

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

PRODUÇÃO MICROBIANA DE LIPÍDEOS

Camilo Sixto López Garzón
Engenheiro Químico

Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco
Orientador

Dr^a. Saartje Hernalsteens
Co-Orientador

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química.

Campinas, São Paulo
Junho de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

L881p López Garzón, Camilo Sixto
Produção microbiana de lipídeos / Camilo Sixto
López Garzón. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Telma Teixeira Franco, Saartje
Hernalsteens.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação. 2. Leveduras. 3. Lipídeos -
Biotecnologia. 4. Fermentação - Modelos matemáticos.
I. Franco, Telma Teixeira. II. Hernalsteens, Saartje. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Production of microbial lipids

Palavras-chave em Inglês: Fermentation, Yeast, Biotechnology lipids, Fermentation -
Mathematical models

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Gustavo Paim Valença, Carolina Botella Franco

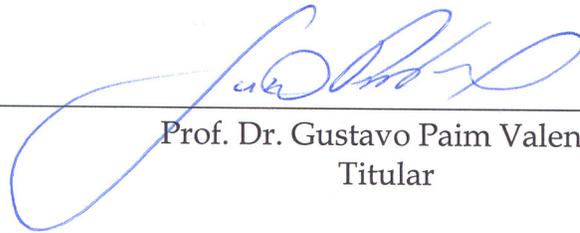
Data da defesa: 09/06/2009

Programa de Pós Graduação: Mestrado em Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Camilo Sixto López Garzón e aprovada em 9 de junho de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profª. Drª. Telma Teixeira Franco
Orientador



Prof. Dr. Gustavo Paim Valença
Titular



Drª. Carolina Botella Franco
Titular

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em
Engenharia Química.



Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco
Orientador

A meus pais, Sixto e Gloria
A meu irmão, Carlos Andrés
Pelo apoio total

A Andrea
Pela força do dia-a-dia

Com muito carinho

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio incondicional nesta nova etapa da minha vida, sem vocês nada disto teria acontecido. A Andrea, pelo apoio, amor e companhia neste último ano.

A meus amigos aqui no Brasil, com quem aproveitei e me senti em casa ainda estando muito longe.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco, por me acolher como um membro mais de sua família na minha chegada, por sua orientação, amizade e confiança.

A minha co-orientadora, Dr^a. Saartje Hernalsteens pela orientação e sugestões na resolução dos diferentes problemas encontrados. Ao pessoal do LEBBPOR pela amizade e apoio no trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) pela assessoria com as análises de microscopia e cromatografia gasosa. A Fernando Frederico pela colaboração nas análises de cromatografia líquida. Aos funcionários da oficina pela ajuda na montagem de diversos equipamentos.

A Shell pelo apoio na realização deste trabalho, em especial à Dra. Carolina Botella e ao Dr. Peter Lednor pelo contínuo apoio nos aspectos logísticos do projeto.

Ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-graduação (PEC-PG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que fez possível o desenvolvimento deste mestrado no Brasil.

A todos aqueles não escritos aqui, mas que tornaram possível a realização deste trabalho.

A Deus, quem faz que tudo seja possível.

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos estudos visando o estabelecimento de um processo de produção de lipídeos microbianos a partir de fontes renováveis, particularmente xilose, carboidrato derivado do processo de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar e que em breve deverá estar disponível para fermentação. Inicialmente foi verificada a influência da fonte de nitrogênio e a relação inicial carbono-nitrogênio sobre o processo de acúmulo de lipídeos utilizando duas linhagens características. A utilização de sulfato de amônio junto com extrato de levedura em uma relação C/N de 50 g/g foi adequada para o processo de produção de lipídeos. A seguir, 25 leveduras oleaginosas foram testadas quanto a sua capacidade de assimilação de xilose e produção de lipídeos. A produtividade de produção de lipídeos e elevado rendimento energético da levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 permitiram sua escolha para as etapas posteriores. Estudos de inibição por substrato foram desenvolvidos e diferentes modelos matemáticos foram ajustados aos dados experimentais. O modelo de Mulchandani representou adequadamente a cinética de inibição. Um modelo do cultivo em batelada simples foi desenvolvido baseado nos dados cinéticos obtidos, o qual foi validado para cultivo com limitação de nitrogênio em biorreator de dois litros. A análise de composição dos lipídeos obtidos mostrou semelhança à de fontes vegetais. Finalmente, dois modos de operação em batelada alimentada foram testados, o modo de alimentação simples aumentou significativamente a produtividade do processo quando comparado ao processo em batelada simples convencional. A alimentação usando pH-amônio/auxostat seguida de alimentação de carbono dobrou a concentração celular final obtida nos modos anteriores, mantendo níveis de acúmulo aceitáveis. Assim, um processo de produção de lipídeos a partir de pentoses foi viabilizado, adicionalmente o lipídeo produzido atende as especificações necessárias do valor cetano para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: Fermentação, pentoses, lipídeos microbianos, batelada alimentada

ABSTRACT

Studies attempting the establishment of a microbial lipid production process from renewable resources, mainly xylose, were developed. This pentose, obtained from sugar cane bagasse hydrolysis, is expected to be available in large quantities and is going to be used as a substrate in fermentation processes in the near future. Initially, the effects of nitrogen source and initial carbon to nitrogen ratio over the lipid accumulation process were tested using two typical oleaginous strains. The joint use of ammonium sulphate plus yeast extract at an initial C/N ratio of 50 g/g were determined as adequate conditions for induction of lipid production with these yeasts. Subsequently in this work, 25 oleaginous yeasts were tested in order to evaluate the ability to consume xylose and lipid production. As a result of this stage, *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 was selected regarding its highest productivity and energetic yield over all the set of yeasts evaluated. Thus, this strain was used in the development of the later studies. Substrate inhibition studies were developed and several mathematical models were adjusted to the experimental data. The Mulchandani model fitted well the substrate inhibition kinetics. Based on the kinetics obtained in shake flask fermentation, a batch model that represents the behavior of the principal variables in the time was developed. The model proposed was validated successfully using a set of data from two liters bioreactor cultivation. The composition of the obtained lipids was very similar of those from vegetal sources. Finally, two fed-batch operation modes were tested intending to get higher lipid productivities. In this direction, simple carbon fed-batch operation showed better productivities than those obtained from simple batch. Nitrogen fed using the pH-ammonium/auxostat mode followed by carbon fed duplicated the final cellular concentration obtained in the other modes tested, maintaining an adequate lipid content. Therefore, a process for lipid production was developed, additionally; the lipids obtained attend the cetane value specifications required for biodiesel production.

Keywords: Fermentation, pentoses, microbial lipids, fed-batch

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivo geral.....	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Lipídeos microbianos ou <i>Single-cell oil</i>	4
2.2 Microrganismos produtores.....	6
2.3 Aspectos bioquímicos.....	9
2.4 Aspectos tecnológicos.....	13
2.5 Cinética ideal de fermentação.....	15
2.6 A produção microbiana de lipídeos sob o escopo da biorrefinaria.....	16
2.6.1 Biorrefinarias: Descrição e princípios.....	16
2.6.2 Sistemas de biorrefinaria.....	19
2.6.3 As pentoses dentro das biorrefinarias.....	20
2.7 Referências bibliográficas.....	25
3. ASPECTOS GERAIS SOBRE AS LEVEDURAS OLEAGINOSAS E O PROCESSO DE ACÚMULO DE LIPÍDEOS	31
3.1 Resumo.....	31
3.2 Material e métodos.....	31
3.2.1 Microrganismos.....	31
3.2.2 Meios de cultivo e preparo do inóculo.....	32

3.2.3 Condições de fermentação.....	33	
3.2.4 Metodologia analítica.....	33	
3.2.4.1 Biomassa seca.....	33	
3.2.4.2 Lipídeos totais.....	34	
3.2.4.3 Determinação de xilose.....	34	
3.2.5 Modelos matemáticos e calculo de parâmetros.....	35	
3.2.6 Métodos numéricos.....	35	
3.3 Resultados e discussão.....	36	
3.3.1 Métodos de manutenção da cultura.....	36	
3.3.2 Produção de lipídeos microbianos em meios limitados por nitrogênio.....	38	
3.3.3 Avaliação do crescimento e o acúmulo de lipídeos em diferentes meios de cultivo e influencia da fonte de nitrogênio.....	40	
3.3.4 Influencia do extrato de levedura e da relação C/N no rendimento de lipídeos.....	42	
3.4 Conclusões.....	44	
3.5 Referências bibliográficas.....	46	
4. COMPARAÇÃO CINÉTICA E ENERGÉTICA DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS USANDO XILOSE COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO.....		49
4.1 Resumo.....	49	
4.2 Material e métodos.....	49	
4.2.1 Microrganismos.....	49	
4.2.2 Meios e condições de cultivo.....	50	
4.2.2.1 Fases de ativação e propagação.....	50	
4.2.2.2 Fases de adaptação e seleção.....	50	
4.2.3 Metodologia analítica.....	51	
4.2.3.1 Biomassa seca.....	51	
4.2.3.2 Lipídeos totais.....	51	
4.2.3.3 Determinação de xilose.....	52	

4.3 Resultados e discussão.....	52
4.3.1 Cinéticas de crescimento e consumo de substrato.....	52
4.3.2. Influência da velocidade específica de crescimento na produção de biomassa e lipídeos.....	56
4.3.3 Análise do rendimento energético do crescimento	58
4.4 Conclusões.....	63
4.5 Referências bibliográficas.....	64
5. ESTUDOS DE INIBIÇÃO POR SUBSTRATO E MODELAGEM NÃO ESTRUTURADA PARA O CULTIVO DE <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296.....	65
5.1 Resumo.....	65
5.2 Materiais e métodos.....	66
5.2.1 Microrganismo.....	66
5.2.2 Meios de cultivo.....	66
5.2.3 Condições de fermentação.....	66
5.2.4 Metodologia analítica.....	67
5.2.4.1 Biomassa seca.....	67
5.2.4.2 Determinação de xilose.....	68
5.2.4.3 Determinação de nitrogênio (N-NH ₃ ⁺).....	68
5.2.4.4 Lipídeos totais.....	68
5.2.4.5 Análise qualitativa dos lipídeos por CCD.....	68
5.2.5. Composição dos lipídeos em ácidos graxos.....	69
5.2.6 Calculo de parâmetros	70
5.2.7 Métodos numéricos.....	70
5.3 Resultados e discussão.....	71
5.3.1 Estudos de inibição por substrato.....	71
5.3.2 Modelos de inibição.....	73
5.3.3 Cultivo em biorreator	77
5.3.4 Desenvolvimento do modelo matemático.....	78
5.3.5 Composição dos lipídeos microbianos.....	83

5.4 Conclusões.....	85
5.5 Referências bibliográficas	87
6. PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS MICROBIANOS EM BATELADA ALIMENTADA E pH/AUXOSTAT.....	90
6.1 Resumo.....	90
6.2 Materiais e métodos.....	91
6.2.1 Microrganismo.....	91
6.2.2 Meios de cultivo	91
6.2.3 Experimentos em batelada alimentada.....	91
6.2.4 Metodologia analítica.....	92
6.2.5 Calculo de parâmetros	93
6.3 Resultados e discussão	93
6.3.1 Cultivos em batelada alimentada.....	93
6.3.2 Cultivos com alimentação de nitrogênio (pH-amonio/auxostat) e alimentação de carbono.....	99
6.3.3 Analise da utilização do substrato.....	104
6.3.4 Composição dos lipídeos.....	107
6.3.5 Resultados finais.....	108
6.4. Conclusões.....	112
6.5 Referências bibliográficas	113
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	116
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	117

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Distribuição dos ácidos graxos nos SCO de algumas leveduras e fungos comparados com os óleos vegetais.....	5
Tabela 2.2: Espécies de leveduras oleaginosas.....	7
Tabela 2.3: Principais espécies de fungos oleaginosos.....	8
Tabela 3.1: Principais parâmetros cinéticos dos cultivos em meio pré-inóculo.....	37
Tabela 3.2: Resultados cinéticos do crescimento e do acúmulo de lipídeos usando <i>Lipomyces starkeyi</i> NRRL Y-11557 em diferentes meios de cultivo.....	42
Tabela 3.3: Avaliação dos parâmetros cinéticos do planejamento fatorial 2 ²	43
Tabela 3.4: Efeito de cada fator na produtividade de lipídeos.....	44
Tabela 4.1: Parâmetros cinéticos das leveduras selecionadas.....	53
Tabela 5.1: Lipídeos acumulados a diferentes concentrações iniciais de substrato....	72
Tabela 5.2: Valores dos parâmetros e grau de ajuste dos modelos de inibição.....	76
Tabela 5.3: Condições iniciais utilizadas na resolução do modelo matemático.....	81
Tabela 5.4: Valores dos parâmetros cinéticos utilizados na resolução do modelo matemático.....	81
Tabela 5.5: Comparação da composição dos ácidos graxos produzidos por <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296 em biorreator com outros da literatura.....	85
Tabela 6.1: Condições de operação para os experimentos de produção de lipídeos em batelada alimentada.....	92
Tabela 6.2: Resultados finais dos experimentos em batelada alimentada.....	110
Tabela 6.3: Principais resultados de diferentes processos de produção de lipídeos microbianos.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura geral dos triglicerídeos.....	4
Figura 2.2: Biossíntese de triacilgliceróis por leveduras oleaginosas.....	10
Figura 2.3: Resumo da biossíntese de triglicerídeos.....	11
Figura 2.4: Indução do acúmulo de lipídeos por microrganismos oleaginosos.....	12
Figura 2.5: Mecanismo de formação dos corpos lipídicos dentro de leveduras. (ER) Reticulo Endoplasmático, (TAG): Triglicerídeos, (DAG): Diglicerídeos, (SE): Ésteres de esterol, (PL): Fosfolípido, (LP): Corpo Lipídico.....	13
Figura 2.6: Cinéticas ideais durante o processo de fermentação de uma levedura oleaginosa.....	16
Figura 2.7: Esquema conceitual da Biorrefinaria.....	17
Figura 2.8: Evolução do conceito de processamento consolidado na Engenharia de <i>Biocommodities</i> . HFS: hidrólise e fermentação separadas, SFS: Sacarificação e fermentação simultâneas, SSCF: Sacarificação e co-fermentação simultâneas, BPC: Bioprocessamento consolidado.....	20
Figura 2.9: Biorrefinaria baseada em lignocelulósicos.....	22
Figura 3.1: Crescimento de <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296 segundo o método de manutenção. ■ Glicerol 10%, ● Glicerol 20%, ▲ Água destilada	37
Figura 3.2: Produção de biomassa livre e lipídeos segundo a relação C/N utilizada para <i>Rhodotorula glutinis</i> CCT 0783 (a.) e <i>Lipomyces starkeyi</i> NRRL Y-11557 (b.).....	39
Figura 3.3: Cinéticas de crescimento dos microrganismos <i>Rhodotorula glutinis</i> CCT 0783 (a.) e <i>Lipomyces starkeyi</i> NRRL Y-11557 (b.) ○ Biomassa total, ▲ Xilose, ✱ pH.....	40
Figura 3.4: Crescimento de <i>Lipomyces starkeyi</i> NRRL Y-11557 em diferentes meios. ■ Glicose, Extrato levedura - Sulfato amônio, × Xilose, Extrato levedura -	

Sulfato amônio, ▲ Xilose, Uréia, □ Xilose, Extrato levedura - Sulfato amônio.....	41
Figura 3.5: Influencia do extrato de levedura no crescimento de <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296 a duas relações C/N. a. C/N=50 g/g, b. C/N=100 g/g. ■ Com extrato de levedura,○ Sem extrato de levedura.....	43
Figura 4.1: Perfil de crescimento e consumo de xilose para <i>Rhodotorula glutinis</i> CCT 0783.....	54
Figura 4.2: Perfil de crescimento e consumo de xilose para <i>Cryptococcus laurentii</i> INCQS 40043.....	55
Figura 4.3: Perfil de crescimento e consumo de xilose para <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296.....	55
Figura 4.4: Relação entre a taxa máxima de crescimento e a biomassa máxima atingida para cada microrganismo testado.....	56
Figura 4.5: Relação entre a taxa máxima de crescimento e fração de lipídeos para cada microrganismo testado.....	57
Figura 4.6: Análise de clusters do espaço bidimensional descrito entre a taxa máxima de crescimento e o conteúdo de lipídeos.....	58
Figura 4.7: Relação entre o rendimento energético e o rendimento em lipídeos para os microrganismos avaliados.....	62
Figura 4.8: Relação entre o rendimento energético e o rendimento em biomassa livre para os microrganismos avaliados.....	62
Figura 4.9: Produtividade dos microrganismos em função das taxas de consumo de xilose e máxima de crescimento.....	63
Figura 5.1: Efeito da concentração inicial de xilose no crescimento de <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296 a. cinéticas de crescimento, b. biomassa final após 120 h de cultivo.....	71
Figura 5.2: Velocidade específica de consumo de substrato em função da concentração inicial de substrato.....	73

- Figura 5.3:** Velocidade máxima específica de crescimento em função da concentração inicial de substrato, ajuste de diferentes modelos (—) em comparação ao comportamento predito por Monod (—), a. Mulchandani, b. Luong, c. Andrews.....75
- Figura 5.4:** Cultivo em biorreator de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296. ■ Biomassa total, * Lipídeos, ● Xilose, ▲ Nitrogênio amoniacal..... 78
- Figura 5.5:** Comparação dos resultados simulados com o modelo matemático proposto e os dados experimentais obtidos em biorreator. As linhas descontínuas representam a simulação utilizando a μ_{\max} global, as contínuas utilizando a μ_{\max} celular ○,(—) biomassa total; ■,(—) biomassa livre; △,(—) lipídeos; ×, (—) xilose; ▲,(—) N-NH₃.....82
- Figura 5.6:** Análise dos lipídeos microbianos por CCD. a. Trioleína, b. Ácido oléico, c. Óleo de soja, d. Lipídeo microbiano biorreator, e. Lipídeo microbiano frasco agitado..... 83
- Figura 5.7:** Cromatograma gasoso dos lipídeos microbianos produzidos por *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 em biorreator.....84
- Figura 6.1:** Perfis de concentração para o cultivo em batelada alimentada FB1. a. Biomassa total (■), xilose (○), conteúdo de lipídeos (*) b. Concentração celular (▲), nitrogênio amoniacal (▽) c. Oxigênio dissolvido (—)..... 95
- Figura 6.2:** Perfis de concentração para o cultivo em batelada alimentada FB2. a. Biomassa total (■), xilose (○), conteúdo de lipídeos (*) b. Concentração celular (▲), nitrogênio amoniacal (▽) c. Oxigênio dissolvido (—)..... 97
- Figura 6.3:** Micrografias do processo de acúmulo de lipídeos durante o cultivo em batelada alimentada FB2. O quadrado no fundo de cada micrografia possui uma largura de 50 μm . A seta indica a inclusão lipídica dentro da célula. a. 0 h, b. 24 h, c. 48 h, d. 72 h, e. 96 h, f. 120 h..... 98
- Figura 6.4:** Perfis de concentração para o cultivo em batelada alimentada FB3. a. Biomassa total (■), xilose (○), conteúdo de lipídeos (*) b. Concentração celular (▲), nitrogênio amoniacal (▽) c. Oxigênio dissolvido (—)..... 101

