose para cada razão C/N.

Experimentos		E6	E7	E8	E9	E10
Razão	(C/N)	0/1	4/1	8/1	16/1	32/1
Massa de sacarose	(g/L)	0,0	13,3	26,6	53,2	106,4

Fonte: autoria própria.

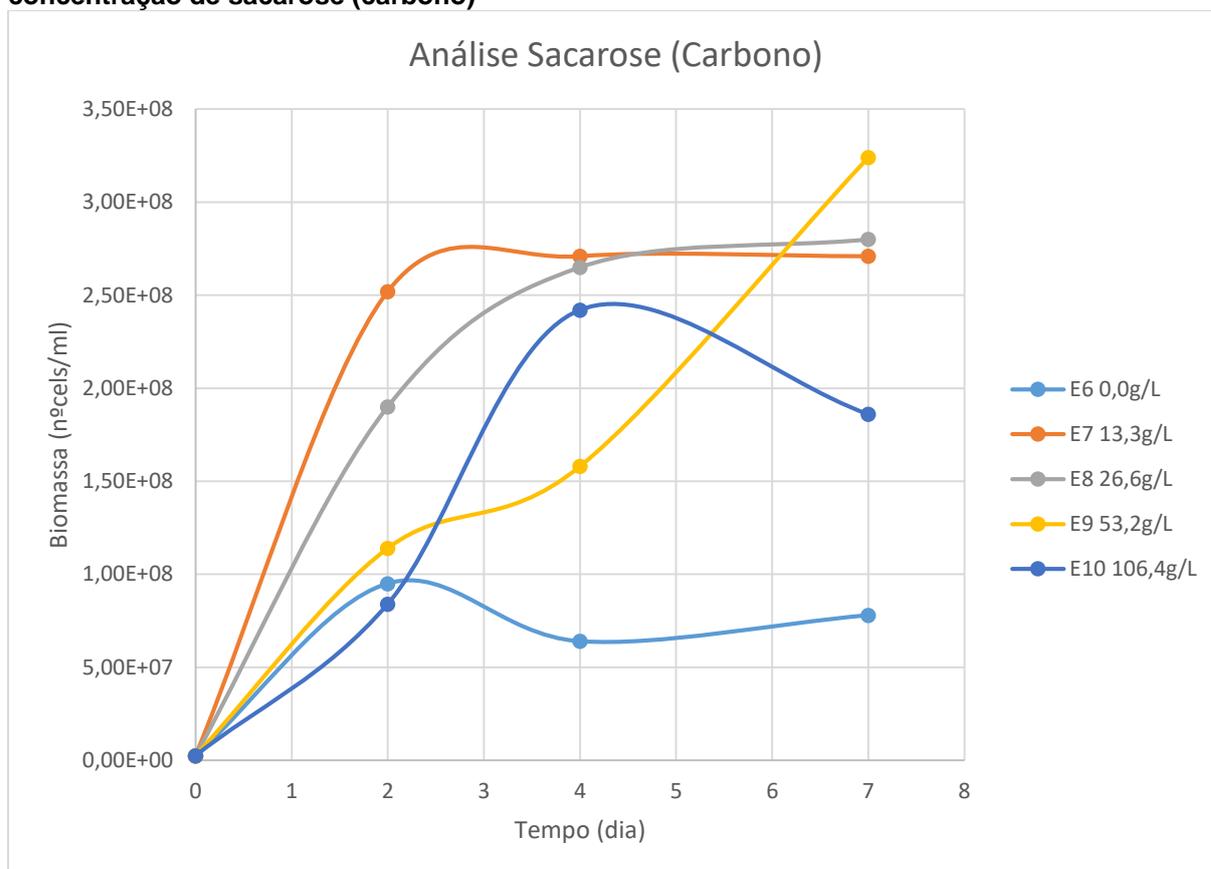
O experimento foi conduzido nos mesmo moldes do experimento para a máxima concentração de ureia, e os dados obtidos, conforme o Quadro 5, permitiu a construção do Gráfico 3, que demonstra a curva de crescimento celular para a levedura *Rhodospiridium toluroides*.

Quadro 5 – Dados obtidos a partir do experimento para a melhor concentração de sacarose.

E6 - 0g/L – 0/1	Dia	nº de células	Células/ml
	0	15,625	2,50E+06
	2	5,9375	9,50E+07
	4	4	6,40E+07
	7	4,875	7,80E+07
E7 - 13,3g/L – 4/1	Dia	nº de células	Células/ml
	0	15,625	2,50E+06
	2	15,75	2,52E+08
	4	16,9375	2,71E+08
	7	16,9375	2,71E+08
E8 - 26,6g/L – 8/1	Dia	nº de células	Células/ml
	0	15,625	2,50E+06
	2	11,875	1,90E+08
	4	16,5625	2,65E+08
	7	17,5	2,80E+08
E9 - 53,2g/L – 16/1	Dia	nº de células	Células/ml
	0	15,625	2,50E+06
	2	7,125	1,14E+08
	4	9,875	1,58E+08
	7	20,25	3,24E+08
E10 - 106,4g/L – 32/1	Dia	nº de células	Células/ml
	0	15,625	2,50E+06
	2	5,25	8,40E+07
	4	15,125	2,42E+08
	7	11,625	1,86E+08

Fonte: autoria própria.

Gráfico 3 – Curva de crescimento da levedura *Rhodosporidium toluroides* para a melhor concentração de sacarose (carbono)



Fonte: autoria própria.

A análise desses dados novamente não foi feita unicamente levando em consideração a maior concentração de células ao final dos experimentos, mas também o comportamento da curva de crescimento celular em relação ao tempo. Portanto ao observar os dados obtidos juntamente com o gráfico 3, a melhor concentração celular em relação ao tempo foi obtida pelo experimento E7, que possui inicialmente 13,3g/L de sacarose ou a razão C/N de 4/1. Nota-se também que ocorre uma estabilização da curva de crescimento, demonstrando que ocorreu o consumo do nitrogênio presente no meio de cultivo assim estagnando o crescimento celular e a concentração de células da levedura *Rhodosporidium toluroides*.

5.2. ESTRATÉGIA BATELADA ALIMENTADA

Para a fase seguinte do experimento, fase do biorreator, foi preparado o inóculo com um volume de 300ml respeitando as proporções de cada componente obtidas nos experimentos anteriores. Antes de realizar a inoculação do microrganismo

no biorreator, foi realizada a contagem de células presente no inoculo utilizando a Câmara de Neubauer, sendo encontrado o valor de $7,2 \times 10^9$ células/ml no caldo fermentado. O volume da alíquota utilizada para a inoculação do biorreator foi de 0,214ml, resultando num total de $1,542 \times 10^9$ células. Essa quantidade de célula foi definida previamente em um biorreator anterior que sofreu contaminação, portanto seus dados não puderam ser utilizados, sendo que a diferença essencial entre a o inoculo do biorreator que sofreu contaminação para este biorreator, foi a utilização de aeração para a preparação do inoculo, o que acarretou em uma grande concentração celular, sendo necessário a redução do volume do inoculo para atingir a mesma quantidade células inoculadas no biorreator teste. Esse valor da quantidade de células pode e deve ser utilizado para experimentos futuros que possuam a mesma quantidade de volume utilizado no biorreator, possibilitando a reprodução do experimento com o objetivo de realizar comparações entre diferentes bateladas sempre que for inoculado a mesma quantidade de células inicialmente.

O meio de cultivo utilizado no biorreator foi preparado para um volume total de 1,5L devido à alta concentração celular no inoculo, provocada pela utilização de um sistema de aeração para a sua preparação, o qual além de melhorar a quantidade de oxigênio dissolvido promoveu uma melhor agitação do meio de cultivo, favorecendo o crescimento e desenvolvimento celular. Além disso o meio de cultivo respeitou as proporções e concentrações de cada componente determinadas nos experimentos anteriores. A Tabela 10 apresenta não somente as concentrações de cada componente utilizados no meio de cultivo, mas também as concentrações das alimentações preparadas para serem inseridas durante o período do experimento no biorreator, realizando assim a batelada alimentada. Foram preparados dois tipos alimentação, sendo as alimentações 1 e 2 compostas apenas por ureia e sacarose enquanto a alimentação 3 foi composto somente por sacarose.

Tabela 10 – Concentrações do meio de cultivo, alimentação 1 e alimentação 2.

Biorreator		Meio de cultivo	Alimentação 1	Alimentação 2	Alimentação 3
Ureia	(g/L)	3,0	30,0	45,0	0,0
Extrato de Levedura	(g/L)	0,5	0,0	0,0	0,0
Sulfato de magnésio	(g/L)	1,5	0,0	0,0	0,0
Fosfato de potássio	(g/L)	1,0	0,0	0,0	0,0
Sacarose	(g/L)	13,3	133,0	199,5	342,3
Volume	(L)	1,500	0,150	0,100	0,150

Fonte: autoria própria.

A diferença entre o meio de cultivo, alimentação 1, alimentação 2 e alimentação 3 foi utilizada para obter diferentes resultados no caldo fermentado. O meio de cultivo inicial possui todos os componentes que são necessários para que ocorra o desenvolvimento e crescimento celular do microrganismo, enquanto que na alimentação 1 e 2 consiste somente de ureia (nitrogênio) e sacarose (carbono), elementos que são essências e indispensáveis para a multiplicação celular do microrganismo em questão, levedura *Rhodosporidium toluroides*. A alimentação 3 consiste somente de sacarose (carbono), pois com a escassez de nitrogênio no meio de cultivo, cessa o crescimento celular, e o excesso de carbono no meio de cultivo a levedura *Rhodosporidium toluroides* consome e o transforma em reserva energética na forma de lipídios.

O acompanhamento e a obtenção de dados durante a etapa do biorreator, ocorreu através dos dados gerados pelo controlador do biorreator e utilizando três métodos de análise diferentes. O primeiro método foi através da contagem de células, a segunda através da turbidimetria e a terceira através do peso seco da biomassa, como demonstrada nas Tabelas 11, 12 e 13 respectivamente. Para realizar o acompanhamento por esses três métodos foi coletada amostras entorno de 40ml, sendo assim suficientes para realizar as análises necessárias, mas ao mesmo tempo evitando ocorrer uma redução muito grande do meio de cultivo e conseqüentemente a diluição do caldo fermentado no momento da alimentação do biorreator.

Tabela 11 – Dados obtidos a partir da contagem de células utilizando a Câmara de Neubauer.

Amostra	Diluição	nº de células	Células/ml	Horas
1	1	45,00	7,20E+06	0:00
2	1/100	18,63	2,98E+08	19:05
3	1/100	34,50	5,52E+08	27:00
4	1/100	36,06	5,77E+08	43:05
5	1/100	31,13	4,98E+08	43:10
6	1/100	49,44	7,91E+08	67:10
7	1/100	46,19	7,39E+08	67:20
8	1/100	59,63	9,54E+08	92:40
9	1/100	50,13	8,02E+08	92:55
10	1/1000	11,94	1,91E+09	120:20
11	1/1000	12,44	1,99E+09	144:40

Fonte: autoria própria.

Tabela 12 – Dados obtidos a partir da turbidimetria.

Amostra	Diluição	Turbidez (NTU)	Turbidez total (NTU)	Horas
1	1	5,75	5,75	0:00
2	1/100	10,40	1040,00	19:05
3	1/100	22,80	2280,00	27:00
4	1/100	24,90	2490,00	43:05
5	1/100	22,50	2250,00	43:10
6	1/100	40,00	4000,00	67:10
7	1/100	36,10	3610,00	67:20
8	1/100	59,90	5990,00	92:40
9	1/100	49,90	4990,00	92:55
10	1/100	129,00	12900,00	120:20
11	1/100	149,00	14900,00	144:40