- Figura 6.5:** Perfis de concentração para o cultivo em batelada alimentada FB4. a. Biomassa total (■), xilose (○), conteúdo de lipídeos (✱) b. Concentração celular (▲), nitrogênio amoniacal (▽) c. Oxigênio dissolvido (–)..... 103
- Figura 6.6:** Evolução do rendimento biomassa livre/substrato em cada etapa de alimentação, Batelada inicial (■), 1ª alimentação (■), 2ª alimentação (■), 3ª alimentação (■) (valores não cumulativos)..... 104
- Figura 6.7:** Evolução do rendimento lipídeo/substrato em cada etapa de alimentação Batelada inicial (■), 1ª alimentação (■), 2ª alimentação (■), 3ª alimentação (■) (valores não cumulativos).....105
- Figura 6.8:** Perfis de concentração de ácidos graxos dos lipídeos produzidos no experimento FB2. C16:0 (■), Δ^9 C16:1 (◇), C18:0 (×), Δ^9 C18:1, *cis* (○), $\Delta^{9,12}$ C18:2, *cis* (▲)..... 107
- Figura 6.9:** Produtividade da produção de lipídeos no decorrer das fermentações. FB1 (▲), FB2 (■), FB3 (○)..... 109

NOMENCLATURA

Símbolo	Nome	Unidades
k_1	Constante cinética da produção de lipídeo	$g_l / g_{x_{livre}}$
k_2	Constante cinética da produção de lipídeo	$g_l / g_{x_{livre}} h$
k_3	Constante cinética de consumo de nitrogênio	$g_N / g_{x_{livre}}$
k_4	Constante cinética de consumo de substrato	$g_s / g_{x_{livre}}$
k_5	Constante cinética de consumo de substrato	$g_s / g_{x_{livre}} h$
K	Concentração de biomassa final	g/L
K_S	Constante de saturação	g/L
K_{Si}	Constante do modelo de Andrews	g/L
L	Conteúdo de lipídeos	%
m	Exponente do modelo de Luong	---
n	Exponente do modelo de Mulchandani	---
P	Concentração de produto intracelular (lipídeo)	g/L
R	Concentração de biomassa ativa (ou livre)	g/L
R^2	Quadrado do coeficiente de correlação	---
S	Concentração de substrato	g/L
t	Tempo	h
X	Concentração de biomassa total	g/L
$Y_{L/S}$	Rendimento lipídeo/substrato	g_l / g_s
$Y_{x_{livre}/S}$	Rendimento biomassa livre/substrato	$g_{x_{livre}} / g_s$
$Y'_{x_{livre}/S}$	Rendimento molar biomassa livre/substrato	$mol_{x_{livre}} / mol_s$
Letras gregas		
μ	Velocidade específica de crescimento	h^{-1}
v	Velocidade de crescimento	$g/L \cdot h$

λ	Duração fase <i>lag</i>	h
γ	Grau de redução	---
η	Rendimento energético do crescimento	J/J
σ	Fração mássica de carbono	---

Subscritos

0	Estado inicial
cel	Respeito à célula ativa
global	Respeito à biomassa total
l	Lipídeo
m	Estado de inibição total
max	Máximo valor atingido
N	Nitrogênio
p	Produto
s	Substrato
x	Biomassa total
x livre	Biomassa livre de lipídeo

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

A capacidade de alguns microrganismos produzirem quantidades importantes de lipídeos, os denominados *single-cell oil* (SCO), já é conhecida e recebeu na década de oitenta grande atenção da comunidade científica. Foram desenvolvidos, então, processos não-convencionais de produção de lipídeos por fermentação. Não obstante, avaliações técnico-econômicas revelaram a inviabilidade econômica desses processos devido ao baixo valor das gorduras produzidas no mercado. Estabeleceu-se que os lipídeos produzidos por fermentação teriam que possuir características especiais de elevado valor, como são os ácidos graxos poliinsaturados, os fosfolipídeos, entre outros.

Com o desenvolvimento nos últimos anos de novas ferramentas biotecnológicas, tais como novos processos de fermentação em grande escala, modificação genética e a engenharia metabólica e junto com o interesse governamental no desenvolvimento de processos de produção alternativos baseados em fontes renováveis, faz-se agora atrativa a produção microbiológica de óleos e gorduras para diversas aplicações, desde alimentícias (dadas às propriedades nutracêuticas nos ácidos graxos insaturados) até a produção de biodiesel e biolubrificantes.

A indústria do biodiesel trouxe um aumento na demanda de ácidos graxos, a qual não poderá ser mais suprida ao longo prazo usando apenas óleos vegetais. A busca por fontes alternativas de lipídeos, especialmente aquelas que possam ser conduzidas continuamente, sem requerimentos de terra arável e sem competição com

propósitos alimentícios é de vital importância para o crescimento sustentável desta indústria. Neste sentido, os SCO projetam-se como uma solução potencial desta demanda.

Neste trabalho, estudos desenvolvidos visando o estabelecimento de um processo de produção de SCO a partir de pentoses provenientes de materiais lignocelulósicos foram desenvolvidos, oferecendo assim uma potencial alternativa para o aproveitamento destes carboidratos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da obtenção de lipídeos a partir de fontes de carbono de origem renovável, particularmente pentoses, que estarão disponíveis via hidrólise de materiais lignocelulósicos como o bagaço e a palha da cana de açúcar.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Estudar a produção de lipídeos por microrganismos capazes de utilizar a xilose como única fonte de carbono, especificamente leveduras das espécies *Rhodotorula sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Lipomyces sp.*, *Candida sp.*, *Rhodosporidium sp.* e *Yarrowia sp.*
2. Selecionar a linhagem com potencial para sua utilização no processo, de acordo com os parâmetros cinéticos de fermentação.

Para a linhagem selecionada:

3. Identificar as variáveis de processo que afetam a produção de lipídeos.
4. Estabelecer as cinéticas de crescimento, consumo de substrato e produção de lipídeos em fermentador a escala de dois litros.
5. Analisar o processo de produção no modo de batelada alimentada.

2.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipídeos microbianos ou *Single-cell oil*

Denominam-se lipídeos microbianos as gorduras e/ou óleos produzidos por fermentação usando algas, fungos filamentosos, e principalmente leveduras, isto é, em sua maioria por microrganismos eucarióticos. Os triglicerídeos são os principais componentes lipídicos encontrados nestes microrganismos (RATLEDGE C., 1991), compostos de cadeias de ácidos graxos com tamanhos entre 14 e 20 carbonos (ZHAO X., 2008) (Figura 2.1), o que, como será exposto posteriormente, provêem-lhes atrativas características industriais.

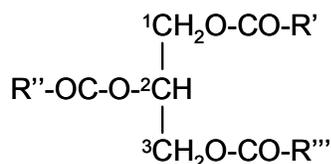


Figura 2.1: Estrutura geral dos triglicerídeos

Recentemente algumas bactérias foram descritas como produtoras de lipídeos, mas sob condições especiais de cultivo (ALVAREZ H.M., *et al.*, 2000), porém sua caracterização e obtenção estão em estudo. O termo *Single-cell oil* (SCO) foi adotado pela comunidade científica para denominar os lipídeos, particularmente os triglicerídeos, produzidos microbiologicamente (MORETON R.S., 1988), assim estão excluídos desta definição outras classes mais complexas de lipídeos como fosfolipídeos, glicolipídeos, carotenóides e inclusive o poli-β-hidroxicanoato de bactéria. Esta expressão é utilizada com a intenção de fazer uma analogia com o

Single-cell protein proposto pelo Professor Carol Wilson do Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) para denominar as proteínas extraídas de microrganismos (bactérias, leveduras, fungos e algas) a partir de resíduos da agroindústria. Conseqüentemente com sua denominação, os SCO também são gerados a partir destes materiais.

Os SCO possuem estrutura similar aos óleos vegetais e distribuição similar à dos ácidos graxos nas três posições do glicerol central, isto é, os ácidos graxos saturados são quase totalmente excluídos da posição central (*sn-2*). Para os SCO provenientes de leveduras e fungos a distribuição de ácidos graxos na molécula é muito similar à dos óleos vegetais (Tabela 2.1) (RATLEDGE C., 1993); não obstante, para os encontrados em algas os principais ácidos graxos são de cadeia longa, no caso de *Chlorella protothecoides* estão na faixa de C₁₅ a C₂₁, sendo o ácido 9-octadecenoico o de maior teor (60-64%) (XIONG W., *et al.*, 2008).

Tabela 2.1: Distribuição dos ácidos graxos nos SCO de algumas leveduras e fungos comparados com os óleos vegetais*

	Porcentagem relativa (p/p) dos principais resíduos de ácidos graxos						
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Leveduras							
<i>Cryptococcus albidus</i>	traços	12	1	3	73	12	n.d.
<i>Lipomyces starkeyi</i>	traços	34	6	5	51	3	n.d.
<i>Rhodotorula glutinis</i>	traços	37	1	3	47	8	n.d.
Fungos							
<i>Cunninghamella japônica</i>	traços	16	n.d.	14	48	4	8 ^a
<i>Aspergillus terreus</i>	2	23	n.d.	traços	14	40	21
Óleos vegetais							
Palma		44	n.d.	5	39	11	traços
Soja		11	n.d.	4	22	53	8
Algodão		27	n.d.	2	18	51	traços

n.d.: Não detectado

^a: Ácido γ -linolênico (GLA), 18:3 (6,9,12)

* Modificado de RATLEDGE C., 1993

Os lipídeos microbianos são potencialmente comercializáveis. Devido ao elevado conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), os SCO produzidos por fungos e algas têm usos como nutracêuticos, farmacêuticos e como ração para aquicultura (LEWIS *et al.*, 2000; RATLEDGE C., 1993). Enorme desenvolvimento foi alcançado em quanto à aplicação dos SCO de leveduras na indústria oleoquímica e particularmente na produção de biodiesel, graças à semelhança química com os óleos vegetais (ANGERBAUER C., *et al.*, 2008; XIONG W., *et al.*, 2008; ZHAO X., *et al.*, 2008; DAI C-C., *et al.*, 2007; PENG X., CHEN H., 2007; LIU B., ZHAO Z.K., 2007; XUE F., *et al.*, 2006), incrementando as possibilidades de exploração industrial destes lipídeos.

No momento, o alto custo de produção dos SCO é a maior barreira para sua comercialização, no entanto para os SCO com fins nutricionais (PUFA), sua produção é hoje viável economicamente (RATLEDGE C., 2004). Como na maioria dos processos de produção por fermentação de produtos químicos (*bulk chemicals*), o maior impacto no custo de produção é devido ao custo da matéria prima, este é o caso dos lipídeos produzidos por leveduras. Apenas com a utilização de matérias primas de baixo custo, disponíveis em grandes volumes, a produção de SCO com fins industriais poderá ser transformada em realidade.

2.2 Microrganismos produtores

Microrganismos que acumulam intracelularmente lipídeos na forma de glóbulos discretos, estando estes em teores acima de 20%, são considerados pertencentes ao conjunto de espécies de microrganismos oleaginosos (MORETON R.S., 1988).

Os principais microrganismos conhecidos como produtores de lipídeos são leveduras (20-25 cepas) (Tabela 2.2), fungos (aproximadamente 100 cepas) (Tabela 2.3), um número pequeno, mas indeterminado de algas (RATLEDGE C., 1991) e não mais de três gêneros de bactéria (*Rhodococcus*, *Acinetobacter* e *Nocardia*) (ALVAREZ H.M., *et al.*, 1996). Segundo o tipo de lipídeo desejado deve ser feita a escolha do microrganismo. As leveduras são as mais utilizadas na produção de lipídeos de

cadeias saturadas e algas e fungos foram reconhecidos como produtores de ácidos graxos poliinsaturados.

Tabela 2.2: Espécies de leveduras oleaginosas*

Espécie de levedura	Conteúdo Máximo de lipídeos [%] (p/p)
<i>Candida curvata</i> (<i>Apiotrichum curvatum</i>)	58
<i>Candida diddensiae</i>	37
<i>Candida guilliermondi</i>	22
<i>Candida tropicalis</i>	23
<i>Candida sp. 107</i> (NCYC 911)	42
<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Cryptococcus laurentii</i>	32
<i>Cryptococcus neoformis</i>	22
<i>Hansenula cifferri</i>	22
<i>Hansenula saturnus</i>	22
<i>Lipomyces lipofer</i>	64
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	67
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	66
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
<i>Rhodotorula graminis</i>	36
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	28
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	23
<i>Trichosporon cutaneum</i>	45
<i>Trichosporon pullulans</i>	65
<i>Trigonopsis variabilis</i>	40
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36

* RATLEDGE C., 1991

A quantidade de lipídeos produzida e sua composição diferem de acordo à cepa e as condições de cultivo. As leveduras oleaginosas têm sido as mais estudadas

devido a sua capacidade de acumular grandes quantidades de lipídeos e suas elevadas taxas de crescimento (HASSAN M., *et al.*, 1996)

Uma revisão dos estudos referentes a esta tecnologia mostra que as leveduras oleaginosas são os microorganismos mais importantes na produção de óleos microbianos, sendo estas *Cryptococcus curvatus* (conhecido também como *Candida curvata* ou *Apiotrichum curvatum*) (GILL C.O., *et al.*, 1977; HEREDIA L., RATLEDGE C., 1988; YKEMA A., *et al.*, 1989; HASSAN M., *et al.*, 1996; MEESTERS P.A., *et al.*, 1996), *Rhodotorula gracilis* (também conhecida como *Rhodotorula glutinis*) (CHOI S.Y., DEWEY D.Y., 1982; GRANGER L-M. *et al.*, 1983; PRAPULA S.G., *et al.*, 1992), *Rhodospiridium toruloides* (YONG-HONG L., *et al.*, 2006; YONG-HONG L., *et al.*, 2007), *Yarrowia lipolytica* (PAPANIKOLAU S., AGGELIS G., 2002) e *Lipomyces starkeyi* (AKHTAR P., *et al.*, 1998; LIU B., ZHAO Z.K., 2007; ANGERBAUER C., *et al.*, 2008; ZHAO X., *et al.*, 2008), devido à alta produtividade de lipídeos, boa estabilidade e a relativa facilidade no cultivo.

Tabela 2.3: Principais espécies de fungos oleaginosos*

Espécie de fungo	Conteúdo máximo de lipídeos [%] (p/p)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	45
<i>Cunninghamella japônica</i>	60
<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhizopus arrhizus</i>	57
<i>Rhizopus oryzae</i>	57
<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Aspergillus terreus</i>	57
<i>Gibberella fujikoroii</i>	48
<i>Humicola lanuginosa</i>	75

* Modificado de RATLEDGE C., 1991

Estas leveduras possuem características metabólicas comuns o que se traduz em condições de operação similares para a produção dos lipídeos, em particular no que se refere ao teor de nitrogênio no meio de cultivo, já que em concentrações limitantes de nitrogênio, o crescimento celular é reprimido e o carbono consumido é transformado e armazenado na forma de inclusões lipídicas (HASSAN M., *et al.*, 1996).

Assim sendo, a produção de lipídeos encontra-se parcialmente associada ao crescimento e apesar do mecanismo similar de biossíntese de lipídeos, outros nutrientes como o ferro, fósforo e o oxigênio podem afetar a produção de óleos e gorduras, sendo este efeito dependente da linhagem de levedura (CHOI S.Y., DEWEY D.Y., 1982; GRANGER L-M. *et al.*, 1983; HASSAN M., *et al.*, 1996).

2.3 Aspectos bioquímicos

Os lipídeos em microrganismos oleaginosos podem provir de três fontes diferentes, isto é, externas quando estes são supridos no meio de cultura e transportados ao interior da célula, sintetizados pela via endógena na qual fosfolipídeos ou glico/lipoproteínas são rompidas, ou pela síntese biológica de novos triglicerídeos (TEHLIVETS O. *et al.*, 2006).

A formação de lipídeos em leveduras oleaginosas ocorre basicamente em três etapas: acúmulo de acetil coenzima A, biossíntese de ácidos graxos e biossíntese de triacilglicerol. Estes triglicerídeos são sintetizados pela progressiva acilação do glicerol-3-fosfato por três acil-transferases, o grupo fosfato é removido pela ação de uma fosfatase (GANGAR A., *et al.*, 2002), juntas estas reações conformam a via de Kennedy para a biossíntese de triglicerídeos (NELSON D.L., COX M.M., 2004).

Acetil-CoA é produzido via acetil-CoA sintase ou ATP:citrato liase, sofrendo ação da carboxilase para produzir malonil-CoA, iniciando a biossíntese dos ácidos graxos. A reação da Acetil-CoA carboxilase é irreversível e a reação limitante do processo. A formação das cadeias de ácido graxo ocorrem pela adição de malonil-

CoA em Acetil-coA, sendo que o alongamento da cadeia ocorre pela adição sucessiva de grupos malonil-CoA na terminação carboxílica, o alongamento dos ácidos graxos ate 26 carbonos acontece no reticulo endoplasmático assim como no citoplasma pela ação da acido graxo sintetase (TEHLIVETS O. *et al*, 2006). A formação da cadeia é terminada pela remoção do grupo acil, tanto por hidrólise quanto por transferência, portanto a síntese de triacilglicerois envolve três reações de acilação. A Figura 2.2 mostra as reações descritas e na Figura 2.3. um resumo da biossíntese de lipídeos (MORETON R.S., 1988).

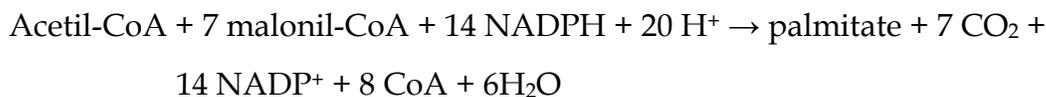
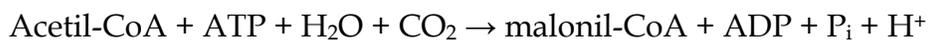
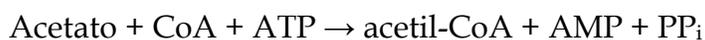


Figura 2.2: Biossíntese de triacilglicerois por leveduras oleaginosas

A via metabólica da acumulação de lipídeos em microrganismos oleaginosos está representada na Figura 2.4. Resumidamente, em condições limitantes de nitrogênio, a concentração de adenosina monofosfato (AMP) diminui e a concentração de citrato aumenta possibilitando o acúmulo de lipídeos (RATLEDGE C., 1991).