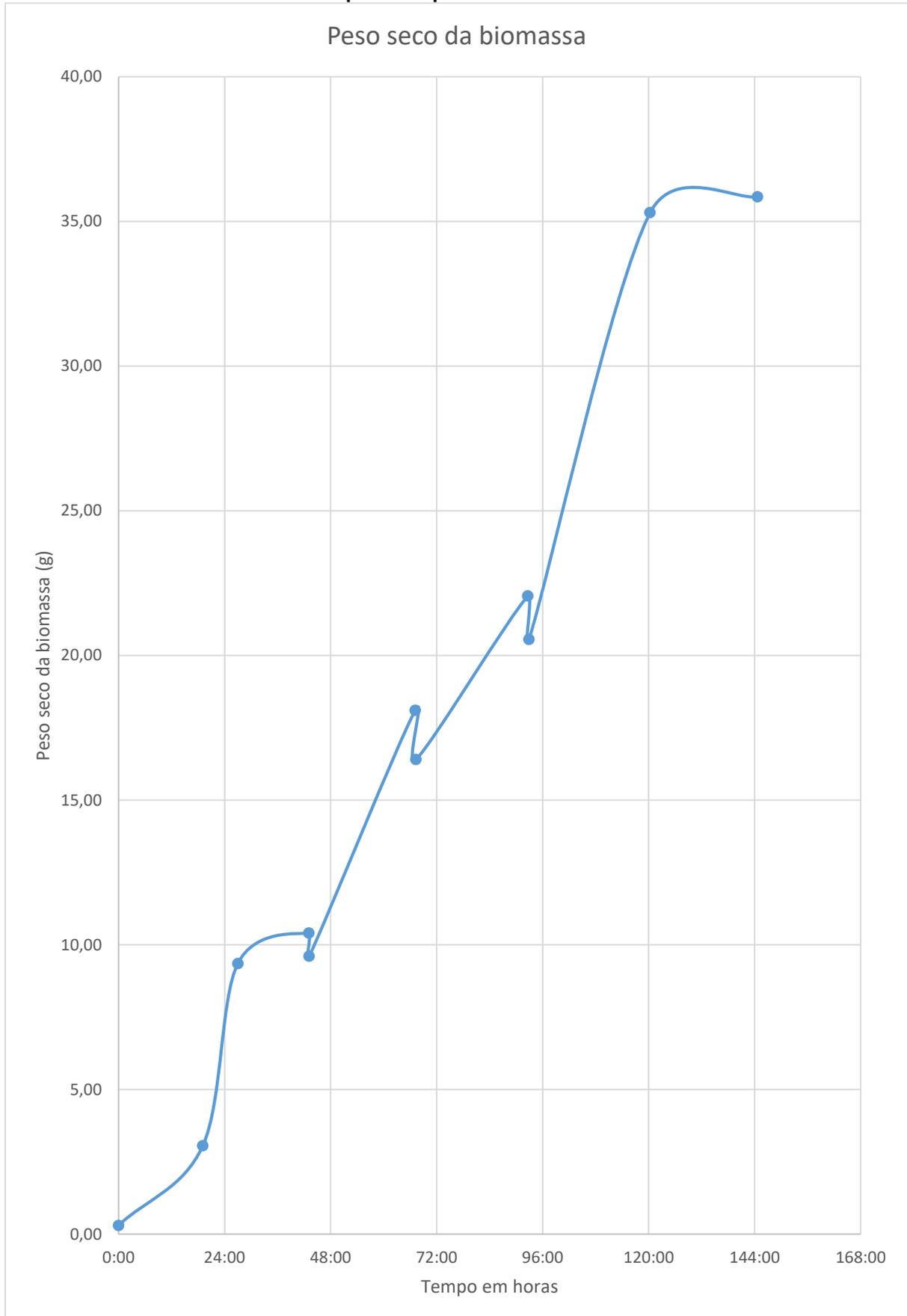
Fonte: autoria própria.

Tabela 13 – Dados obtidos a partir do peso seco da biomassa.

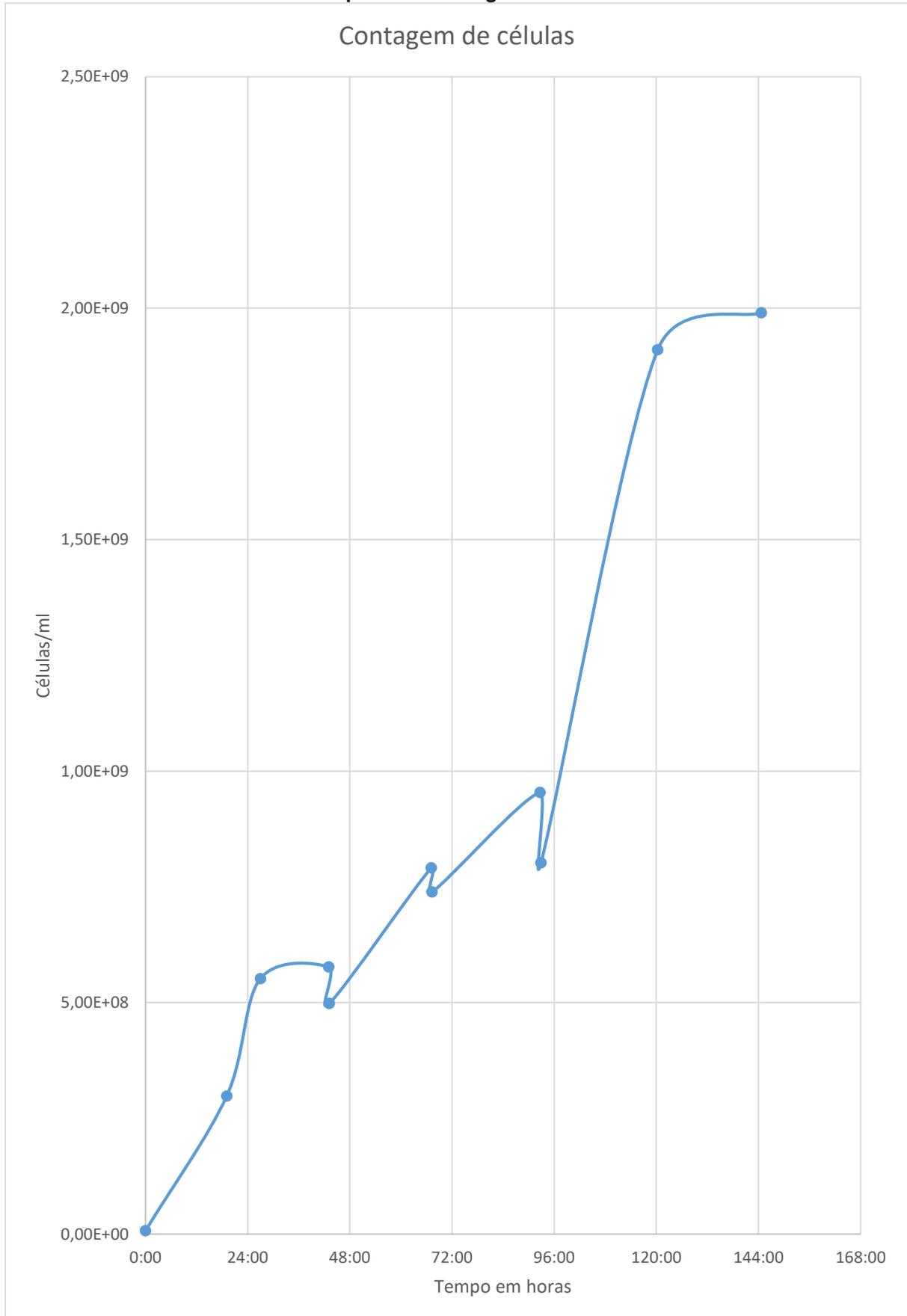
Amostra	Peso do tubo (g)	Peso do tubo e biomassa (g)	Peso seco da biomassa (g)	Horas
1	10,075	10,081	0,30	0:00
2	7,891	7,952	3,05	19:05
3	8,807	8,994	9,35	27:00
4	8,787	8,995	10,40	43:05
5	7,917	8,109	9,60	43:10
6	8,833	9,195	18,10	67:10
7	8,957	9,285	16,40	67:20
8	8,905	9,346	22,05	92:40
9	8,074	8,485	20,55	92:55
10	8,117	8,823	35,30	120:20
11	8,813	9,530	35,85	144:40

Fonte: autoria própria.