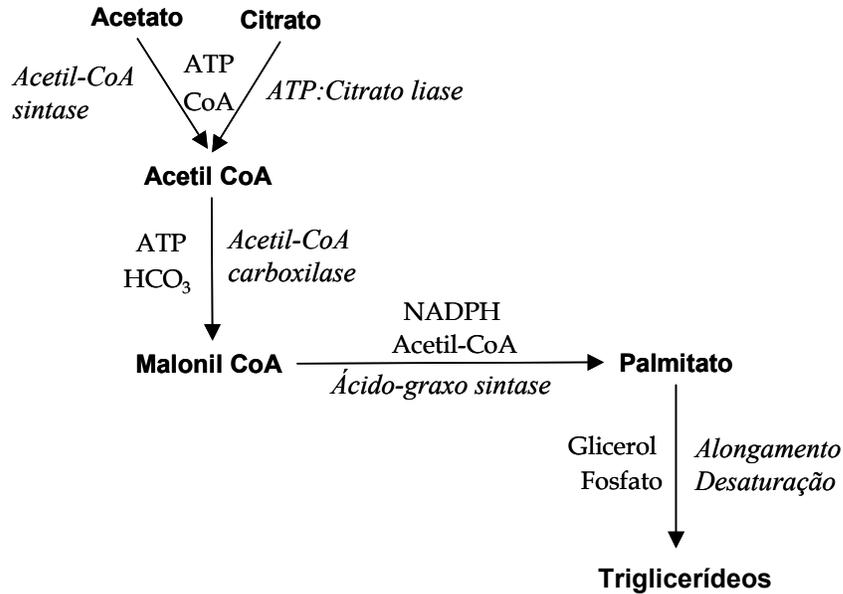


Figura 2.3: Resumo da biossíntese de triglicerídeos

Quando o nitrogênio é exaurido do meio, AMP é deaminada e NH_3 é usada como fonte de nitrogênio para manutenção das funções celulares. Como AMP ativa a enzima fosfatase e inibe as enzimas quinases, que controlam a fosforilação da enzima isocitrato desidrogenase do ciclo do ácido cítrico, a redução da concentração de AMP pela exaustão de nitrogênio, causa a perda da atividade desta enzima e ocorrendo acúmulo de isocitrato na mitocôndria (Figura 2.4). Como a transformação de citrato em isocitrato é reversível, e controlada pelo equilíbrio, ocorre acúmulo de citrato na mitocôndria, que é transportado para o citosol, estimulando a ATP:citrato liase e o acúmulo de lipídeos.

Assim, enquanto o Acetil-CoA é usado na produção de ácidos graxos, oxaloacetato é reduzido a malato, liberando NADPH, e o ciclo piruvato-malato é completado quando o piruvato entra na mitocôndria e é carboxilado em oxaloacetato para entrar no ciclo de ácido cítrico.

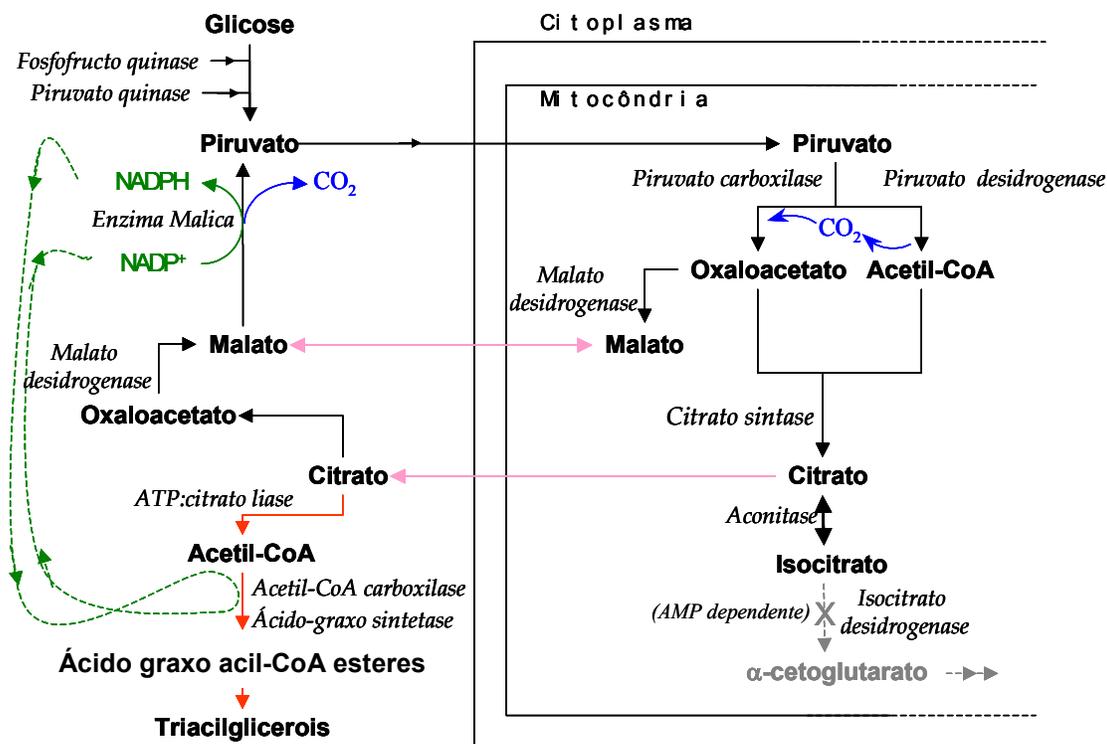


Figura 2.4: Indução do acúmulo de lipídeos por microrganismos oleaginosos, (modificado de RATLEDGE C., 1991)

Como os triglicerídeos são compostos neutros, não são acumulados na bicamada fosfolipídica da membrana, por isto são depositados em partículas ou corpos lipídicos dentro do citoplasma (CZABANY T., *et al.*, 2007). Estes corpos estão compostos de uma monocamada fosfolipídica que envolve o núcleo formado majoritariamente de lipídeos neutros. Em leveduras não-oleaginosas a composição destes lipídeos neutros pode estar dividida entre triglicerídeos e ésteres de estero, mas leveduras oleaginosas acumulam quase exclusivamente triglicerídeos.

O mecanismo da formação dos corpos lipídicos é apresentado na Figura 2.5, as enzimas responsáveis pela síntese de triglicerídeos encontram-se localizadas no retículo endoplasmático, o produto final da ação destas enzimas é o lipídeo neutro que é acumulado no interior da bicamada fosfolipídica da membrana desta organela (A,B). Micro-corpos lipídicos são formados (C,D), quando estes atingem certo tamanho final são separados da bicamada, conformando um corpo independente (E).

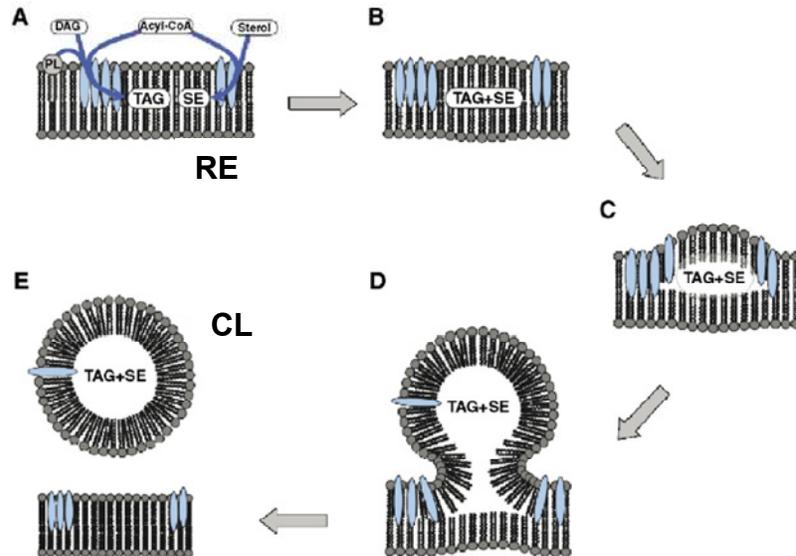


Figura 2.5: Mecanismo de formação dos corpos lipídicos dentro de leveduras, (CZABANY T., *et al.*, 2007). (RE) Reticulo Endoplasmático, (TAG): Triglicerídeos, (DAG): Diglicerídeos, (SE): Ésteres de esterol, (PL): Fosfolipídio, (CL): Corpo Lipídico.

2.4 Aspectos tecnológicos

A produção de lipídeos por leveduras oleaginosas foi estudada em diferentes processos: batelada, batelada alimentada (YKEMA A., *et al.*, 1989) e processo contínuo (GILL C.O., *et al.*, 1977; HEREDIA L., RATLEDGE C., 1988) sendo os dois últimos os mais apropriados para maximizar a produção de lipídeos já que é possível ajustar a relação carbono/nitrogênio para obtenção inicial de altas concentrações celulares e depois para estimular a produção de lipídeos.

A levedura *Rhodosporidium toruloides* foi utilizada em cultivos batelada atingindo produção máxima de 18.2 g.L^{-1} de biomassa com uma porcentagem de lipídeos de 76% (p/p) totalizando $13 \text{ g lipídeo.L}^{-1}$ utilizando glicose como fonte de carbono (YONG-HONG L., 2006). Foi destacada a aparente capacidade de utilização de outras fontes de carbono, além da glicose, como hidrolisados lignocelulósicos.

Nos três modos de operação, especialmente no cultivo contínuo, GILL C.O. e colaboradores (1997) mostraram que *Cryptococcus curvatus* apresenta características superiores de crescimento e de produtividade, obtendo valores de $0,03 \text{ g lipídeos} \cdot \text{g}$

biomassa⁻¹ · h⁻¹ em comparação com os trabalhos de GRANGER L-M. (1983) onde foram obtidos 0,012 g lipídeos · g biomassa⁻¹ · h⁻¹ para *Rhodotorula gracilis* em condições similares de cultivo. Modelagem matemática e metodologias de determinação e recuperação de lipídeos demonstram o potencial tecnológico desta alternativa.

Alguns estudos utilizando *Cryptococcus curvatus* sugerem que há a necessidade de concepção de novos biorreatores, específicos para esse processo, já que em alta concentração celular, necessária para uma alta produtividade de lipídeos, fatores como a aeração e a eficiência da mistura são determinantes (MEESTERS P.A., WAL H., 1996). A possibilidade técnica real destes processos em escala industrial ainda deverá ser estudada, já que os custos dependem da fonte de carbono a ser utilizada, que deve ser disponível de forma continuada em altas quantidades.

Neste aspecto, *Cryptococcus curvatus* e *Lipomyces starkeyi* destacam-se como microorganismos capazes de consumir diferentes fontes de carbono, partindo desde açúcares como glicose até as mais complexas como águas residuais e xilose [ANGERBAUER C., et al., 2008; ZHAO X., et al., 2008], esta última de grande interesse industrial já que representa uma boa porcentagem nos hidrolisados de bagaço de cana, um subproduto agrícola de grande potencial biotecnológico no Brasil.

Outro aspecto a considerar é o referente às fontes de nitrogênio e fatores de crescimento para a produção de biomassa. Uma característica destes microorganismos é não serem exigentes, podendo se desenvolver a partir de fontes de nitrogênio como amônia e uréia, favorecendo cultura em larga escala a custo comparativamente baixo.

As condições de cultivo são tão importantes em relação ao crescimento celular quanto à produção de lipídeos e tipos de lipídeos produzidos. Alguns trabalhos observaram que tanto o crescimento, quanto a produção de lipídeos, dependem da fonte de nitrogênio (YOON, S.H., et al., 1982). Outros estudos demonstraram que as enzimas desaturases são mais ativas em temperaturas mais baixas, aumentando o

grau de insaturação dos lipídeos. É importante observar que a formação de ligações duplas exige oxigênio, então em condições limitantes de oxigênio a porcentagem de ácidos graxos insaturados é diminuída (RATLEDGE C., 1991; MORETON R.S., 1988).

2.5 Cinética ideal de fermentação

Para a maioria dos microrganismos oleaginosos, as condições ótimas de produção de lipídeos são aquelas nas quais existe um excesso de carbono e limitação de outros nutrientes, principalmente nitrogênio (YONG-HONG L., *et al.*, 2007). Esta limitação garante que a multiplicação das células cesse em algum ponto no começo da fase exponencial, devido à escassez de nitrogênio limitando a síntese de novas células. Entretanto, as espécies oleaginosas possuem características metabólicas que permitem continuação do consumo de substrato, sendo este convertido em lipídeo e armazenado como reserva energética dentro da célula (RATLEDGE C., 1991).

Na figura 2.6 observam-se os perfis ideais baseados no comportamento apresentado pelas leveduras oleaginosas, durante os primeiros dias de crescimento. Pode-se observar um crescimento balanceado e a seguir a fase de acúmulo de lipídeos. Devido à limitação de nitrogênio imposta, a velocidade específica de crescimento não é elevada. É de esperar um esgotamento total de nitrogênio (no exemplo apresentado isto acontece no primeiro dia) e um aumento da biomassa total após este ponto devido ao acúmulo de lipídeos (MORETON R.S., 1988). Assim é evidente que as células aumentarão seu tamanho e sua massa, o que é similar ao conceito de obesidade apresentado em animais superiores.

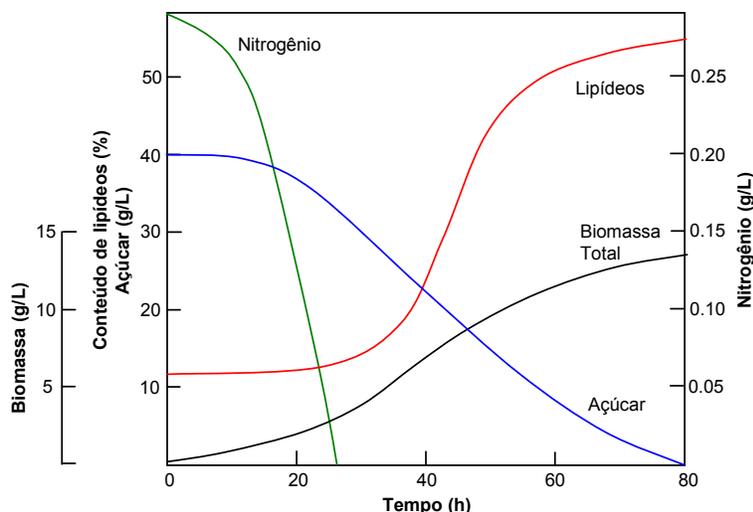


Figura 2.6: Cinéticas ideais durante o processo de fermentação de uma levedura oleaginosa (RATLEDGE C., 1991)

Neste processo são esperados rendimentos de lipídeo-substrato na faixa de 15-20% (RATLEDGE C., 1991), sendo o rendimento teórico máximo entre 32 e 33% (RATLEDGE C., COHEN Z., 2008; MORETON R.S., 1988). Este limite condiciona a aplicabilidade do processo a escalas de produção, desenvolvimentos neste sentido devem ser feitos, tipicamente mediante abordagens de análise de fluxos metabólicos (VARMA A., PALSSON B.O., 1994).

2.6 A produção microbiana de lipídeos sob o escopo da biorrefinaria

Durante a última década vem-se desenvolvendo um novo conceito de produção, baseado na evolução das refinarias convencionais, agora aplicado ao desenvolvimento industrial sustentável. Uma breve descrição dos princípios das biorrefinarias e como a produção microbiana de SCO poderia ser inserida neste novo cenário é apresentada a seguir.

2.6.1 Biorrefinarias: descrição e princípios.

Com a necessidade da substituição parcial da plataforma petroquímica, processos não convencionais de produção de combustíveis e blocos construtores para

síntese química devem ser desenvolvidos. Quando estes produtos são obtidos de fontes renováveis e de maneira integrada estabelece-se o conceito de biorrefinaria (LYND L.R., *et al*, 1999). Dentro das biorrefinarias deverão combinar-se as tecnologias necessárias entre a concepção (via engenharia metabólica) e exploração das matérias primas biológicas (biomassa) e a produção de químicos industriais intermediários e finais, isto é conseguido usando uma combinação sinérgica entre conversões biológicas e químicas (Figura 2.7).

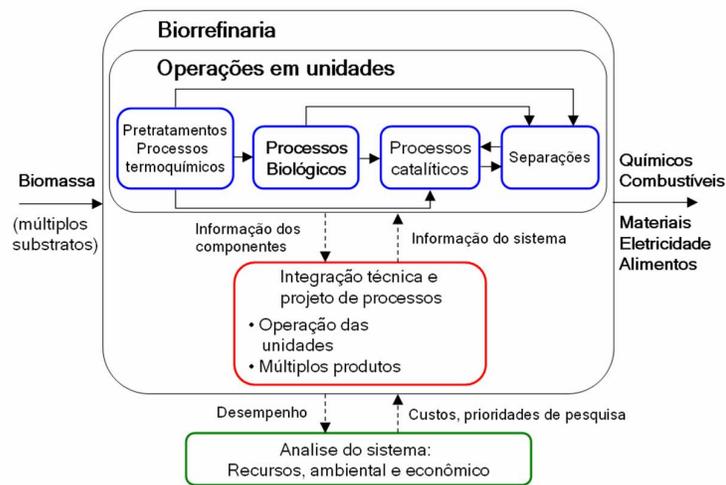


Figura 2.7: Esquema conceitual da Biorrefinaria

As biorrefinarias devem ser projetadas para processar os precursores contidos na biomassa (carboidratos, óleos, proteínas), para isto numa primeira etapa eles devem ser separados por processos físicos. Logo depois os produtos e subprodutos das separações devem ser submetidos a processos microbiológicos e/ou químicos. Uma vez purificados, os novos produtos e subprodutos podem ser comercializados ou alimentados nas refinarias convencionais. Esta nova abordagem de produção pode ser resumida num único objetivo; define-se, então, que o alvo atrás do desenvolvimento de qualquer biorrefinaria deve corresponder à seguinte expressão (KAMM B., KAMM M., 2004):

$$\text{Mistura de matérias primas} + \text{Combinação de processos} \rightarrow \text{Diversos produtos} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

O desenvolvimento e futuro estabelecimento de ditos complexos de produção serão “A chave para o acesso a uma produção integrada de alimentos, rações animais, químicos, materiais e combustíveis no futuro” (U.S.NRC, 2000).

O atual crescimento econômico precisa de recursos sustentáveis para utilização na produção industrial, os recursos energéticos podem ser originários de várias fontes sejam vento, sol, água, biomassa, fusão e fissão nucleares, mas os materiais majoritariamente dependem de biomassa, em particular de biomassa proveniente de plantas. Hoje só 6×10^9 das 170×10^9 T/ano da biomassa produzida são utilizadas, desta quantidade só 3% podem ser usadas em transformações industriais (KAMM B., KAMM M., 2004). Estes recursos devem ser aproveitados mais eficientemente, uma vez que este aproveitamento tem inerentes dificuldades devido às características da biomassa vegetal, sendo a separação da biomassa em seus componentes principais para um posterior processamento um dos maiores retos no estabelecimento de biorrefinarias.

Uma das prioridades de pesquisa apontadas pelo *U.S. National Research Council* (U.S. NRC, 2000) é o estabelecimento de processos eficientes de transformação da matéria lignocelulósica em materiais processáveis via biotecnológica e/ou química tradicional. Processos eficientes de pré-tratamento, que visam à separação da celulose da hemicelulose e lignina, e a hidrólise enzimática devem estar disponíveis em escala industrial em breve. Com isto, garante-se o aproveitamento quase total da biomassa vegetal.

Em consequência do exposto anteriormente, as matérias primas disponíveis para o processamento nas biorrefinarias serão os dois carboidratos de maior abundância na natureza, a glicose e a xilose. Existe uma enorme quantidade de conversões microbianas baseadas em glicose que poderão ser usadas nas biorrefinarias, todas elas estudadas desde o surgimento da “microbiologia industrial”, muito bem documentadas e em geral, favoráveis energeticamente. No caso da xilose existe um déficit em relação a processos desenvolvidos visando a sua

utilização na geração de bioprodutos. Casos como a produção de xilitol, um adoçante substituto do açúcar, só resultarão num aproveitamento marginal desta grande fonte de carbono. Recentemente estão sendo desenvolvidos processos cujo objetivo é a produção de etanol a partir de xilose usando microrganismos recombinantes. Barreiras em respeito às características próprias do metabolismo da xilose foram encontradas (JEFFRIES T.W., 2006) razão pela qual estes processos, até agora, não tiveram sucesso. Novas alternativas referentes ao aproveitamento da xilose devem ser desenvolvidas.

2.6.2 Sistemas de biorrefinaria

Desde finais da década passada vem-se discutindo a idéia de centralizar os processos de produção de químicos em complexos industriais, conhecido inicialmente como engenharia de "*Biocommodities*" a idéia foi aperfeiçoada e se tornou num conceito, o atual de biorrefinaria. Desde aquela época era reconhecido que o maior impedimento para uma aplicação global em grande escala deste conceito era a ausência de tecnologias de processamento de baixo custo (LYND L.R., *et al.*, 1999), reconhecendo também que a fonte deste custo era consequência da matéria prima, da sua disponibilidade e mais ainda, de sua adequação.

A primeira abordagem visando uma redução dos custos de produção foi feita baseada na integração e, principalmente, na intensificação de processos. Foi assim que se estabeleceu que um bioprocessamento consolidado da biomassa necessita incluir etapas de produção de celulase, hidrólise e fermentação e deveria ser feito numa única unidade sob a ação de uma ou várias populações de microrganismos. Projetaram-se então os denominados Sistemas de Conversão Microbiana Direta. (Figura 2.8)

Nesta primeira etapa surgiram diversas barreiras, a principal delas devida à necessidade de obtenção de microrganismos capazes de realizar tão complexo processamento. Durante muito tempo teve-se como objetivo o desenvolvimento de

um microrganismo com a habilidade de converter os componentes da biomassa em diversos produtos com rendimentos e concentrações elevadas. Duas vias apareceram naturalmente, o melhoramento de microrganismos nativos que exibissem um amplo espectro de consumo de substratos (melhoramento voltado a produtos), ou a inserção de determinadas características de consumo de substratos dentro de microrganismos com boas capacidades de produção (melhoramento voltado a substrato).

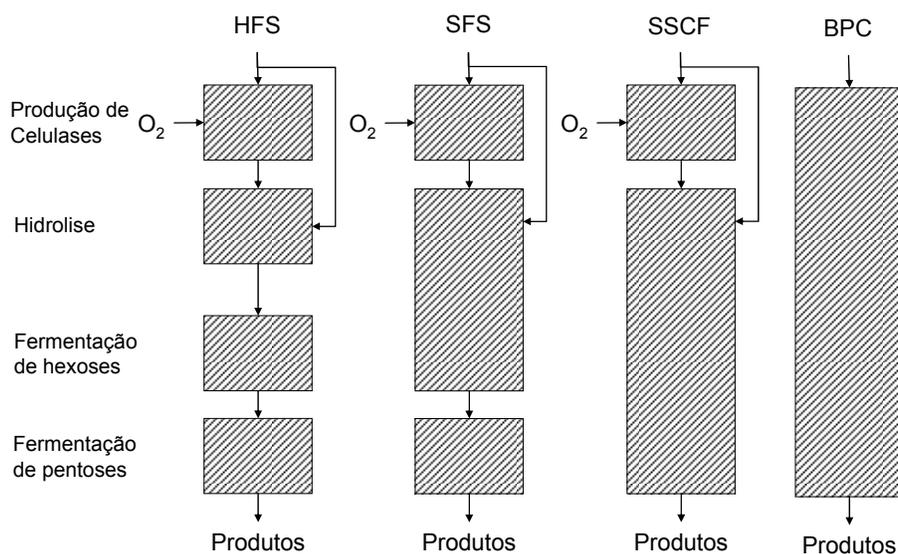


Figura 2.8: Evolução do conceito de processamento consolidado na Engenharia de *Biocommodities*.
HFS: hidrólise e fermentação separadas, SFS: Sacarificação e fermentação simultâneas, SSCF: Sacarificação e co-fermentação simultâneas, BPC: Bioprocessamento consolidado

O resultado destas abordagens apontou que algumas espécies de microrganismos anaeróbios poderiam ser alvo de ditas modificações. Esta solução tornou-se controversa pois as taxas de produção e consumo requeridas poderiam não ser sustentadas pelo baixo ganho energético (em ATP) do metabolismo anaeróbico, mesmo que estes microrganismos apresentassem uma elevada atividade hidrolítica (LYND L.R., *et al.*, 1989), além das dificuldades derivadas do estabelecimento de um processo anaeróbico em escala industrial. Esta abordagem, cujo objetivo era uma alta intensificação de processos, foi descartada parcialmente; não obstante identificou outro ponto susceptível de pesquisa e desenvolvimento, a

necessidade de aproveitar eficientemente as diferentes fontes de biomassa disponíveis, visando assim uma redução drástica no custo de processamento nas biorrefinarias.

Estabeleceu-se então o escopo válido até agora, os processos e os (bio)catalisadores envolvidos nas biorrefinarias devem ser desenvolvidos com base nas características da biomassa utilizada como matéria prima, além de tentar aproveitá-la eficientemente em cada etapa. Em consequência as biorrefinarias são classificadas pela biomassa usada, assim surgiram três tipos principais: biorrefinarias lignocelulósicas, de produtos de safra e “verdes” (KAMM B., KAMM M., 2004).

A biorrefinaria lignocelulósica é a mais importante dos três tipos, devido a que este tipo de biomassa é a de maior abundancia na natureza. O material lignocelulósico está composto de três precursores: lignina (um polímero de fenóis), hemicelulose (um polímero composto de pentoses, majoritariamente xilose) e celulose (polímero de glicose). Estes três precursores são convertidos segundo as equações:



As linhas de processamento destes três precursores são apresentadas na figura 2.9, no entanto existem ainda problemas na linha da lignina, já que esta linha resulta em quantidades consideráveis de hidrocarbonetos mono-aromaticos que poderiam dar um maior valor aos produtos, entretanto a separação é difícil e as aplicações limitadas.

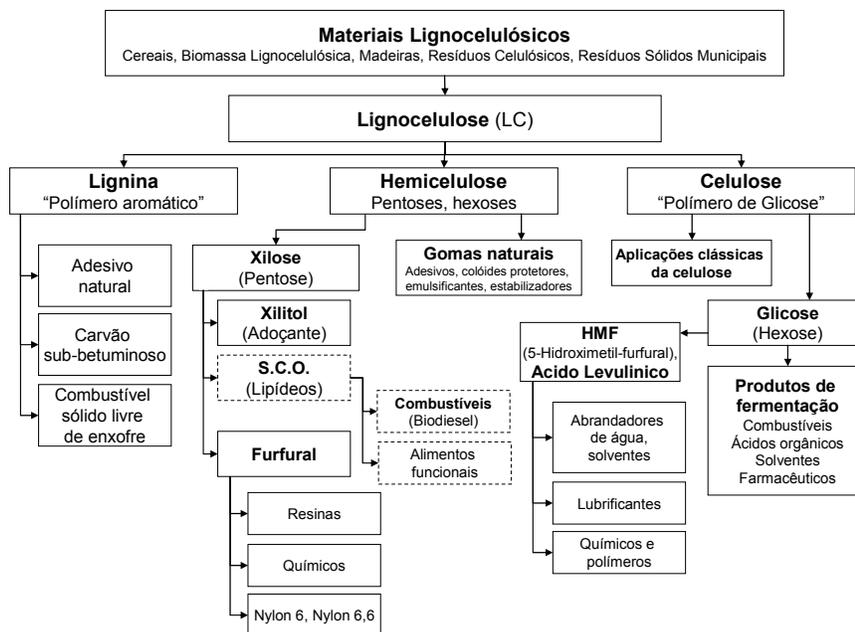


Figura 2.9: Biorrefinaria baseada em lignocelulósicos

Um produto com potencial interessante é o furfural, quem pode ser utilizado na produção de Nylon, voltando ao processo original estabelecido há muito tempo, mas em desuso atualmente.

A linha de glicose é a de maior potencial, sendo o etanol o principal produto, o etanol pode transformar-se via química em eteno, o que permitiria a sua alimentação nas refinarias atuais, conseguindo assim polietileno e polivinilacetato. Outros produtos derivados de glicose bem documentados são o hidrogênio, metano, propanol, acetona, butanol, butanodiol, ácido itacônico e succínico (ZEIKUS J.G., *et al.*, 1999).

O segundo sistema proposto é a biorrefinaria baseada em produtos de safra, principalmente cereais como milho, centeio e trigo, neste sistema é feita uma separação mecânica da biomassa produzindo duas linhas de processo, uma composta basicamente de bagaço e palha (materiais lignocelulosicos) e outra rica em grãos (amidos). O bagaço e palha serão processados na biorrefinaria LCF. Os amidos podem ser transformados fisicamente (extrusão) em bioplásticos e quimicamente em

ésteres de amido, além de biotecnologicamente em glicose, bloco básico para subseqüentes transformações.

Por ultimo a biorrefinaria “verde”, que visa o processamento da biomassa verde como a grama, alfafa, cereais imaturos e ervas em geral. Estes materiais possuem um alto teor de umidade pelo que esta biorrefinaria também pode denominar-se como biorrefinaria úmida. Depois de um processo de prensagem obtêm um caldo verde que pode ser destinado para fermentação, já que este caldo é rico em nutrientes podem-se obter produtos complexos como aminoácidos, proteínas, enzimas e outros mais simples como ácido lático e etanol. A torta de prensado utiliza-se como fonte de combustíveis sólidos, gás de síntese, biogás entre outros.

2.6.3 As pentoses dentro das biorrefinarias

Da biomassa total disponível no mundo, 75% está na forma de carboidrato, principalmente na forma de celulose, hemicelulose, amido e sacarose, 20% é lignina e só um 5% na forma de outros compostos como óleos, proteínas e outros (KAMM B., KAMM M., 2004). Então é pouco realista estabelecer a produção de biocombustível (biodiesel) sustentada só numa fonte tão escassa quanto os óleos vegetais que é destinado quase exclusivamente para uso alimentício. Isto se vê refletido nas diferentes propostas de Biorrefinarias encontradas na literatura (KAMM B., KAMM M., 2004; OHARA H., 2003; LYND L.R., *et al.*, 1999) onde o único biocombustível considerado é o etanol.

Dentro das recomendações feitas pelo governo dos Estados Unidos, sinala-se que esforços devem ser feitos para estabelecer ciclos fechados de produção de óleos. Os sistemas microbianos, além de conseguirem operar de maneira continua, são independentes de ciclos fotossintéticos (exceto os baseados em algas) e podem se encaixar perfeitamente no esquema de biorrefinaria (TYSON K.S., *et al.*, 2004), consumindo um carboidrato subutilizado como a xilose e fechando o ciclo interno do

carbono ao retornar a biomassa produzida como matéria prima em outros processos (Figura 2.9).

Visando que no futuro as biorrefinarias sejam estabelecidas como reais alternativas industriais, estas devem estar baseadas em economias de escala, assim a produção de co-produtos de pequeno volume de mercado (de base biotecnológica e que não podem ser produzidos nas refinarias convencionais) pode alavancar-se com outros de volume maior. Os biocombustíveis devem cobrir este papel. (LYND L.R., *et al.*, 1999).

Neste contexto, o biodiesel deve inserir-se no esquema da biorrefinaria devido a que sua produção baseada em óleos vegetais só conseguirá substituir 5-15% do diesel petroquímico e que seu custo de produção atual é devido principalmente à dita matéria prima (de 70-75% do custo final) (XUE F., *et al.*, 2006). É de esperar-se que uma substituição mais abrangente do diesel baseado no petróleo pelo biodiesel só seja viável quando na produção deste biocombustível sejam utilizadas fontes renováveis de matéria prima, em particular derivados de celulose e hemicelulose (KALSCHEUER R., *et al.*, 2006). Os SCO são a ponte nesta transição.

2.7 Referências bibliográficas

AKHTAR P., GRAY J.I., ASGHAR A., "Synthesis of lipids by certain yeast strains grown on whey permeate", *Journal of Food Lipids*, 5, 283-297, 1998.

ALVAREZ H.M., MAYER F., FABRITIUS D. STEINBUCHER A., Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* PD630. *Archives of Microbiology*, 165, 377-386, 1996.

ALVAREZ H.M., KALSCHUEER R., STEINBUCHER A., Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 218-223, 2000.

ANGERBAUER C., SIEBENHOFER M., MITTELBACH M., GUEBITZ G.M., "Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production", *Bioresource Technology*, 99, 3051-3056, 2008.

CHOI S.Y., DEWEY D.Y., "Production of microbial lipid: Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*", *Biotechnology and Bioengineering*, 24 (5), 1165-1172, 1982.

CZABANY T., ATHENSTAEDT K., DAUM G., "Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast" *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 299-309, 2007.

DAI C-C., TAO J., XIE F., DAI Y-J., ZHAO M., "Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity", *African Journal of Biotechnology*, 6 (18), 2130-2134, 2007.

GANGAR A., RAYCHAUDHURI S., RAJASEKHARAN R., "Alteration in the cytosolic triacylglycerol biosynthetic machinery leads to decreased cell growth and triacylglycerol synthesis in oleaginous yeast", *Biochemistry Journal*, 365, 577-589, 2002.

GILL C.O., HALL M.J., RATLEDGE C., "Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture", *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (2), 231-239, 1977.

GRANGER L-M., PERIOT P., GOMA G., PAREILLEUX A., "Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: Prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method", *Biotechnology and Bioengineering*, 42 (10), 1151-1156, 1983.

HASSAN M., BLANC P.J., GRANGER L.-M., PAREILLEUX A., GOMA G., "Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in bath and fed-batch culture", *Process Biochemistry*, 31 (4), 355-361, 1996.

HEREDIA L., RATLEDGE C., "Simultaneous utilization of glucose and xylose by *Candida curvata* D in continuous culture", *Biotechnology Letters*, 10 (1), 25-30, 1988.

JEFFRIES T.W., 'Engineering yeasts for xylose metabolism", *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 320-326, 2006.

KALSCHEUER R., STOLTING T., STEINBUCHER A., "Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production", *Microbiology*, 152, 2529-2536, 2006

KAMM B., KAMM M., "Principles of biorefineries", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 137-145, 2004.

LEWIS T., NICHOLS P.D., McMEEKIN T.A., "Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs", *Journal of Microbiological Methods*, 43, 107-116, 2000.

LIU B., ZHAO Z.K., "Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 268, 2575-2580, 2007

LYND L.R., GRETHLEIN H.G., WOLKIN R.H., "Fermentation of cellulosic substrates in batch and continuous culture by *Clostridium thermocellum*", *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 3131-3139, 1989.

LYND L.R., WYMAN C.E., GERNGROSS T.U., "Biocommodity engineering", *Biotechnology Progress*, 15 (5), 777-793, 1999.

MEESTERS P.A., WAL H., "Cultivation of the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* in a new reactor with improved mixing and mass transfer characteristics (Surer®)", *Biotechnology Techniques*, 10 (4), 277-282, 1996

MORETON R.S., "Single Cell Oil", Longman, 1988

NELSON D.L., COX M.M., "Lehninger Principles of Biochemistry", 3a edição, Worth Publishers, 2004

OHARA H., "Biorefinery", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 474-477, 2003.

PAPANIKOLAU S., AGGELIS G., "Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture", *Bioresource Technology*, 82, 43-49, 2002.

PENG X., CHEN H., "Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran", *Bioresource Technology*, DOI 10.1016/j.biortech.2007.08.015, 2007.

PRAPULLA S.G., JACOB Z., CHAND N., RAJALAKSHMI D., KARANTH N.G., "Maximization of lipid production by *Rhodotorula gracilis* CFR-1 using response surface methodology", *Biotechnology and Bioengineering*, 40 (8), 965-970, 1992.

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

RATLEDGE C., "Single cell oils - have they a biotechnological future?", *Trends in Biotechnology*, 11 (7), 278-284, 1993.

RATLEDGE C., "Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production", *Biochimie*, 86, 807-815, 2004.

RATLEDGE C., COHEN Z., *Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils?*, *Lipid Technology*, 20(7), 155-160, 2008

SAXENA V., SHARMA C.D., BHAGAT S.D., SAINI V.S., ADHIKARI D.K., "Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*", *Journal of American Oil Chemists Society*, 75 (4), 501-505, 1998.

TEHLIVETS O., SCHEURINGER K., KOHLWEIN S.D., "Fatty acid synthesis and elongation in yeast", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(3), 225-270, 2007.

TYSON K.S., BOZELL J., WALLACE R., PETERSEN E., MOENS L., "Biomass oil analysis: Research needs and recommendations", National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2004.

U.S. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.NRC), Committee on Biobased Industrial Products, Board on Biology, Commission on Life Sciences, "Biobased industrial products: priorities for research and commercialization, 2000.

VARMA A., PALSSON B.O., "Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use", *Bio/Technology*, 12, 994-998, 1994

XIONG W., LI X., XIANG J., WU Q., "High density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for micro-biodiesel production" *Applied Microbiology and biotechnology*, 78, 29-36, 2008.

XUE F., ZHANG X., LUO H., TAN T., "A new method for preparing raw material for biodiesel production", *Process Biochemistry*, 41, 1699-1702, 2006.

YKEMA A., BAKELS R.H., VERWOERT I.I., SMIT H., "Growth yield, maintenance requirements, and lipid formation in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*", *Biotechnology and Bioengineering*, 34 (10), 1268-1276, 1989.

YONG-HONG L., ZHAO Z.K., BAI F., "Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*", *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(4), 650-656, 2006.

YONG-HONG L., ZHAO Z.K., BAI F., “High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture”, *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 312-317, 2007.

YOON, S.H., RHIM, J.W., CHOI, S.Y., RYU, D.D.Y., RHEE, J.S., “Effect of carbon and nitrogen sources on lipid production of *Rhodotorula gracilis*”, *Journal of Fermentation Technology*, 60, 243-246, 1982.

ZEIKUS J.G., JAIN M.K., ELANKOVAN P., “Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 545-552, 1999.

ZHAO X., KONG X., HUA Y., FENG B., ZHAO Z.K., “Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, DOI 10.1002/ejlt.20070224, 2008.