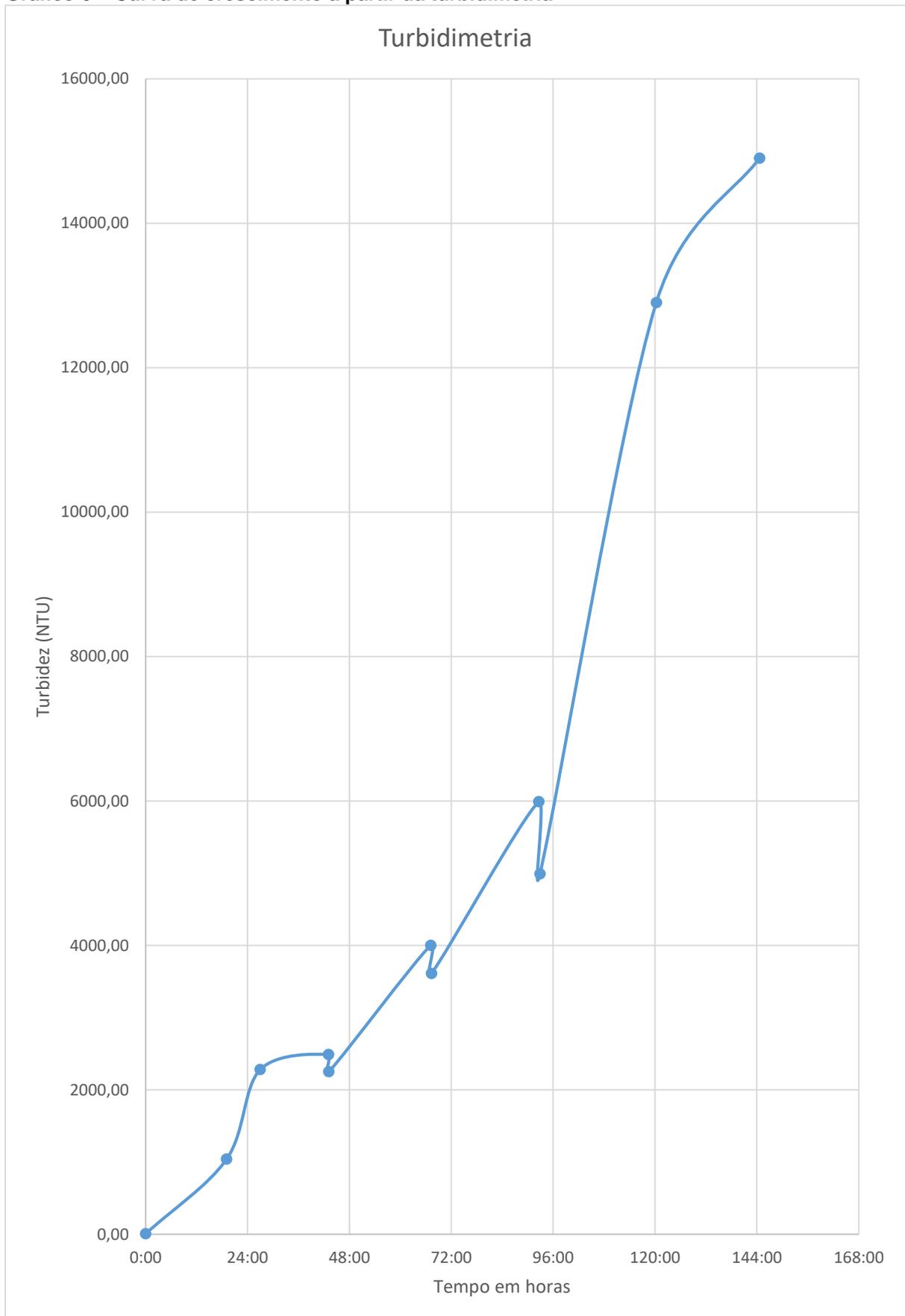
Com os dados obtidos foi possível construir curvas de crescimento celular para cada método utilizado no acompanhamento do biorreator. O Gráfico 4 demonstra os dados obtidos a partir do peso seco da biomassa, o Gráfico 5 demonstra os dados obtidos através da contagem de células utilizando a Câmara de Neubauer e o Gráfico 6 demonstra os dados obtidos através da turbidimetria. A alimentação 1 ocorreu entre as amostras 4 e 5, a alimentação 2 entre as amostras 6 e 7 e alimentação 3 ocorreu entre as amostras 8 e 9.

Gráfico 4 – Curva de crescimento a partir do peso seco da biomassa.

Fonte: autoria própria.

Gráfico 5 – Curva de crescimento a partir da contagem de células.

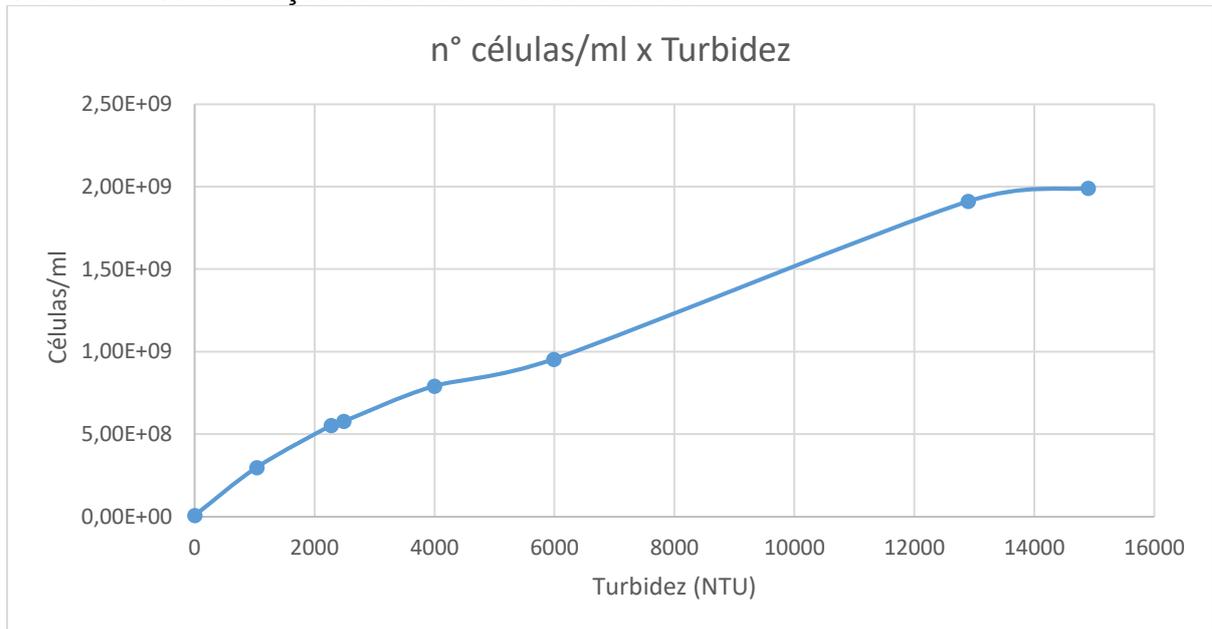
Fonte: autoria própria.