ASPECTOS GERAIS SOBRE AS LEVEDURAS OLEAGINOSAS E O PROCESSO DE ACÚMULO DE LIPÍDEOS

3.1 Resumo

Neste capítulo uma série de experimentos desenvolvidos visando estabelecer o comportamento das leveduras oleaginosas em meios utilizando xilose como fonte de carbono é descrita. Aspectos básicos como o preparo do inóculo e de meios de cultura, tempo total de fermentação e respostas a diferentes fontes de nitrogênio foram determinados. Experimentos sob condições limitantes de nitrogênio foram realizados para promover a indução do processo de acúmulo de lipídeos na fase final do crescimento. Os resultados indicam que as espécies de leveduras estudadas são capazes de crescer satisfatoriamente em xilose atingindo níveis de acúmulo próximos aos descritos com hexoses. A relação C/N é o parâmetro relevante para o acúmulo de lipídeos, estando relacionados diretamente.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Microrganismos

Neste estudo foram utilizados os microrganismos *Rhodotorula glutinis* CCT 0783, *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 e *Lipomyces starkeyi* DSM 70296. As linhagens foram mantidas usando três diferentes métodos. Manutenção em ágar inclinado YPG (3.0 g/L de extrato de levedura, 5.0 g/L de peptona, 10 g/L de glicose e 20g/L de ágar, com pH ajustado a 5.5) a 4°C, criovial congelado a -80°C em meio YPG líquido com 10 ou 20% (v/v) de glicerol e suspensão em água destilada a 4°C.

3.2.2 Meios de cultivo e preparo do inóculo

Com o objetivo de produzir o inóculo necessário para as fermentações, foram realizados dois pré-cultivos em meios diferentes. Duas alças de massa celular a partir de ágar inclinado fresco de 48 horas ou 4 mL de cultura armazenada em criovial ou em suspensão em água, foram transferidas asépticamente ao meio de pré-inóculo (YPG líquido) e incubadas até atingir uma absorbância total na faixa de 4.0-6.0 (correspondente a leitura no espectrofotômetro de 0.4 - 0.6 numa diluição de 10X). A duração deste cultivo é geralmente de 24 horas.

O cultivo de inóculo foi preparado em um meio similar ao utilizado nas fermentações contendo 20 g/L de xilose, 1.0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.5 g/L de KH_2PO_4 , 1.0 g/L de Na_2HPO_4 , 1.5 g/L de $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L de CaCl_2 e 2.0 g/L de extrato de levedura. O critério de finalização do cultivo foi igual ao usado no cultivo de pré-inóculo, atingindo a turbidez requerida em um período de 24 - 36 h.

O acúmulo lipídeos foi estudado em meios limitados em nitrogênio, contendo 30 g/L de xilose ou glicose, 3.5 g/L de KH_2PO_4 , 1.0 g/L de Na_2HPO_4 , 0.4 g/L de $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g/L de CaCl_2 , 0.008 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ e 0.005 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Como fontes de nitrogênio foram usadas extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou uréia. A concentração das fontes de nitrogênio foram ajustadas segundo a relação C/N desejada. No cálculo da relação C/N (g/g) foi incluso o aporte do nitrogênio orgânico proveniente do extrato de levedura, conteúdo não superior a 10%.

Com o objetivo de comparar a produção de lipídeos em diferentes meios foi testado um meio mínimo com alta concentração de xilose, a composição deste meio foi 70 g/L de xilose, 0.5 g/L de extrato de levedura, 2.0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 g/L de KH_2PO_4 e 0.5 g/L de $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A relação C/N deste meio é próxima a 60 g/g.

Todos os reagentes utilizados no preparo dos meios foram grau P.A. e de origem nacional. O pH dos meios foi ajustado a 5.5 com HCl 1M. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos. No preparo dos meios

contendo xilose como fonte de carbono foi feita uma solução concentrada da pentose (100 g/L), esterilizada em separado para evitar degradação e escurecimento e adicionada assepticamente ao meio na proporção requerida.

3.2.3 Condições de fermentação

Os cultivos em meio líquido foram realizados em frascos agitados tipo Erlenmeyer de 250 mL usando 1/5 da capacidade total. Os frascos foram incubados em mesa agitadora orbital a 28°C e 150 rpm de agitação. Os meios de inóculo e de fermentação foram inoculados com 10%(v/v) dos meios do pré-inóculo e inóculo respectivamente. Os cultivos foram feitos em duplicata e transcorreram durante um período aproximado de 120 h. Amostragem foi realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar em intervalos de tempo determinados.

3.2.4 Metodologia analítica

3.2.4.1 Biomassa seca

A quantificação da biomassa foi feita indiretamente, mediante leitura espectrofotométrica em 600 nm na faixa de 0.1 – 0.6 unidades de absorbância, usando água destilada como referência de calibração.

Foi construída uma curva padrão para cada microrganismo usando a biomassa obtida no cultivo de inóculo, com três dias de idade. Entre 8 e 10 amostras foram retiradas deste cultivo, diferentes diluições destas amostras foram feitas e para cada uma delas foi determinada a densidade ótica e massa seca. A determinação da massa seca foi realizada mediante filtração em membrana Millipore de 0.22 µm e posterior secagem em estufa a 60°C durante 24 h.

3.2.4.2 Lipídeos totais

A massa de lipídeos totais para cada fermentação foi quantificada gravimetricamente utilizando o método de extração de Bligh & Dyer (BLIGH E.G, DYER W.J., 1959) modificado por Manirakiza e colaboradores (MANIRAKIZA P., *et al*, 2001). O conteúdo total de um frasco de fermentação foi centrifugado a 8000 rpm, 4°C por 15 minutos, o precipitado foi re-suspendido em água destilada e lavado duas vezes. A biomassa lavada obtida na última centrifugação foi congelada a -80°C por 24 horas e secada por liofilização a uma temperatura média de -34°C, pressão de vácuo de 80 µm de Hg durante 24 horas. Para realizar a extração, entre 300 e 500 mg de biomassa triturada foram colocadas junto com 6 mL de uma solução metanol:clorofórmio (2:1 v/v), a suspensão foi agitada em vortex por 2 minutos. Seguidamente foram adicionados 2 mL de clorofórmio e agitou-se por 2 minutos. Para gerar um sistema de duas fases líquidas, 3.6 mL de água foram adicionados e o sistema foi agitado novamente por 2 minutos. As fases foram separadas por centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm. A fase inferior foi transferida a um balão de 25 mL usando seringa ou pipeta Pasteur. Uma segunda extração foi realizada utilizando 4 mL de uma solução 10% (v/v) de metanol em clorofórmio em vortex por 2 minutos. Após centrifugação, a fase de clorofórmio foi adicionada ao primeiro extrato. O clorofórmio foi evaporado em evaporador rotatório e o resíduo seco em estufa a 60°C por um dia. O lipídeo final foi quantificado gravimetricamente.

3.2.4.3 Determinação de xilose

A concentração da xilose foi determinada usando um sistema de cromatografia líquida HPLC Waters com detector de índice de refração e coluna Shodex KS-801. A fase móvel usada foi água deionizada a uma vazão de 1.0 mL/min e o tamanho da injeção de 10 µL. As temperaturas da coluna e do detector foram 80 e 40°C respectivamente.

3.2.5 Modelos matemáticos e cálculo de parâmetros

O modelo logístico foi utilizado para descrever a cinética de crescimento dos microrganismos, este modelo diferencial assume um mecanismo autocatalítico para a geração de biomassa (Eq. 4.1).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(\frac{K - X}{K} \right) \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde X é a concentração de biomassa, μ_{\max} a velocidade específica máxima de crescimento e K a biomassa máxima obtida. O modelo integrado entre o tempo inicial $t=0$ h e o tempo final t produz a expressão explícita (Eq. 4.2).

$$X = \frac{K}{1 + \exp(c - \mu_{\max} t)}, \text{ onde } c = \ln \left(\frac{K}{X_0} - 1 \right) \quad (\text{Eq. 4.2})$$

O tratamento matemático derivado da geometria da função permite definir mais dois parâmetros cinéticos característicos, a velocidade máxima de crescimento v_{\max} e o tempo de duração da fase lag λ , estes são robustos, pouco sensíveis ao erro experimental e úteis em propósitos de comparação (VÁZQUEZ J.A., MURADO M.A., 2008).

Calculando o coeficiente angular da reta tangente à função logística no ponto de inflexão pode-se obter a expressão para o cálculo de v_{\max} (Eq. 4.3).

$$v_{\max} = \frac{K\mu_{\max}}{4} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

O tempo da fase lag λ é obtido calculando o corte desta reta com o eixo das abscissas, cuja expressão é apresentada na equação 4.4.

$$\lambda = \frac{c - 2}{\mu_{\max}} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

3.2.6 Métodos numéricos

O ajuste do modelo logístico para a obtenção dos parâmetros cinéticos foi realizada por minimização da soma das diferenças quadráticas entre os valores

experimentais e os preditos pelo modelo, usando o modelo de regressão não-linear de gradiente reduzido generalizado “GRG” disponibilizado pela função Solver da planilha de cálculo Excel (BROWN A.M., 2001). O ajuste gráfico das curvas obtidas pelos modelos foi realizado usando o programa OriginPro 7.5G.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Métodos de manutenção da cultura

Foram testados dois diferentes métodos de preservação para a linhagem *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, congelação usando glicerol como agente protetor em duas concentrações e preservação em água destilada sob refrigeração. Para avaliar o impacto do método no processo global decidiu-se analisar o comportamento do pré-inoculo, isto porque o desempenho dos cultivos subseqüentes depende fortemente do método de reativação da cultura celular..

Cultivos em meio YPG foram feitos a partir do material celular original recebido do banco de microrganismos, uma vez atingida a fase exponencial do cultivo a massa celular foi preservada das três formas descritas. Após um mês de conservação foram realizados cultivos no mesmo meio (YPG) obtendo-se as cinéticas de crescimento apresentadas na figura 3.1.

O crescimento desta linhagem foi acompanhado por aproximadamente 100 horas. As cinéticas obtidas usando a cultura preservada nas duas concentrações de glicerol se mostraram muito próximas e afastadas do cultivo das células preservadas em água destilada. A tabela 3.1 apresenta os parâmetros cinéticos calculados para cada cultivo, indicando que a concentração de glicerol não reflete em uma diferença no crescimento. A velocidade específica de crescimento (μ_{max}) do microrganismo usando a suspensão de células em água destilada foi aproximadamente 30% inferior à obtida com as células preservadas em glicerol. A concentração de biomassa final atingida (K) também foi reduzida aproximadamente na mesma proporção.

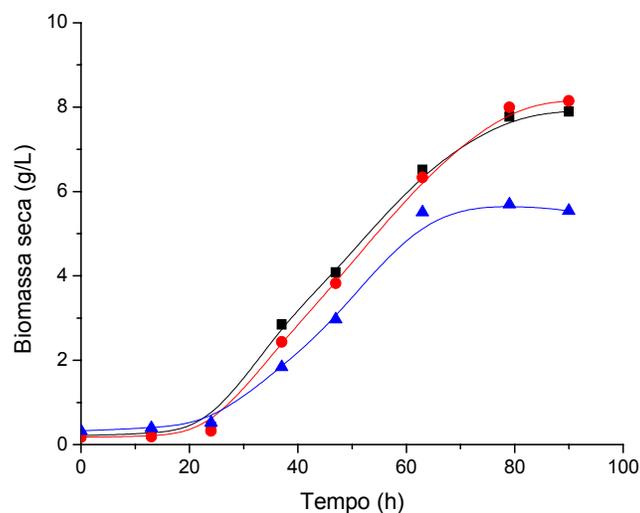


Figura 3.1: Crescimento de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 segundo o método de manutenção. ■ Glicerol 10%, ● Glicerol 20%, ▲ Água destilada.

A maior diferença apresentada aconteceu na velocidade máxima de crescimento (v_{max}), em torno de 40%, isto é refletido diretamente numa produção menor de biomassa já que este parâmetro representa a produtividade do crescimento. O tempo de duração da fase *lag* (λ) foi o único parâmetro favorável ao utilizar as células preservadas em água, no entanto este parâmetro por si próprio não justificaria a adoção deste método de manutenção.

Tabela 3.1: Principais parâmetros cinéticos dos cultivos em meio pré-inóculo.

Modo manutenção	μ_{max} (h^{-1})	v_{max} ($g/L\ h$)	K (g/L)	λ (h)
Glicerol 10%	0.0765	0.160	8.35	21.1
Glicerol 20%	0.0767	0.168	8.67	24.4
Susp. água destil.	0.0553	0.093	5.68	17.4

A adequada preservação das linhagens de microrganismos é de grande importância para garantir a reprodutibilidade dos experimentos. Uma escolha correta do método de manutenção garante longa vida em estoque da linhagem, pureza nos cultivos e principalmente a conservação da atividade metabólica, garantindo assim

que a linhagem reativada tenha um desempenho igual ao da cultura original (STACEY G.N., DAY J.G., 2007). Também foi observado que os pré-inóculos derivados do método usando 20% glicerol apresentaram queda no rendimento após armazenamento por período superior a um mês, possivelmente por um efeito tóxico do glicerol nesta concentração, fato não observado em 10% de glicerol (dados não apresentados).

Em geral, concentrações de 5 a 20% de glicerol têm sido utilizadas para preservar leveduras (BOND C.J., 1995), não obstante células de *Saccharomyces pombe* preservadas em 20% v/v de glicerol apresentaram baixas taxas de sobrevivência e de eficiência de transformação em processos de engenharia genética, indicando que cada espécie possui uma concentração máxima na qual o agente crioprotector pode ser tóxico (SUGA M., *et al.*, 2000). O método de preservação em 10% de glicerol foi escolhido para o armazenamento das linhagens utilizadas.

3.3.2 Produção de lipídeos microbianos em meios limitados por nitrogênio

Rhodotorula glutinis CCT 0783 e *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 foram cultivadas em três diferentes relações C/N usando sulfato de amônia e extrato de levedura como fontes de nitrogênio. Os resultados indicam que um aumento nesta relação aumenta a produção de lipídeos em ambas as espécies (Figura 3.2), confirmando que o mecanismo principal de indução da síntese de lipídeos nestas leveduras é pela limitação do nitrogênio disponível. (RATLEDGE C., 1991)

Não existe consenso sobre o nível mínimo de limitação a ser imposto para que o metabolismo microbiano dê preferência à síntese de lipídeos. Gill e colaboradores estabeleceram que uma relação C/N de 30 usando *Candida sp.* 107 (hoje reclassificada como NCYC 911) limitava efetivamente o microrganismo ativando assim a síntese de lipídeos. (GILL C.O., *et al.*, 1977). *Rhodotorula gracilis* NRRL Y-1091 cultivada em glicose usando uma concentração de 0.1% de sulfato de amônia e 0.05% de extrato de levedura acumulou eficientemente lipídeos atingindo níveis de acúmulo de 49.8%

(CHOI S.Y., *et al.*, 1982); estas concentrações junto com a da fonte de carbono permitem estabelecer que a relação C/N utilizada por estes autores também é próxima de 30.

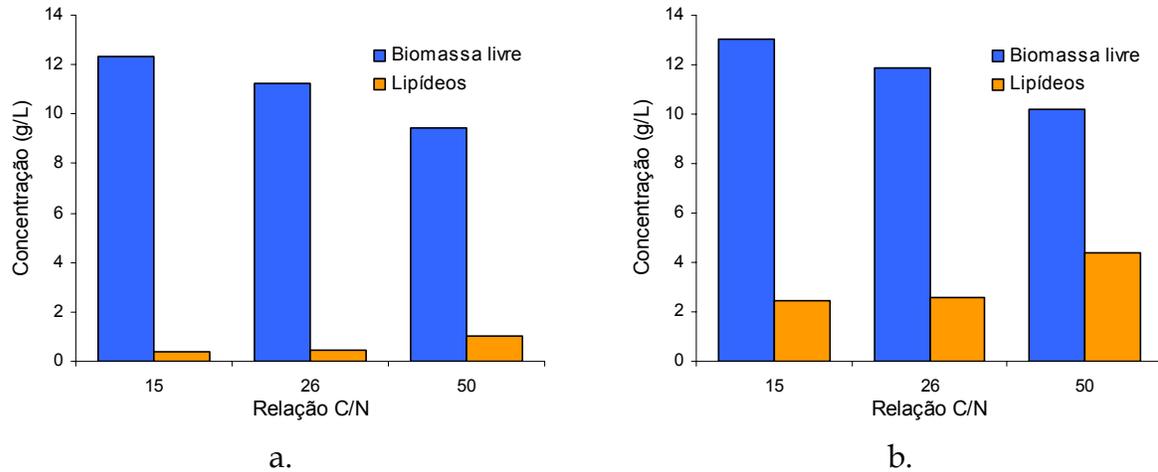


Figura 3.2: Produção de biomassa livre e lipídeos segundo a relação C/N utilizada para *Rhodotorula glutinis* CCT 0783 (a.) e *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 (b.)

Os resultados apresentados por diferentes autores estão em concordância com os apresentados (figura 3.2), em que para relações C/N entre 15 e 26 a produção de lipídeos é aproximadamente a mesma, com valores médios de 3.5% para *Rhodotorula* e 17% para *Lipomyces*. Ao ultrapassar o valor de C/N=26, o acúmulo de lipídeos intracelular aumenta significativamente até 10 e 30% respectivamente. É importante destacar que com o aumento da limitação de nitrogênio a velocidade específica de crescimento e a biomassa final obtida são comprometidas. Assim, a biomassa total obtida para a maior relação foi a menor dentre as relações testadas para os dois microrganismos.

Para relação carbono - nitrogênio de 50 g/g foram obtidas cinéticas detalhadas de crescimento, consumo de substrato e pH (Figura 3.3). O crescimento apresentou-se sigmoidal com as fases lag, exponencial e estacionária bem definidas (principalmente no caso de *Lipomyces*) e foi modelado adequadamente pela equação logística ($R^2 > 0.98$). Foram obtidas velocidades máximas específicas de 0.0840 h^{-1} para *Lipomyces* e de 0.0714 h^{-1} para *Rhodotorula*, inferiores às descritas para outras espécies

oleaginosas ($0.1 - 0.2 \text{ h}^{-1}$) cultivadas em glicose (SAXENA V., *et al.*, 1998). As duas leveduras consumiram toda a xilose em pouco mais de 90 horas, o valor do pH teve uma queda durante a fermentação, partindo de pH 4.5 para pH inferior a 3.0, devido ao consumo da fonte de nitrogênio. Sendo esta fonte sulfato de amônio, o consumo de amônio produz uma queda na acidez devido à presença do íon sulfato. Este efeito é reportado freqüentemente na literatura (GANUZA E., *et al.*, 2008, UZUKA Y., *et al.*, 1974).

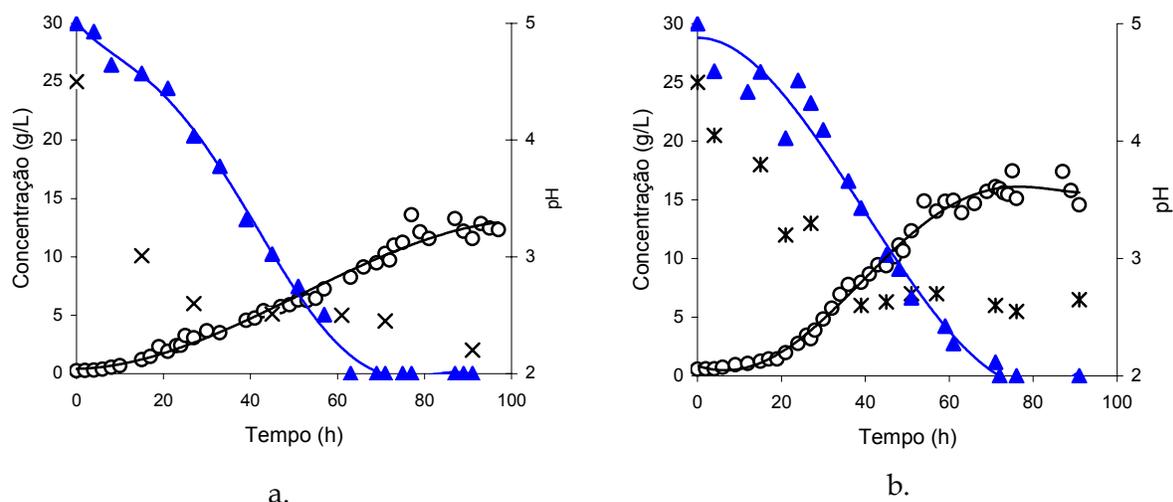


Figura 3.3: Cinéticas de crescimento dos microrganismos *Rhodotorula glutinis* CCT 0783 (a) e *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 (b). ○ Biomassa total, ▲ Xilose, * pH.