Gráfico 6 – Curva de crescimento a partir da turbidimetria

Fonte: autoria própria.

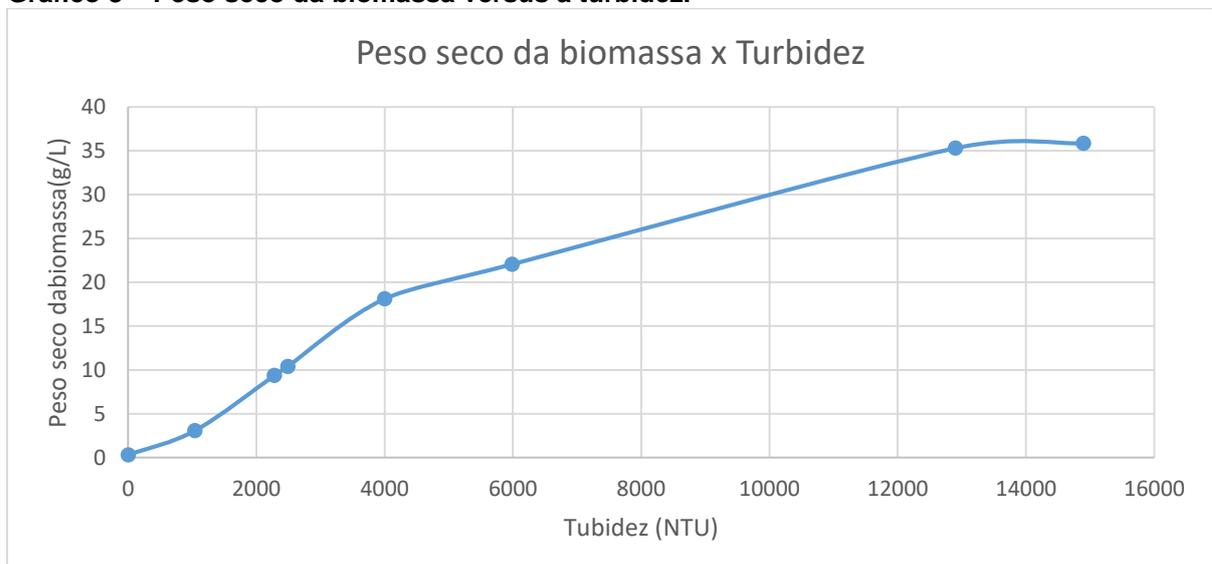
Os dados e as curvas de crescimento ainda permitem construir outras três curvas, as quais relacionam a concentração de células com a turbidimetria, o peso seco da biomassa com a turbidimetria e a concentração de células com o peso seco da biomassa como demonstrado nos Gráficos 7, 8 e 9 respectivamente. Para a construção do Gráfico 9 foi retirado os pontos com relação as amostras 5, 7 e 9, os quais causam distorções na curva devido as diluições que ocorreram durante as alimentações.

Gráfico 7 – Concentração de células versus a turbidez.

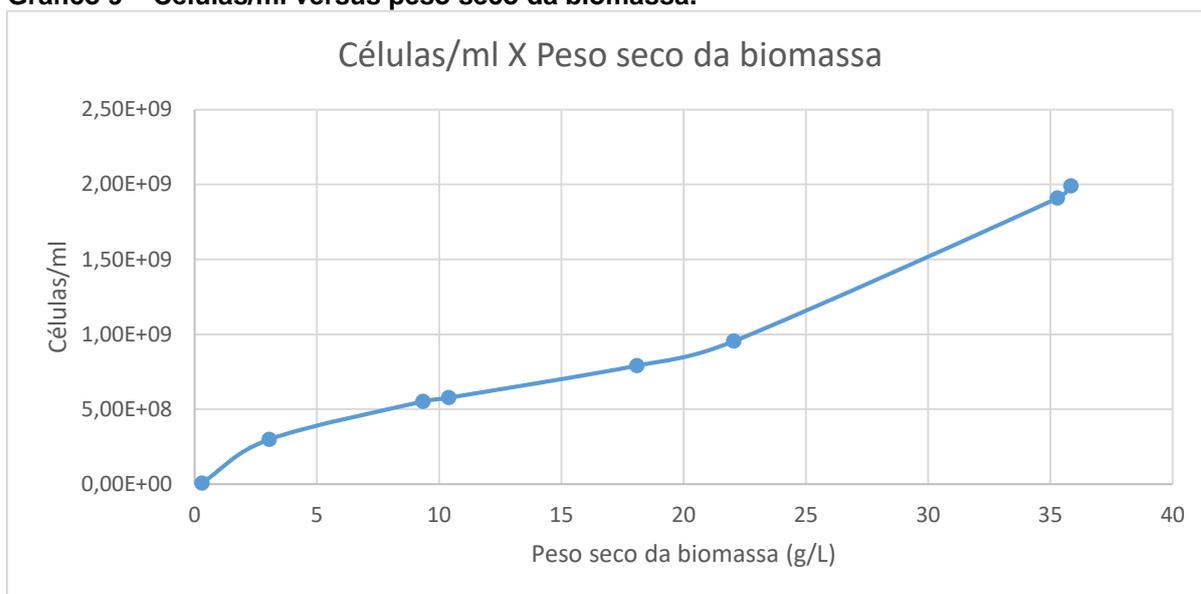


Fonte: autoria própria.

Gráfico 8 – Peso seco da biomassa versus a turbidez.



Fonte: autoria própria.

Gráfico 9 – Células/ml versus peso seco da biomassa.

Fonte: autoria própria.

A relação entre turbidimetria e concentração celular ou o peso seco da biomassa, pode ser usada posteriormente para acompanhar o desenvolvimento do biorreator. A vantagem do acompanhamento através da turbidimetria ocorre por ser uma forma rápida de análise, além de ser necessária uma menor quantidade de amostra, evitando que um volume considerável seja retirado do biorreator.

Os dados obtidos e as curvas de crescimento construídas a partir dos três métodos de acompanhamento realizados, corroboram entre si, validando os resultados obtidos na etapa do biorreator. A primeira observação e conseqüentemente análise realizada, foi que ocorreu a diluição do caldo fermentado durante as alimentações no biorreator, porém mesmo ocorrendo a diluição não houve impacto negativo na fermentação. A diluição foi observada pela diminuição dos valores encontrados durante a análise das amostras e observando a retração dos pontos das curvas de crescimento após as alimentações, sendo que a diluição ocorreu devido ao fato de ser retirado volumes com entorno de 40ml de amostra para realizar todos os testes necessário para os três métodos de análise, sendo depois alimentado com pelo menos 100ml de volume, sem a levedura, assim diluindo a concentração de células da levedura *Rhodospiridium toluoides* no caldo fermentado.

A primeira alimentação ocorreu após o nível de oxigênio dissolvido no caldo em fermentação aumentar constantemente, indicando que houve o consumo e esgotamento dos substratos para a multiplicação celular da levedura. A constatação

que houve o consumo de um substrato limitante foi realizada quando a agitação dentro do biorreator atingiu o valor mínimo, neste caso de 100 rpm, e a porcentagem de oxigênio dissolvido continuou aumentando. As curvas de crescimento celular também corroboram com o esgotamento de um nutriente limitante, pois as curvas de crescimento deixam de ser exponenciais, indicando a fase de crescimento exponencial, e passam a ser quase constantes, indicando a fase estacionária na curva de crescimento.

A agitação do biorreator foi vinculada à porcentagem de oxigênio dissolvido, assim quando aumenta o valor da agitação o nível de oxigênio dissolvido tende a aumentar e quando diminui o valor de agitação o nível de oxigênio dissolvido tende a diminuir. O nível de oxigênio dissolvido pode ser baixo mesmo com o valor máximo de agitação, neste caso 500 rpm, indicando que está sendo consumido os substratos do meio para desenvolvimento celular, seja para a multiplicação celular ou para outras funções celulares, sendo que o contrário ocorre quando o microrganismo aeróbico cessa o consumo de oxigênio dissolvido no meio de cultivo por falta de substrato necessários ao desenvolvimento celular.

A alimentação 1 foi realizada logo após a retirada da amostra 4, a alimentação 2 logo após a retirada da amostra 6 e a alimentação 3 foi realizada logo após a retirada da amostra 8. A alimentação 2 e 3 ocorreram logo no início do aumento constante do oxigênio dissolvido, por isso nas curvas de crescimento a região da fase estacionária é mínima ou reduzida. Além disso após as alimentações 1 e 2 realizadas, os dados e as curvas de crescimento demonstram que a multiplicação celular voltou a ocorrer de forma mais vertiginosa, servindo ao seu objetivo de aumentar e acumular a maior quantidade de células, conseqüentemente biomassa, antes da restrição de ureia no meio de cultivo. A quantidades de biomassa ao final do biorreator, que foi de 35,85g/L, demonstra um acúmulo superior de biomassa em comparação com o valor apresentado por Park, Nicaud e Ledesma-amaro (2018), 15,8g/L, porém ao comparar com o valor obtido por Dalmas Neto et al. (2019), 42,5g/L, a quantidade de biomassa obtida ao final do biorreator se demonstra menor.

A alimentação 3 que continha somente sacarose, sendo uma fonte de carbono, tinha como objetivo o acúmulo de lipídios intracelular, porém ocorreu um intenso crescimento celular, ocasionando um aumento de $1,19 \cdot 10^9$ células/ml no meio de cultivo o que corresponde a uma concentração de células 2,09 vezes maior e um aumento de 13,0g/L de biomassa que corresponde a um aumento de 1,63 vezes a

biomassa presente no meio de cultivo. Os valores de aumento diferentes entre a concentração de células e de biomassa, indicam que há uma grande quantidade de células novas. Esse crescimento elevado da concentração de células e da biomassa da levedura *Rhodospiridium toluroides* demonstra que o nutriente limitante que entrou em escassez anteriormente foi o carbono e não o nitrogênio, assim quando ocorreu a alimentação apenas com sacarose houve um aumento na taxa de crescimento celular e da multiplicação celular no meio de cultivo. Como explicado por Li, Zhao e Bai (2007), Ratledge e Wynn (2002) e Ratledge (2004) o nutriente limitante para ocasionar o acúmulo de lipídios e cessar a multiplicação celular deve ser o nitrogênio e não o carbono.

O controlador do biorreator permite o controle maior, mais eficiente e eficaz de parâmetros que impactam no crescimento celular, como temperatura, pH, agitação e aeração do meio. O controle melhor desses parâmetros como explicitado por Guerreiro (2013), principalmente a aeração, provoca melhores condições não só para o acúmulo de lipídios, mas também para o crescimento e multiplicação celular do meio de cultivo, incrementando a taxa de crescimento celular e de acúmulo de lipídios. Vale lembrar que para análise dos experimentos antes da fase do biorreator, os parâmetros controlados foram a agitação e temperatura do meio de cultivo, com uma eficiência menor do que em um biorreator, provocando divergência entre os dados obtidos na fase de determinação da concentração de sacarose no meio de cultivo e a fase do biorreator. A Tabela 14 nos traz a comparação entre a fase de determinação da melhor concentração de sacarose (Exp. Sacarose) e os dados obtidos a partir do biorreator, sendo comparado o número de gerações (n), o máximo crescimento na fase exponencial ($\mu_{m\acute{a}x}$) e o tempo de duplicação (t_g).

Tabela 14 – Comparação dos dados obtidos a partir da melhor concentração de sacarose e do biorreator.

Experimento	n	$\mu_{m\acute{a}x} (h^{-1})$	$t_g (h)$	Amostra biorreator
Exp. Sacarose	6,66	2,31	0,30	1-2
Biorreator – Início	6,26	3,86	0,18	1-3
Biorreator - Alimentação 1	0,67	0,46	1,50	5-6
Biorreator - Alimentação 2	0,37	0,24	2,87	7-8
Biorreator - Alimentação 3	1,31	0,76	0,91	8-10

Fonte: autoria própria.