3.3.3 Avaliação do crescimento e o acúmulo de lipídeos em diferentes meios de cultivo e influencia da fonte de nitrogênio.

Utilizando a relação C/N de 50 g/g para induzir o acúmulo de lipídeos, foram realizados cultivos com o objetivo de comparar o comportamento de *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 com outra fonte de nitrogênio (uréia) e outra fonte de carbono (glicose). Adicionalmente foi testado um meio diferente sem micronutrientes e com uma concentração maior de xilose (meio mínimo), (figura 3.4).

Tendo-se como referência o resultado do cultivo usando xilose e extrato de levedura - sulfato de amônio, observou-se que os parâmetros cinéticos deste experimento tiveram valores intermediários em comparação com os outros dois testes

(tabela 3.2). Como esperado, o crescimento em glicose mostrou-se mais eficiente, a velocidade específica máxima de crescimento obtida (0.118 h^{-1}) é comparável aos valores já reportados (SUUTARI T., *et al.*, 1993). Não houve diferença no acúmulo de lipídeos entre o uso de glicose ou xilose como fonte de carbono. *Lipomyces starkeyi* mostrou-se capaz de assimilar uréia como fonte de nitrogênio, o crescimento obtido foi muito próximo ao experimento referência, no entanto com valores inferiores em praticamente todos os parâmetros avaliados.

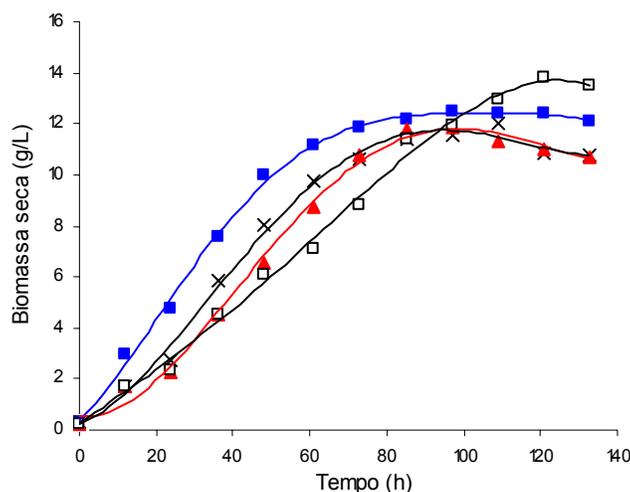


Figura 3.4: Crescimento de *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 em diferentes meios.

- Glicose, Extrato levedura - Sulfato amônio, × Xilose, Extrato levedura - Sulfato amônio,
- ▲ Xilose, Uréia, □ Xilose, Extrato levedura - Sulfato amônio (meio mínimo)

A produção de lipídeos obtida está dentro dos níveis esperados para leveduras oleaginosas. ANGERBAUER C. e colaboradores (2008) utilizaram *Lipomyces starkeyi* DSM 70295 para produzir lipídeos a partir de uma mistura de lodo ativado com meio sintético, o acúmulo obtido foi de 40% usando uma relação C/N de 60 g/g. SUUTARI M. e colaboradores (1996), analisando diferentes estratégias baseadas no efeito da temperatura no acúmulo obteve conteúdos de lipídeos entre 7 e 14%. Em geral microrganismos oleaginosos são capazes de acumular até 70% de lipídeos em massa seca (RATLEDGE C., 2004).

O experimento utilizando o meio mínimo apresentou as menores velocidades de crescimento, indicando a possibilidade que a concentração de xilose utilizada teve um efeito inibitório no crescimento. No entanto, o conteúdo de lipídeos foi superior, podendo ser atribuído à maior relação C/N utilizada.

Tabela 3.2: Resultados cinéticos do crescimento e do acúmulo de lipídeos usando *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557 em diferentes meios de cultivo.

Fonte carbono	Fonte nitrogênio	Relação C/N (g/g)	μ_{\max} (h ⁻¹)	v_{\max} (g/L h)	K (g/L)	Conversão (%)	Conteúdo lipídeos (%)
Glicose ^a	Ext. Leved. (NH ₄) ₂ SO ₄	50	0.118	0.359	12.1	100.0	26.3±0.9
Xilose ^a	Ext. Leved. (NH ₄) ₂ SO ₄	50	0.0803	0.280	11.2	99.7	27.1±1.4
Xilose ^a	Uréia	50	0.0731	0.247	11.4	99.3	23.6±0.6
Xilose ^b	Ext. Leved. (NH ₄) ₂ SO ₄	60	0.0695	0.228	13.1	75.1	28.1±1.7

^a Meio de produção normal

^b Meio mínimo

3.3.4 Influência do extrato de levedura e da relação C/N no rendimento de lipídeos.

Os resultados obtidos anteriormente indicaram que um aumento na relação C/N influencia positivamente a produção de lipídeos e negativamente a velocidade de crescimento. Além disto, foi determinado que a utilização de sulfato de amônio e extrato de levedura como fontes inorgânica e orgânica de nitrogênio é adequada para o crescimento de *Lipomyces starkeyi*. Não obstante, visando a economia do processo é desejada a exclusão ou minimização do extrato de levedura no meio de cultura.

A partir da análise anterior, foi evidente a necessidade de avaliar o impacto destas variáveis no processo. Desta forma uma série de ensaios foi realizada, seguindo a técnica de planejamento fatorial com o objetivo de estabelecer o efeito dos

fatores relação C/N e utilização (+) ou ausência total (-) do extrato de levedura sob o rendimento de lipídeos (Tabela 3.3.)

Tabela 3.3: Avaliação dos parâmetros cinéticos do planejamento fatorial 2²

Relação C/N (g/g)	Extrato levedura	μ_{\max} (h ⁻¹)	K (g/L)	Conteúdo lipídeos (%)	$Y_{L/S}$ (g/g)	Produtividade lipídeos (g/L h)
50	+	0.0705	14.07	19.1±0.5	0.0958±0.0027	0.0277±0.00077
50	-	0.0644	11.55	16.8±0.2	0.0678±0.0010	0.0200±0.00017
100	+	0.0705	9.72	26.5±0.1	0.0927±0.0035	0.0310±0.00116
100	-	0.0623	8.76	25.5±0.6	0.0883±0.0020	0.0269±0.00060

A figura 3.5 apresenta os perfis de concentração de biomassa dos cultivos realizados. Uma diminuição nos níveis de biomassa finais atingidos quando foi utilizada uma relação C/N de 100 g/g foi obtida. A ausência do extrato de levedura teve um efeito negativo na concentração de biomassa final, com quedas aproximadas de 20% nas duas relações C/N testadas. A fermentação decorreu mais rapidamente na relação C/N superior, estabilizando às 83 horas, aproximadamente 10 horas a menos que no nível inferior deste fator.

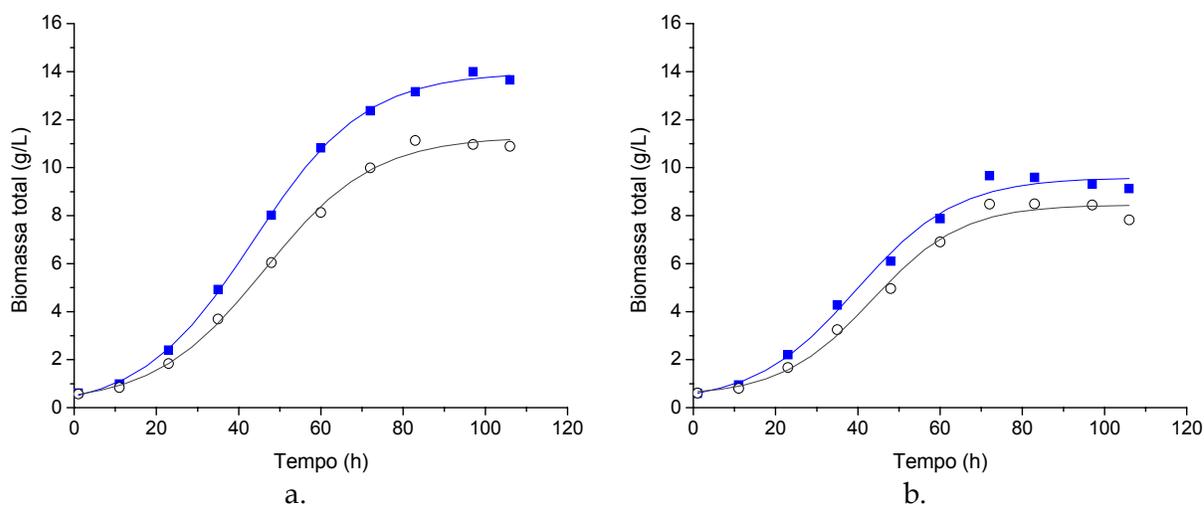


Figura 3.5: Influencia do extrato de levedura no crescimento de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 a duas relações C/N.

a. C/N=50 g/g, b. C/N=100 g/g.

■ Com extrato de levedura, ○ Sem extrato de levedura.

Foram calculados diversos parâmetros cinéticos para cada fermentação, no entanto escolheu-se como variável de resposta a produtividade de lipídeos para realizar o cálculo dos efeitos (Tabela 3.4). Os dois fatores, relação C/N e a presença ou ausência total do extrato de levedura, tiveram um efeito positivo na produtividade, sendo maior para o efeito relacionado com o uso do extrato de levedura. A interação entre eles teve um efeito negativo e muito menor que os dois fatores por separado.

Tabela 3.4: Efeito de cada fator na produtividade de lipídeos

Fator*	Efeito	Erro padrão
Relação C/N	0.005123	0.000521
Extrato de levedura	0.005953	0.000521
Interação entre fatores	-0.001788	0.000521

*Valor $p < 0.05$ para todos os fatores

Ykema e colaboradores encontraram um valor ótimo para a relação C/N aonde o rendimento de lipídeos e o crescimento são maximizados (YKEMA A., *et al.*, 1986). O planejamento experimental proposto não foi realizado com o intuito de estabelecer um valor ótimo para os fatores estudados, mas possibilitou a análise do efeito de cada fator, indicando que uma relação C/N elevada deve ser utilizada para obter elevadas produtividades. Entretanto uma relação muito elevada resultaria possivelmente em um efeito negativo na velocidade de crescimento, e isto pode acarretar uma perda de produtividade. A literatura descreve relações C/N tão elevadas como 150 g/g para *Lipomyces starkeyi* atingindo níveis de acúmulo de 68% sem perda aparente na produtividade de lipídeos (ANGERBAUER C., 2008)

3.4 Conclusões

Estabeleceu-se a importância do método de manutenção no cultivo de *Lipomyces starkeyi* e a definição do método a ser utilizado. A manutenção da cultura

deve ser feita a -70°C utilizando 10% de glicerol como agente crioprotector, assim são mantidas eficientemente as características da linhagem.

A presença do extrato de levedura no meio teve um efeito positivo na produtividade do processo de produção de lipídeos, isto devido possivelmente ao efeito deste nutriente complexo na velocidade de crescimento, permitindo atingir valores elevados de biomassa final em curtos tempos.

Os microrganismos estudados apresentam uma cinética de crescimento que pode ser explicada pelo modelo logístico que assume um mecanismo autocatalítico para a geração da biomassa.

A relação C/N utilizada no cultivo de *Lipomyces starkeyi* afeta significativamente o processo de acúmulo de lipídeos, uma relação de 100 g/g aparentemente é a mais adequada considerando-se um processo em batelada simples.

3.5 Referências bibliográficas

ANGERBAUER C., SIEBENHOFER M., MITTELBACH M., GUEBITZ G.M., Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production, *Bioresource Technology*, 99, 3051-3056, 2008.

BLIGH E.G., DYER W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917, 1959.

BOND C.J., Cryopreservation of yeast cultures, *Methods in molecular biology*, 38, 39-47, 1995.

BROWN A.M., A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet, *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 65, 191-200, 2001.

CHOI S.Y., DEWEY D.Y., RHEE J.S., Production of microbial lipid: effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*, *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1165-1172, 1982.

GANUZA E., ANDERSON A.J., RATLEDGE C., High-cell-density cultivation of *Schizochytrium sp.* in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system, *Biotechnology letters*, DOI 10.1007/s10529-008-9723-4, 2008.

GILL C.O., HALL M.J., RATLEDGE C., Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida 107*) growing on glucose in single-stage continuous culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (2), 1977.

MANIRAKIZA P., COVACI A., SCHEPENS P., Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 93-100, 2001.

STACEY G.N., DAY J.G., Long-term ex situ conservation of Biological Resources and the role of Biological Resource Centers, *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Humana Press, 2ª edição, 2007.

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

RATLEDGE C., Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production, *Biochimie*, 86, 807-815, 2004.

SAXENA V., SHARMA C.D., BHAGAT S.D., SAINI V.S., ADHIKARI D.K., Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*, *Journal of American Oil Chemists Society*, 75 (4), 1998.

SUGA M., ISOBE M., HATAKEYAMA T., Cryopreservation of competent intact yeast cells for efficient eletroporation, *Yeast*, 16, 889-896, 2000.

SUUTARI M., RINTAMAKI A., LAAKSO S., The effect of temperature on lipid classes and their fatty acid profiles in *Lipomyces starkeyi*, *Journal of American Oil Chemists Society*, 73 (8), 1071-1073, 1996.

SUUTARI T., PRIHA P., LAAKSO S., Temperature shifts in regulation of lipids accumulated by *Lipomyces starkeyi*, *Journal of American Oil Chemists Society*, 70 (9), 891-894, 1993.

UZUKA Y., NAGANUMA T., TANAKA K., ODAGIRI Y., Effect of culture pH on the growth and biotin requirement in a strain of *Lipomyces starkeyi*, Journal of General and Applied Microbiology, 20, 197-206, 1974.

VÁZQUEZ J.A., MURADO M.A., Mathematical tools for objective comparison of microbial cultures, application to evaluation of 15 peptones for lactic acid bacteria productions, Biochemical Engineering Journal, 39, 276-287, 2008.

YKEMA A., VERBREE E.C., VAN VERSEVELD H.W., SMIT H., Mathematical modelling of lipid production by oleaginous yeasts in continuous cultures, Antonie van Leeuwenhoek, 52, 491-506, 1986.

COMPARAÇÃO CINÉTICA E ENERGÉTICA DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS USANDO XILOSE COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO

4.1 Resumo

Este capítulo descreve a seleção de leveduras oleaginosas provenientes de diversos bancos de microrganismos. Inicialmente foi feita uma abordagem clássica mediante a determinação de diferentes parâmetros cinéticos visando selecionar os microrganismos que consumissem eficientemente xilose e produzissem lipídeos. A seguir, foram analisados os rendimentos energéticos de cada microrganismo. Estas duas análises, conjuntamente com o cálculo de produtividade em lipídeos, permitiram identificar um *cluster* composto por três microrganismos como os mais promissores para a produção de lipídeos a partir de xilose. A levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 foi escolhida dentre este grupo por apresentar o maior rendimento energético ($0.7 J_x/J_s$), alto conteúdo de lipídeos (24.3%) e elevada produtividade (0.0359 g/L h).

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Microrganismos

Foram utilizados 20 microrganismos dos gêneros *Rhodotorula sp.*, *Rhodospiridium sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Lipomyces sp.*, *Candida sp.* e *Yarrowia sp.*, provenientes de diversos bancos de cultura como N.R.R.L. (EUA), A.T.C.C. (EUA), Fundação André Tosello (CCT, Brasil), Fundação Fiocruz (INCQS, Brasil) e DSMz

(Alemanha). A escolha das linhagens envolvidas foi baseada na literatura, sendo todas consideradas como leveduras oleaginosas [RATLEDGE C., 1991]. As linhagens foram preservadas em agar inclinado (Meios sólidos YPD e PDA, dependendo da espécie) e estocadas a 4°C até seu uso, repiques feitos a cada dois meses mantiveram os microrganismos ativos.

4.2.2 Meios e condições de cultivo

4.2.2.1 Fases de ativação e propagação

Antes dos ensaios de seleção, todos os microrganismos foram ativados mediante dois cultivos consecutivos em agar inclinado PDA a 28°C, o primeiro cultivo teve uma duração de 48 h e o segundo de 24 h, isto para garantir que cada cultura estivesse na fase exponencial de crescimento antes da sua inoculação em meio líquido. Após cultivo em meio sólido foi feita uma primeira propagação da cepa em meio YPG líquido até atingir uma absorvância total na faixa de 4.0 - 6.0 (correspondente à leitura no espectrofotômetro de 0.4 - 0.6 numa diluição de 1:10), cultivo que geralmente decorria num período de 24 h.

4.2.2.2 Fases de adaptação e seleção

Visando minimizar o tempo de adaptação no cultivo de seleção, foi feita uma segunda cultura em meio líquido logo depois da fase de propagação, utilizando meio contendo 20 g/L de xilose, 1.0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.5 g/L de KH_2PO_4 , 1.0 g/L de Na_2HPO_4 , 1.5 g/L de $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L de CaCl_2 e 2.0 g/L de extrato de levedura. O critério de finalização do cultivo foi igual ao usado na fase de propagação (0.4-0.6 absorvância em diluição 1:10, 600 nm), atingindo esta turbidez num período de 24 - 36 h.

A seleção dos microrganismos foi realizada em cultivo em meio líquido cuja composição foi definida a fim de garantir uma relação em peso C/N=50, contendo 30

g/L de xilose, 0.7 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.5 g/L de KH_2PO_4 , 1.0 g/L de Na_2HPO_4 , 0.4 g/L de $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L de CaCl_2 , 0.008 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_2\text{O}_7$, 0.005 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 1.0 g/L de extrato de levedura. No cálculo da relação C/N foi incluso o aporte do nitrogênio orgânico proveniente do extrato de levedura, conteúdo não superior a 10%. Os cultivos foram feitos em duplicata para cada microrganismo e transcorreram durante um período aproximado de 120 h.

Os cultivos em meio líquido foram realizados em frascos agitados de 250 mL usando 1/5 da capacidade total, as condições de cultivo foram 28°C, pH inicial 5.5 e 150 rpm de agitação. O meio de propagação foi inoculado pela transferência da massa celular do segundo agar inclinado. Os meios de adaptação e seleção foram inoculados com 10%(v/v) dos meios de propagação e adaptação respectivamente, estando eles no estágio exponencial de crescimento.

4.2.3 Metodologia analítica

4.2.3.1 Biomassa seca

A quantificação da biomassa foi feita mediante leitura espectrofotométrica em 600 nm na faixa de 0.1 - 0.6 unidades de absorvância, após a construção da curva padrão para cada microrganismo.

A curva padrão foi obtida usando a biomassa obtida no cultivo de adaptação, com três dias de idade. Entre 8 e 10 amostras são retiradas deste cultivo, são feitas diluições das mesmas e cada uma delas é quantificada por absorvância e peso seco.

4.2.3.2 Lipídeos totais

A quantificação dos lipídeos finais foi determinada gravimetricamente usando o método de extração Bligh & Dyer (MANIRAKIZA P., *et al.*, 2001; BLIGH E.G.,

DYER W.J., 1959), utilizou-se o total da biomassa produzida nos cultivos de seleção após centrifugação, lavagem e liofilização da mesma.

4.2.3.3 Determinação de xilose

A concentração de xilose foi determinada usando um sistema HPLC Waters com detector de índice de refração, usando uma coluna Shodex KS-801. A fase móvel usada foi água grau HPLC na vazão de 1.0 mL/min. O tamanho da injeção foi 10 µL. As temperaturas da coluna e do detector foram 80 e 40°C respectivamente.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Cinéticas de crescimento e consumo de substrato

Estudo cinético do crescimento de vinte leveduras oleaginosas foi realizado, bem como do consumo de substrato para todas as linhagens. Os resultados finais dos ensaios de seleção junto com os principais parâmetros cinéticos (taxa máxima de crescimento e produtividade de lipídeos) estão apresentados na Tabela 4.1.

Os microrganismos apresentaram cinéticas de crescimento e consumo de xilose bem definidas, podendo agrupá-las em três tipos de comportamento. O primeiro deles possui uma fase de adaptação muito curta ou inexistente, seguida de uma longa fase de crescimento exponencial e finalmente o período de estabilização. Um exemplo deste tipo de perfil, o correspondente a *Rhodotorula glutinis* CCT 0783 (Figura 4.1). Este comportamento também foi observado nas leveduras *Rhodotorula glutinis* DSM 10134, *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444, *Cryptococcus curvatus* DSM 70022 e *Candida lipolytica* DSM 8218.

Tabela 4.1: Parâmetros cinéticos das leveduras selecionadas.

Microrganismo	X_{\max} (g/L)	Conteúdo lipídeos (%)	Conversão Xilose (%)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Produtividade de lipídeos (g/L h)
<i>Rhodotorula glutinis</i> CCT 0783	10.28 ± 0.49	4.27 ± 0.44	99.81	0.1117	0.0036
<i>Rhodotorula glutinis</i> INCQS 40161	0.75 ± 0.05	4.68 ± 0.25	9.27	0.0523	0.0003
<i>Rhodotorula glutinis</i> DSM 10134	9.01 ± 0.21	10.17 ± 0.30	92.36	0.1076	0.0083
<i>Rhodotorula glutinis</i> DSM 70398	7.07 ± 0.38	1.72 ± 0.32	84.59	0.1058	0.0014
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> INCQS 40157	8.76 ± 0.12	1.87 ± 0.05	96.36	0.0985	0.0016
<i>Rhodospiridium torulooides</i> DSM 4444	8.96 ± 0.03	11.94 ± 0.05	100.00	0.0994	0.0100
<i>Cryptococcus albidus</i> INCQS 40077	8.31 ± 0.17	2.75 ± 0.16	76.44	0.1049	0.0024
<i>Cryptococcus albidus</i> INCQS 40190	10.54 ± 0.15	1.78 ± 0.04	90.12	0.1093	0.0023
<i>Cryptococcus albidus</i> DSM 70197	5.18 ± 0.23	18.40 ± 0.32	84.88	0.0778	0.0134
<i>Cryptococcus laurentii</i> INCQS 40043	3.73 ± 0.11	9.13 ± 0.30	8.96	0.0757	0.0047
<i>Cryptococcus laurentii</i> INCQS 40213	5.73 ± 0.21	14.59 ± 0.72	31.68	0.0876	0.0079
<i>Cryptococcus laurentii</i> DSM 70766	9.27 ± 0.19	3.21 ± 0.24	100.00	0.1096	0.0041
<i>Cryptococcus curvatus</i> DSM 70022	5.40 ± 0.02	7.33 ± 0.64	38.94	0.0931	0.0036
<i>Lipomyces starkeyi</i> NRRL 11557	12.79 ± 0.41	20.99 ± 0.24	100.00	0.0888	0.0320
<i>Lipomyces starkeyi</i> NRRL 27493	3.91 ± 0.17	8.57 ± 0.18	13.72	0.0710	0.0040
<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	13.88 ± 0.21	24.33 ± 0.91	100.00	0.0870	0.0359
<i>Candida lipolytica</i> DSM 8218	1.10 ± 0.08	6.36 ± 0.40	7.79	0.0452	0.0006
<i>Candida lipolytica</i> DSM 1345	0.67 ± 0.01	n.d.	4.00	0.0658	n.d.
<i>Lipomyces lipofer</i> NRRL 11555	0.32 ± 0.02	n.d.	1.74	0.0171	n.d.
<i>Yarrowia lipolytica</i> DSM 70561	0.43 ± 0.05	n.d.	2.32	0.0535	n.d.

O consumo de substrato nestas leveduras apresenta um perfil clássico, correspondendo a cada uma das etapas de crescimento, e no caso de *Rhodotorula*

glutinis CCT 0783 chega a esgotar totalmente após 120 h de cultivo, tempo no qual começa a fase de crescimento estacionário.

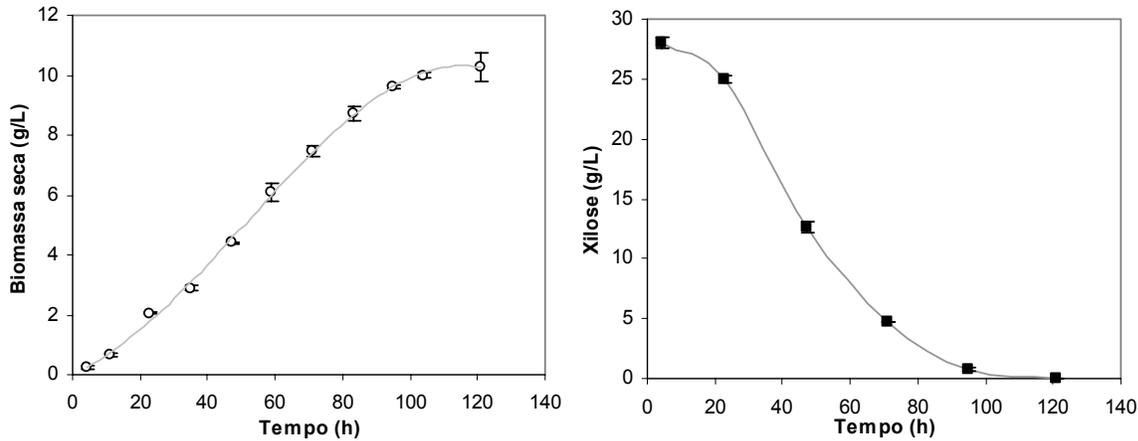


Figura 4.1: Perfil de crescimento e consumo de xilose para *Rhodotorula glutinis* CCT 0783.

O segundo tipo de cinética observado (Figura 4.2) para o crescimento de *Cryptococcus laurentii* INCQS 40043, não foi possível identificar uma fase de adaptação e sim uma de crescimento exponencial imediato, que ocorre a uma taxa específica de crescimento elevada. Não obstante esta etapa é de curta duração e atinge concentrações inferiores de biomassa (inferior a 5 g/L). A xilose foi assimilada pelo microrganismo, mas não foi consumida na totalidade o que pode indicar que a formulação do meio para esta levedura não é adequado, apenas 8 g/L de xilose foram consumidos no período exponencial de crescimento. A limitação de nitrogênio imposta no meio pode ser muito elevada ou o acúmulo de subprodutos derivados do metabolismo da xilose (devidos ao não aproveitamento total do substrato na forma de piruvato) podem deter a multiplicação do microrganismo. Este tipo de cinética foi o mais freqüentemente encontrado nas leveduras testadas, sendo deste tipo o comportamento para *Rhodotorula glutinis* DSM 70398, *Rhodotorula mucilaginosa* INCQS 40157, *Cryptococcus albidus* INCQS 40077, *Cryptococcus albidus* INCQS 40190, *Cryptococcus albidus* DSM 70197, *Cryptococcus laurentii* INCQS 40043, *Cryptococcus*

laurentii INCQS 40213, *Cryptococcus laurentii* DSM 70766, *Lipomyces starkeyi* NRRL 27493 e *Candida lipolytica* DSM 1345.

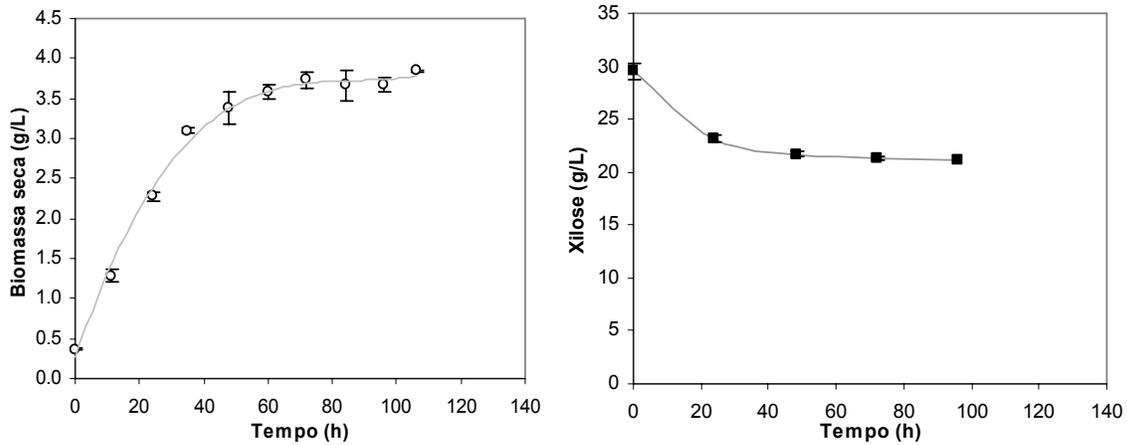


Figura 4.2: Perfil de crescimento e consumo de xilose para *Cryptococcus laurentii* INCQS 40043.

O terceiro tipo de cinética (figura 4.3) foi observado para o crescimento de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296. O comportamento é clássico de um crescimento microbiano sem inibição, apresenta três etapas bem definidas, estabilizando o crescimento após 96 h, tempo no qual o substrato é totalmente esgotado e a concentração de biomassa atingida foi de 14 g/L. Este comportamento foi apresentado por mais dois microrganismos *Lipomyces starkeyi* NRRL 11557 e *Yarrowia lipolytica* DSM 70561, para este último sem atingir uma fase estacionária definida.

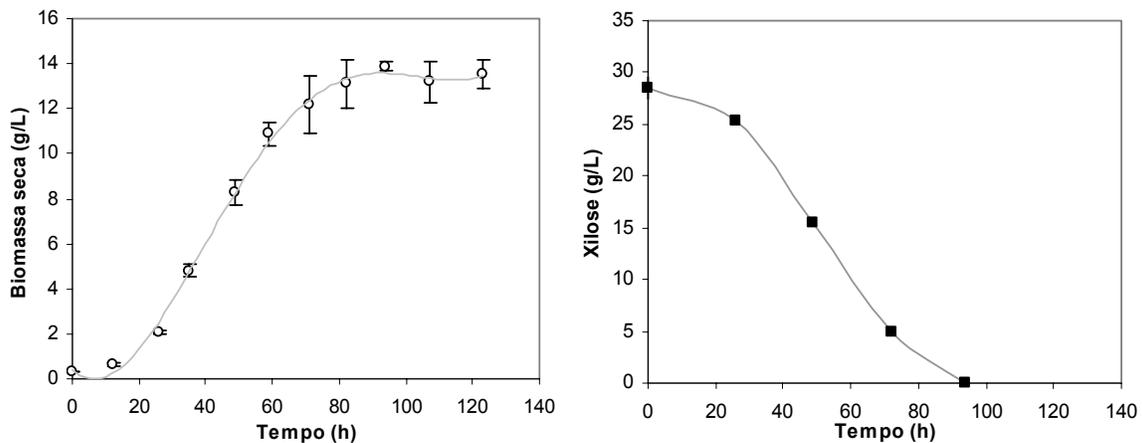


Figura 4.3: Perfil de crescimento e consumo de xilose para *Lipomyces starkeyi* DSM 70296.

4.3.2. Influência da velocidade específica de crescimento na produção de biomassa e lipídeos

Para obter altas produtividades no processo de produção de lipídeos são desejáveis altas taxas de crescimento já que este produto em geral está parcial ou totalmente associado ao crescimento, além de influenciar positivamente a produtividade dos processos de produção, sejam estes em batelada ou contínuos.

Visto que os lipídeos microbianos são um produto de conteúdo intracelular, é também desejável uma concentração final de biomassa elevada, pois uma maior quantidade de produto será obtida.

A Figura 4.4 representa a relação observada entre a biomassa final e a velocidade específica de crescimento para o conjunto de leveduras oleaginosas testadas. Em resumo, dentro deste grupo fisiológico de microrganismos elevadas taxas de crescimento levam a valores intermediários de produção de biomassa sem acúmulo significativo de lipídeos. Uma expressão, que poderia ser derivada de um estudo do metabolismo destas espécies, que explique a relação entre estas duas variáveis não foi ainda proposta pela literatura.

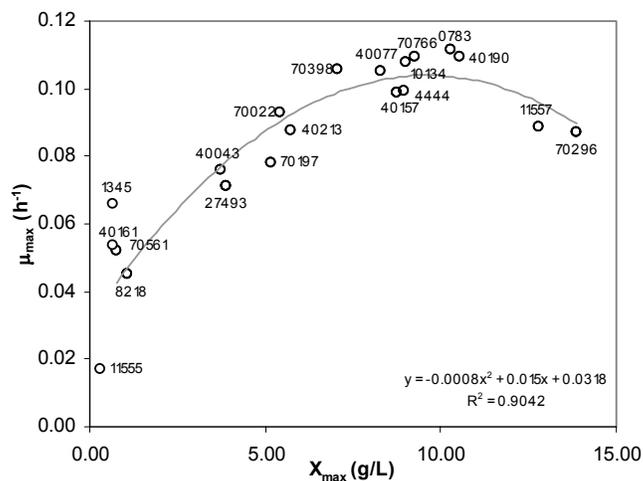


Figura 4.4: Relação entre a taxa máxima de crescimento e a biomassa máxima atingida para cada microrganismo testado.

A figura 4.5 representa a relação entre a taxa máxima de crescimento e a fração de lipídeos para cada microrganismo. Assim, este gráfico de dispersão apresenta evidente agrupamento dos dados, mostrando uma alta dispersão no grupo II, indicando que as leveduras com conteúdos de lipídeos intermediários apresentam diversas velocidades de crescimento.

Foi possível observar que os microrganismos do grupo III, contendo frações elevadas de lipídeos (entre 11 e 25%) apresentam taxas de crescimento similares na faixa de 0.08 a 0.1 h⁻¹.

Uma análise de grupamentos deste espaço bidimensional confirma a existência de dois grandes grupos (Figura 4.6.), o primeiro deles (à esquerda) é composto pelas cepas DSM 70296, NRRL Y-11557 e DSM 70197, microrganismos que são os maiores produtores de lipídeos da população testada. O segundo grupo principal divide-se em dois, correspondendo aos agrupamentos na posição central e esquerda no gráfico de dispersão. O grupo que descreve o agrupamento central apresenta grandes distancias entre as ligações dos membros, mostrando-se como o cluster com maior heterogeneidade.

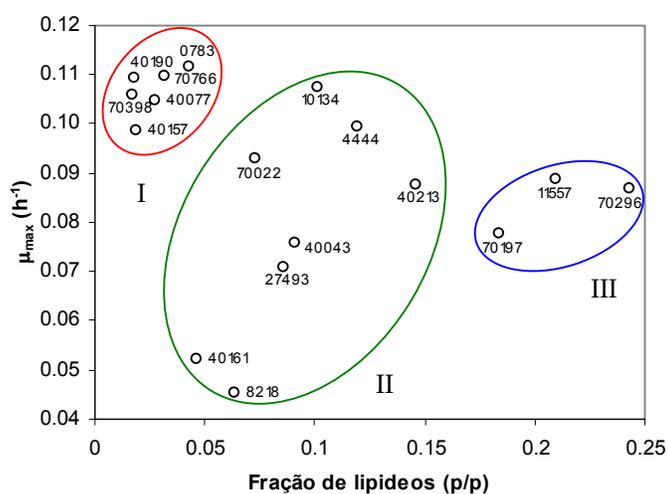


Figura 4.5: Relação entre a taxa máxima de crescimento e fração de lipídeos para cada microrganismo testado.

O cluster correspondente ao agrupamento à direita (Figura 4.6) apresenta as menores distâncias entre eles sendo a cepa CCT 0783 a que se afasta mais dos demais membros do grupo. Dentro do primeiro cluster (à esquerda) a cepa *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 afasta-se dos outros dois membros o que a projeta como a melhor cepa do conjunto inteiro.

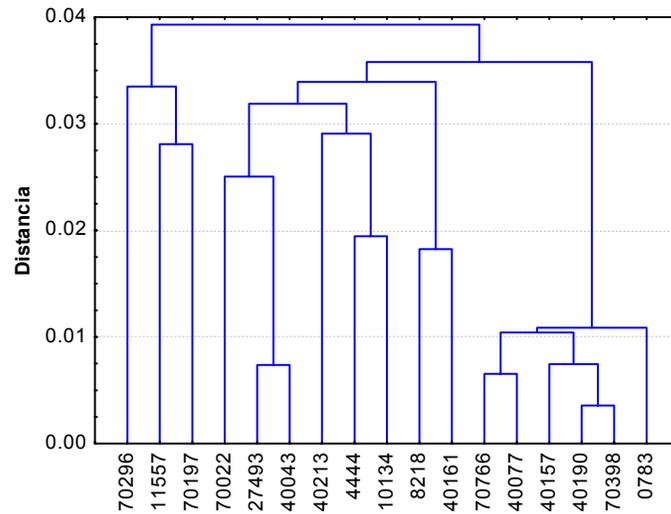


Figura 4.6: Análise de clusters do espaço bidimensional descrito entre a taxa máxima de crescimento e o conteúdo de lipídeos.

4.3.3 Análise do rendimento energético do crescimento

Baseado nos trabalhos pioneiros sobre predição de rendimentos e análise energética dos processos de fermentação (MINKEVICH I.G., EROSHIN V.K., 1973; ERICKSON L.E., *et al.*, 1978; ROELS, 1980; EROSHIN V.K., KRYLOVA N.I., 1983; PAN J.G., RHEE J.S., 1986), é possível determinar o rendimento energético dos microrganismos oleaginosos.