A comparação dos dados obtidos na Tabela 14 mostra que as condições no biorreator promovem uma maior taxa de crescimento específico ($\mu_{m\acute{a}x}$) em comparação as condições utilizadas no experimento da sacarose, além de diminuir o tempo de duplicação celular. Ao comparar os resultados obtidos para a alimentação 1, 2 e 3 fica evidente que o nutriente limitante que entrou em escassez no meio de cultivo foi o carbono, pois ocorreu um aumento dos três parâmetros após a alimentação 3 contendo somente sacarose em comparação com os parâmetros das alimentações 1 e 2. Ainda que menores que os parâmetros da última alimentação, as duas primeiras alimentações se mostraram efetivas ao aumentar a concentração celular e conseqüentemente a biomassa.

A análise dos dados e resultados obtidos para a melhor concentração de sacarose e o biorreator, revela que o meio de cultivo permite uma maior concentração de sacarose tanto no meio de cultivo inicial quanto nas alimentações contendo ureia e sacarose. Essa constatação fica clara após a alimentação 3 resultar no aumento da concentração celular e da biomassa como explicado anteriormente. Essa maior quantidade de sacarose promoveria uma maior taxa de crescimento celular e conseqüentemente um maior acúmulo de lipídios, devido as melhores condições do meio de cultivo proporcionadas pelo biorreator

5.3. OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS

O caldo fermentado obtido ao termino do biorreator foi hidrolisado para romper as membranas celulares e acessar os lipídios intracelulares acumulados, sendo recuperados através da extração com clorofórmio. Para quantificação do óleo obtido após a extração foi utilizado apenas um volume de 200ml de caldo fermentado tratado, sendo obtido ao final da secagem e evaporação do clorofórmio um total de 1,281 gramas de óleo ou 6,405 gramas de óleo por litro de caldo, conforme demonstrado na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados obtidos a partir da extração do óleo.

Peso Erlenmyer com caldo tratado (g)	Erlenmeyer (g)	Óleo obtido (g)	Óleo obtido (g/L)	Biomassa ao final do biorreator(g/L)	Biomassa em 200ml ao final biorreator	% de óleo
118,729	117,448	1,281	6,405	35,85	7,17	17,87%

Fonte: autoria própria.

A quantidade de óleo obtido ao final representa 17,87% do peso seco da biomassa obtida no biorreator. Esse valor é considerado baixo para a levedura *Rhodospiridium toluoides* em comparação com os valores demonstrados por Park, Nicaud e Ledesma-amaro (2018) ou apresentados por Ageitos et al. (2011). Esse baixo valor deve-se ao fato do nutriente limitante que entrou em escassez no meio de cultivo do biorreator ter sido a o carbono e não a ureia durante as duas primeiras alimentações, mesmo assim após a última alimentação, contendo somente sacarose, ocorreu o acúmulo de óleo em curto período de tempo, durante o final da fase exponencial de crescimento e o início da fase estacionária do crescimento celular ao final do biorreator.

6 CONCLUSÃO

Os dados e resultados ao longo de todo o estudo demonstra e corroboram com a literatura que a levedura *Rhodospiridium toluroides* possui a capacidade de acumular lipídios intracelulares, o que a torna uma SCO, sendo que os lipídios são acumulados na fase exponencial tardia e a fase estacionária de crescimento. Os resultados obtidos ao final do ensaio no biorreator para o acúmulo de lipídios em relação a biomassa, 17,87%, e a quantidade de biomassa, 35,85g/L demonstram o potencial que *Rhodospiridium toluroides* possui não somente para o acúmulo de lipídios intracelulares, mas também para a obtenção de uma quantidade de biomassa considerável, o que eleva a quantidade de óleo microbiano obtido ao final.

A estratégia de batelada alimentada se mostrou eficaz ao seu propósito de otimizar a produção de biomassa, porém faz-se necessário reavaliar a composição das alimentações de modo a favorecer e otimizar o acúmulo de lipídio. Assim é necessárias novas pesquisas e estudos para aprimorar a otimização do meio de cultivo, além de poder ser adotadas estratégias de batelada alimentada diferentes das propostas na fase do biorreator deste estudo, de forma a aprimorar e melhorar a eficiência do acúmulo de lipídios e conseqüentemente a obtenção de óleo.

REFERÊNCIAS

ABOMOHRA, Abd El-fatah et al. Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, [s.l.], v. 64, p.596-606, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.056>.

AFONSO, Valdemira Lourenço. Abordagens para a acumulação de lipídios e coprodutos de elevado valor pela levedura *Rhodosporidium toruloides*. 2017. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biológica, Universidade do Algarve, Faro, 2017.

AGEITOS, Jose Manuel et al. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [s.l.], v. 90, n. 4, p.1219-1227, 5 abr. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3200-z>.

ANDRADE, Raoni Calvalcanti Rodrigues. Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipídica da levedura *Rhodosporidium glutinis* NCYC 921 em culturas descontínuas monitorizadas por citometria de fluxo. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, 2010.

AZAMBUJA, Suéllen Patricia Held. Fisiologia e capacidade de acúmulo de lipídios de diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodosporidium toruloides* em meio contendo glicerol. 2016. 174 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Program de Pós Graduação de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

BASTOS, Reinaldo Gaspar. Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos. São Carlos: Edufscar, 2010. 162 p. Coleção UAB-UFSCar.

BEGOT, Claire et al. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal Of Microbiological Methods*, [s.l.], v. 25, n. 3, p.225-232, jun. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00090-9](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012(95)00090-9).

BEOPOULOS, Athanasios et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress In Lipid Research*, [s.l.], v. 48, n. 6, p.375-387, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>.

BONTURI, Nemailla et al. Microbial oil production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate without nutrient supplementation by a *Rhodospiridium toruloides* adapted strain. *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 57, p.16-25, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.007>.

BONTURI, Nemailla et al. Single Cell Oil Producing Yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: Selection of Extraction Strategies and Biodiesel Property Prediction. *Energies*, [s.l.], v. 8, n. 6, p.5040-5052, 28 maio 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en8065040>.

BORZANI, Walter et al. *Biotechnologia Industrial: fundamentos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, V. I, 2001. 4 v.

CHEIRSILP, Benjamas; TORPEE, Salwa. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 110, p.510-516, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>.

COELHO, M. A. et al. Identification of Mating Type Genes in the Bipolar Basidiomycetous Yeast *Rhodospiridium toruloides*: First Insight into the MAT Locus Structure of the Sporidiobolales. *Eukaryotic Cell*, [s.l.], v. 7, n. 6, p.1053-1061, 11 abr. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.00025-08>.

DALMAS NETO, C. J. et al. New Method for the Extraction of Single-Cell Oils from Wet Oleaginous Microbial Biomass: Efficiency, Oil Characterisation and Energy Assessment. **Waste And Biomass Valorization**, [s.l.], p.1-10, 31 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-019-00705-x>.

DONG, Tao et al. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Applied Energy*, [s.l.], v. 177, p.879-895, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.06.002>.

DORAN, Pauline M.. *Bioprocess Engineering Principles*. 2. ed. Oxford: Academic Press, 2012. 926 p.

DUARTE, Susan Hartwig et al. Recovery of yeast lipids using different cell disruption techniques and supercritical CO₂ extraction. *Biochemical Engineering Journal*, [s.l.], v. 125, p.230-237, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.06.014>.

FREITAS, Cláudia et al. New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth. *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 49, n. 4, p.554-562, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.022>.

FREITAS, Cláudia et al. Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 158, p.355-359, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.071>.

GARCIA-OCHOA, Felix; GOMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 27, n. 2, p.153-176, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>.

GUERREIO, Fábio. Influência da transferência de massa de oxigênio na acumulação de lípidios pela levedura *Rhodospiridium toluoides*. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biológica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, Algarve, 2013.

GÜNERKEN, E. et al. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 33, n. 2, p.243-260, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>.

JACOB, Z.. Yeast Lipids: Extraction, Quality Analysis, and Acceptability. *Critical Reviews In Biotechnology*, [s.l.], v. 12, n. 5-6, p.463-491, jan. 1992. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07388559209114236>.

KASPROW, R.p.; LANGE, A.j.; KIRWAN, D.j.. Correlation of Fermentation Yield with Yeast Extract Composition as Characterized by Near-Infrared Spectroscopy. *Biotechnology Progress*, [s.l.], v. 14, n. 2, p.318-325, 3 abr. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1021/bp980001j>.

KNOP, Michael. Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations. *Comptes Rendus Biologies*, [s.l.], v. 334, n. 8-9, p.599-606, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2011.05.007>.

LI, Yonghong; ZHAO, Zongbao (kent); BAI, Fengwu. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme And Microbial Technology*, [s.l.], v. 41, n. 3, p.312-317, ago. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.008>.

LIU, Dan et al. Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, [s.l.], v. 36, p.181-192, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.017>.

LUCARINI, Adriana C.; SILVA, Leandro A. da; BIANCHI, Reinaldo A. C.. Um sistema para a contagem semi-automática de microrganismos. *Pesquisa & Tecnologia Fei*, São Bernardo do Campo, p.36-40, jan. 2004. Disponível em: <<http://fei.edu.br/~rbianchi/publications/RevistaFEI2004-a.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2018.

MENG, Xin et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, [s.l.], v. 34, n. 1, p.1-5, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2008.04.014>.

MINIHANE, B.j.; BROWN, D.e.. Fed-batch culture technology. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 4, n. 2, p.207-218, 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0734-9750\(86\)90309-5](http://dx.doi.org/10.1016/0734-9750(86)90309-5).

PACHECO, Thályta Fraga. Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PARK, Young-kyoung; NICAUD, Jean-marc; LEDESMA-AMARO, Rodrigo. The Engineering Potential of *Rhodospiridium toruloides* as a Workhorse for Biotechnological Applications. *Trends In Biotechnology*, [s.l.], v. 36, n. 3, p.304-317, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.013>.

PELCZAR, Michael; REID, Roger; CHAN, E. C. S.. *Microbiologia*. São Paulo: Mcgraw-hill do Brasil, 1980. Tradução de: Manuel Adolpho May Pereira, Revisão Técnica de: Maria Regina S. Borges.

PURICH, Daniel L.; ALISSON, R. Donald. *Handbook of Biochemical Kinetics*. [s. l.]: Academic Press, 1999. 788 p.

RATLEDGE, Colin. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, [s.l.], v. 86, n. 11, p.807-815, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.017>.

RATLEDGE, Colin; WYNN, James P.. The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms. *Advances In Applied Microbiology*, [s.l.], p.1-52, 2002. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2164\(02\)51000-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2164(02)51000-5).

RODRIGUES, Astride Euridice Correia. Desenvolvimento de um método voltamétrico para avaliação do crescimento microbiano. 2002. 149 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Universidade do Minho, Braga, 2002.

SAINI, Ramesh Kumar; KEUM, Young-soo. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 240, p.90-103, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>.

SALLES, Poline. Avaliação de um reator tipo tambor rotativo para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Engenharia Mecânica, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

SARAN, Saurabh et al. Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* A29. *Fuel*, [s.l.], v. 188, p.324-331, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.09.051>.

SARRAFZADEH, Mohammad H. et al. Evaluation of various techniques for microalgal biomass quantification. *Journal Of Biotechnology*, [s.l.], v. 216, p.90-97, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.010>.

SCHMIDELL, Willibaldo et al. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, V. li, 2001. 2 v.

SCHNEITER, Roger; DAUM, Günther. Extraction of Yeast Lipids. *Methods In Molecular Biology: Yeast Protocols*, [s.l.], v. 313, p.041-046, 2006. Humana Press. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-958-3:041>.

SHEN, Hongwei et al. Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Journal Of Biotechnology*, [s.l.], v. 168, n. 1, p.85-89, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.08.010>.

SILVA, Corália Isabel Sepúlveda e. Otimização das condições de cultivo da levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 para produção de lipídios e carotenoides, em

frascos agitados. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Alimentar, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.

SILVEIRA, Renata Ferreira. Produção de Etanol por Leveduras em Biorreatores com Células Livres e Imobilizadas utilizando Soro de Queijo. 2006. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SITEPU, Irmayuli R. et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 32, n. 7, p.1336-1360, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.08.003>.

SOCOL, Carlos Ricardo et al. Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 223, p.259-268, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.055>.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J.. *Principles of Fermentation Technology*. 2. ed. Burlington: Butterworth-heinemann, 1995. 357 p.

STANIER, Roger Y. et al. *General Microbiology*. 5. ed. [s. l.]: Macmillan Press Ltd, 1987.

UNIPROT Knowledgebase: banco de dados. banco de dados. 2018. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/taxonomy/5286>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

VIERA, João Paulo Fernandes. Biotransformação de carboidratos da cana-de-açúcar em lipídios e avaliação técnico-econômica. 2016. 252 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2016.

WANG, Q.-m. et al. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. *Studies In Mycology*, [s.l.], v. 81, p.149-189, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.002>.

WIEBE, Marilyn G et al. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *Bmc Biotechnology*, [s.l.], v. 12, n. 1, p.26-36, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-12-26>.

YELLAPU, Sravan Kumar et al. Recent developments of downstream processing for microbial lipids and conversion to biodiesel. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 256, p.515-528, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.129>.

ZHU, C. J.; LEE, Y. K.. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal Of Applied Phycology*, [s.l.], v. 9, n. 2, p.189-194, 1997. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1007914806640>.