O primeiro passo a ser realizado é o balanço de massa global do crescimento e da produção de lipídeos (Eq. 4.1).



Onde o substrato ($CH_l O_m$), junto com a fonte de nitrogênio do tipo amônio e oxigênio produzem biomassa ($CH_a O_b N_c$), lipídeos ($CH_p O_q$), água e dióxido de

carbono. Um balanço por elemento produz um sistema de quatro equações (Eq.4.2 a 4.5).

$$\text{Balanço de C: } \alpha = 1 + \delta + \kappa \quad (\text{Eq. 4.2})$$

$$\text{Balanço de O: } m\alpha + 2\gamma = b + q\delta + \xi + 2\kappa \quad (\text{Eq. 4.3})$$

$$\text{Balanço de H: } l\alpha + 3\beta = a + \delta p + 2\xi \quad (\text{Eq. 4.4})$$

$$\text{Balanço de N: } \beta = c \quad (\text{Eq. 4.5})$$

Além desses balanços, é necessário o balanço de elétrons da reação (Eq. 4.1), apresentado na Eq. 4.6.

$$\alpha\gamma_s + \beta\gamma_{NH_3} + \gamma\gamma_{O_2} = \gamma_x + \delta\gamma_p + \xi\gamma_{H_2O} + \kappa\gamma_{CO_2} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

Segundo a convenção geralmente adotada, o grau de redução do oxigênio possui um valor de zero, pelo cálculo convencional a água, o amônio e o dióxido de carbono também não fazem contribuição no balanço de elétrons, o grau de redução das espécies restantes é apresentado nas equações 4.7 a 4.9.

$$\gamma_x = 4 + a - 2b - 3c \quad (\text{Eq. 4.7})$$

$$\gamma_s = 4 + l - 2m \quad (\text{Eq. 4.8})$$

$$\gamma_p = 4 + p - 2q \quad (\text{Eq. 4.9})$$

O balanço de elétrons (Eq. 4.6), pode rearranjar-se para a expressão (Eq. 4.10).

$$1 = \frac{\gamma_x}{\alpha\gamma_s} + \frac{\delta\gamma_p}{\alpha\gamma_s} + \frac{4\gamma}{\alpha\gamma_s} = \frac{1}{\alpha} \frac{\gamma_x}{\gamma_s} + \frac{\delta}{\alpha} \frac{\gamma_p}{\gamma_s} + \frac{\gamma}{\alpha} \frac{4}{\gamma_s} \quad (\text{Eq. 4.10})$$

O primeiro termo à direita da equação 4.10 é a fração de energia contida no substrato convertida em biomassa, o que leva à definição do rendimento energético do crescimento, η , (Eq. 4.11).

$$\eta = \frac{\gamma_x}{\alpha\gamma_s} \quad (\text{Eq. 4.11})$$

A fração $\frac{1}{\alpha}$ que acompanha à relação de graus de redução é o rendimento molar biomassa livre em relação ao substrato ($Y'_{x\text{livre}/s}$), isto é:

$$Y'_{x\text{livre}/s} = \frac{1}{\alpha} \quad (\text{Eq. 4.12})$$

Como os dados experimentais são obtidos em relação à massa, é necessário converter este rendimento em rendimento mássico (Eq. 4.13). Para isto usam-se as frações mássicas de carbono do substrato (σ_s) e da biomassa livre ($\sigma_{x\text{livre}}$).

$$\frac{1}{\alpha} = \frac{\sigma_{x\text{livre}}}{\sigma_s} Y_{x\text{livre}/s} \quad (\text{Eq. 4.13})$$

Substituindo esta última expressão (Eq. 4.13) na equação 4.11, uma expressão do rendimento energético baseada no rendimento de crescimento (Eq. 4.14) é obtida. Onde $Y_{x/s}$ é o rendimento biomassa livre de lipídeo/substrato, σ_x e σ_s são as frações mássicas de carbono na biomassa e no substrato respectivamente, $\gamma_{x\text{livre}}$ e γ_s são os graus de redução da biomassa livre e o substrato respectivamente.

$$\eta = \left(\frac{\sigma_{x\text{livre}} \gamma_{x\text{livre}}}{\sigma_s \gamma_s} \right) Y_{x\text{livre}/s} \quad (\text{Eq. 4.14})$$

Usando a correlação empírica descrita por Eroshin e Krylova (1983) para o produto $\sigma_x \gamma_x$ em função do conteúdo de lipídeos em base seca L (%) para microrganismos oleaginosos cultivados em etanol, é possível descrever o rendimento de lipídeos e de biomassa em função do conteúdo de lipídeos para diferentes valores do rendimento energético (Eq. 4.15).

$$\sigma_x \gamma_x = 1.6 + 0.0308 \times L \quad (\text{Eq. 4.15})$$

O rendimento lipídeo-substrato pode ser definido com base no conteúdo de lipídeos e no rendimento biomassa livre - substrato (Eq. 4.16).

$$Y_{L/s} = \frac{L}{100 - L} Y_{x\text{livre}/s} \quad (\text{Eq. 4.16})$$

Substituindo as equações 4.14 e 4.15 em 4.16 é obtida a expressão teórica do rendimento lipídico a substrato em função do rendimento energético de crescimento (Eq. 4.17).

$$Y_{L/S} = \sigma_s \gamma_s \cdot \frac{L}{1.6 + 0.0308L} \cdot \eta \quad (\text{Eq. 4.17})$$

Pela relação existente entre os rendimentos de lipídeos e biomassa (Eq. 4.16), é obtida a expressão teórica do rendimento biomassa livre a substrato em função do rendimento energético de crescimento (Eq. 4.18).

$$Y_{X_{livre}/S} = \sigma_s \gamma_s \cdot \frac{L}{1.6 + 0.0308L} \cdot \eta \cdot \frac{100 - L}{L} \quad (\text{Eq. 4.18})$$

Aplicando as equações 4.17 e 4.18 são obtidas as linhas teóricas (contínuas) das Figuras 4.7 e 4.8. Ao sobrepor os resultados experimentais aos gráficos teóricos foi observada uma distribuição adequada destes com relação às tendências descritas pelo modelo. O rendimento energético do crescimento é útil quando se quer avaliar o crescimento de microrganismos com conteúdos energéticos diferentes (EROSHIN V., KRYLOVA N., 1983), como é o caso do acúmulo intracelular de lipídeos. Assim neste caso este parâmetro caracteriza a eficiência de crescimento. As leveduras *L. starkeyi* DSM 70296 e NRRL Y-11557 apresentaram os maiores rendimentos energéticos, mesmo possuindo rendimentos biomassa-substrato médios e inclusive inferiores a várias outras leveduras testadas, indicando que estas duas cepas aproveitaram mais eficientemente a energia contida no substrato no crescimento, mantendo uma alta produção de lipídeos.

Comportamento oposto foi observado para a levedura *Cryptococcus albidus* INCQS 40190, a qual apresentou rendimento biomassa-substrato maior que o obtido para as duas linhagens de *Lipomyces starkeyi* descritas anteriormente, mas com eficiência de crescimento menor. Para uma mesma quantidade de xilose metabolizada *Cryptococcus* produz uma menor quantidade de biomassa final e menor conteúdo de

lipídeos do que *Lipomyces*. A utilidade do parâmetro rendimento energético de crescimento está assim demonstrada proporcionando uma visão global do processo.

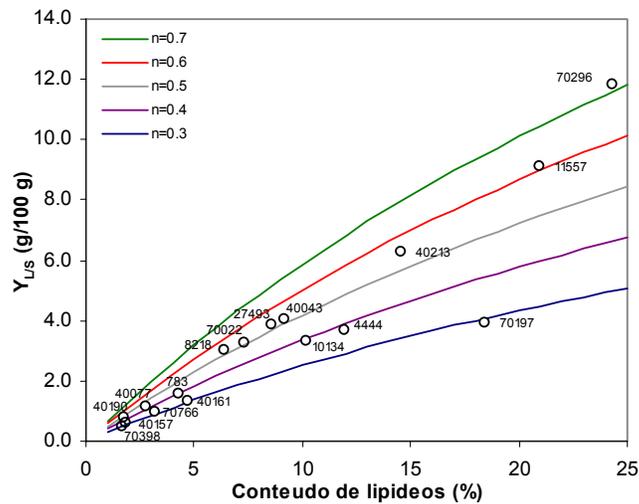


Figura 4.7: Relação entre o rendimento energético e o rendimento em lipídeos para os microrganismos avaliados.

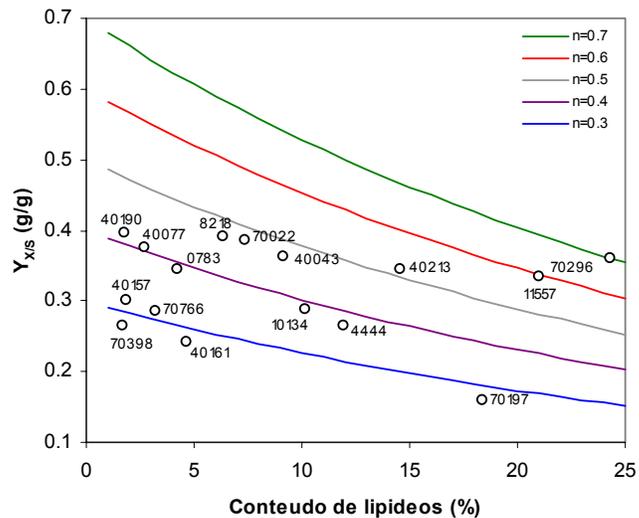


Figura 4.8: Relação entre o rendimento energético e o rendimento em biomassa livre para os microrganismos avaliados.

Em termos de produtividade de biomassa destas duas cepas são muito superiores às demais testadas, mesmo possuindo taxas de consumo de xilose e de crescimento intermediárias (Figura 4.9). Isto pode ser devido a seu rendimento energético, assim o substrato consumido é aproveitado muito melhor nos processos metabólicos internos de reprodução.

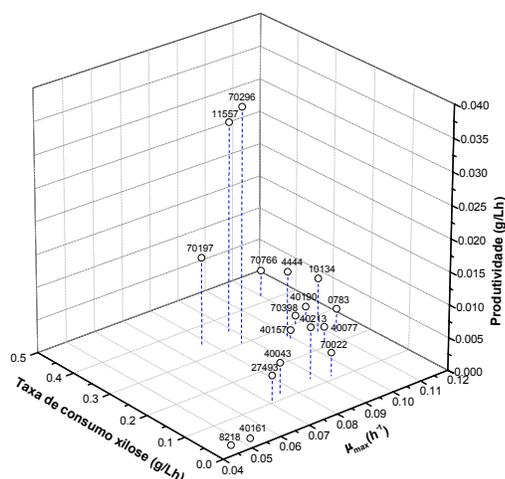


Figura 4.9: Produtividade dos microrganismos em função das taxas de consumo de xilose e máxima de crescimento

4.4 Conclusões

A análise cinética mostra que as cepas *Lipomyces starkeyi* NRRL 11557 e *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 apresentam a melhor produtividade no processo de produção de lipídeos a partir de xilose, adicionalmente a eficiência energética destas duas cepas é superior quando comparadas com as demais leveduras testadas. O rendimento em lipídeos é comparável com os encontrados na literatura, entretanto é 1/3 do valor teórico máximo. Limitações inerentes ao substrato ou a outros parâmetros de operação derivados do modo de cultivo (frascos agitados) nos ensaios de seleção (limitações de oxigênio, falta de controle do pH) podem ter efeito significativo nos valores do rendimento.

4.5 Referências bibliográficas

BLIGH E.G., DYER W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917, 1959.

ERICKSON L.E., MINKEVICH I.G., EROSHIN V.K., Application of mass and energy balance regularities in fermentation, *Biotechnology and Bioengineering*, 20, 1595-1621, 1978.

EROSHIN V.K., KRYLOVA N.I., Efficiency of lipid synthesis by yeasts, *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 1693-1700, 1983.

MANIRAKIZA P., COVACI A., SCHEPENS P., Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 93-100, 2001.

MINKEVICH I.G., EROSHIN V.K., Productivity and heat generation of fermentation under oxygen limitation, *Folia Microbiologica*, 18, 376-385, 1973.

MORETON R.S., *Single Cell Oil*, Longman, 1988

PAN J.G., RHEE J.S., Biomass yields and energetic yields of oleaginous yeasts in batch culture, *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 112-114, 1986.

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

ZHAO X., KONG X., HUA Y., FENG B., ZHAO Z.K., Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*, *European Journal of Lipid Science and Technology*, DOI 10.1002/ejlt.20070224, 2008.

ESTUDOS DE INIBIÇÃO POR SUBSTRATO E MODELAGEM NÃO ESTRUTURADA PARA O CULTIVO DE *Lipomyces starkeyi* DSM 70296

5.1 Resumo

Os estudos de inibição são necessários quando o objetivo é estabelecer a máxima concentração de substrato que pode ser utilizada em um processo em batelada simples, visando um aumento global da produtividade. Além disso, melhor conhecimento da cinética do processo possibilita a definição dos parâmetros necessários para a descrição matemática do mesmo. Neste capítulo os resultados dos estudos de inibição por xilose desenvolvidos para *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 estão apresentados. Um modelo matemático simples foi formulado baseado na homologia do processo de acúmulo de lipídeos com o de produção de PHA microbiano. A linhagem testada apresentou velocidade máxima específica de crescimento de 0.0923 h^{-1} usando concentração inicial de 30 g/L de xilose. Foi observada uma queda na velocidade de crescimento para concentrações acima de 60 g/L , sendo o crescimento nulo em concentrações superiores a 200 g/L de xilose. O modelo representou adequadamente os dados experimentais obtidos em biorreator. A composição do lipídeo microbiano produzido é semelhante aos óleos vegetais e possui baixa insaturação. Desta forma o valor cetano do biodiesel produzido atende as especificações internacionais deste combustível.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Microrganismo

A levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 foi utilizada em todos os experimentos. O microrganismo foi preservado em ágar inclinado YPG a 4°C e/ou em criovial com 10% de glicerol como descrito na seção 3.2.1.

5.2.2 Meios de cultivo

Como meio de cultivo para todos os experimentos utilizou-se o meio de fermentação especificado na seção 3.2.2. Nos ensaios de inibição por substrato foram utilizadas oito concentrações iniciais de xilose: 10, 30, 60, 90, 120, 150, 200 e 300 g/L a uma relação C/N=10 g/g sendo 40% do nitrogênio utilizado proveniente do extrato de levedura. Preparou-se uma solução de 500 g/L de xilose a qual foi dosada assepticamente na proporção adequada para obter as concentrações iniciais necessárias nos meios, esta solução não apresentou cristalização e foi estável à esterilização em autoclave.

Para os ensaios em biorreator foi utilizada uma relação C/N=50 g/g. Uma solução de 300 g/L de xilose foi esterilizada separadamente e adicionada assepticamente ao meio salino no biorreator até atingir uma concentração inicial no meio de 30 g/L. O meio de fermentação foi esterilizado junto com o biorreator em autoclave a 121°C por 20 minutos. O pH inicial dos meios foi ajustado a 5.5 com HCl 1M. O preparo do inóculo para todos os experimentos foi realizado como descrito na seção 3.2.2.

5.2.3 Condições de fermentação

Para os ensaios de inibição foram utilizadas as condições descritas na seção 3.2.3. Durante os experimentos de inibição foram retiradas amostras em intervalos regulares de tempo durante as primeiras 48 h para análise de crescimento e consumo

de substrato. Os cultivos foram interrompidos após 120 horas de fermentação, a biomassa final foi coletada para sua quantificação e para análise do conteúdo de lipídeos.

Os cultivos em biorreator foram realizados em batelada simples usando um fermentador de 3 L BioFlo III (New Brunswick Scientific-Edison N.J. U.S.A.). O volume total de trabalho utilizado foi de 2 L, iniciando-se com 1.8 L de meio e adicionando-se 200 mL de inóculo. As condições de operação foram: agitação de 400 rpm usando duas turbinas tipo Rushton de seis pás, aeração de 1 v.v.m. e pH=5.5 controlado com NaOH 2M. O fermentador foi amostrado assepticamente em espaços regulares de tempo para análise de crescimento, consumo de substrato e nitrogênio e produção de lipídeos. Os cultivos foram interrompidos quando atingida a fase estacionária do crescimento, após aproximadamente 60 horas de fermentação.

Todos os cultivos foram feitos em duplicata e são apresentados os valores médios de cada variável.

5.2.4 Metodologia analítica

5.2.4.1 Biomassa seca

Nos ensaios de inibição a biomassa seca de cada amostra foi determinada indiretamente por espectrofotometria como descrito na seção 3.2.4.1. No final dos experimentos, o meio fermentado foi centrifugado e lavado duas vezes a 8000 rpm e 4°C por 15 minutos. O pellet obtido foi congelado a -80°C por 24 horas e liofilizado. A biomassa final seca foi determinada gravimetricamente.

O crescimento microbiano, nos ensaios em biorreator, também foi determinado por espectrofotometria. Adicionalmente a cada 12 horas uma amostra de 50 mL foi retirada, centrifugada, lavada e seca por liofilização para a determinação direta da biomassa total.

5.2.4.2 Determinação de xilose

A concentração de xilose foi determinada por cromatografia líquida HPLC, conforme descrito na seção 3.2.4.3.

5.2.4.3 Determinação de nitrogênio (N-NH₃⁺)

O consumo do nitrogênio inorgânico, na forma de nitrogênio amoniacal, foi determinado mediante a reação de Berthelot (WEATHERBURN M.W., 1967) seguindo o protocolo proposto por Srienc e colaboradores (SRIENC F., *et al.*, 1984). Resumidamente, 100 µL de amostra previamente diluída foram misturados com 2 mL da solução A (10 g/L de fenol, 10 mg/L de nitroprusiato de sódio) e 2 mL da solução B (35.7 g/L de Na₂HPO₄ anidro, 6 g/L de NaOH e 10 mL/L de NaOCl grau técnico) em um tubo fechado. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 630 nm. A concentração de nitrogênio é obtida mediante o uso da curva de calibração correspondente, construída utilizando soluções de concentração definida de sulfato de amônia.

5.2.4.4 Lipídeos totais

Os lipídeos totais foram determinados gravimetricamente utilizando o método de extração de Bligh & Dyer (BLIGH E.G, DYER W.J., 1959) modificado por Manirakiza e colaboradores (MANIRAKIZA P., *et al.*, 2001) como especificado na seção 3.2.4.2. Para facilitar a extração foi realizada uma digestão ácida visando o rompimento da parede celular. Desta forma 400 mg de biomassa seca foram tratados com 5 mL de HCl 2M, por uma hora a 80°C, após centrifugação, (8000 rpm, 15 min, 4°C), a biomassa úmida utilizou-se na extração da forma convencional.

5.2.4.5 Análise qualitativa dos lipídeos por CCD

Uma análise qualitativa dos triglicerídeos produzidos foi feita usando cromatografia em camada delgada (CCD), adaptou-se o protocolo utilizado por

Alvarez e colaboradores (ALVAREZ A.F., *et al.*, 2008). Extratos de lipídeos obtidos pelo método de Bligh & Dyer foram dissolvidos em uma solução clorofórmio/metanol (2:1, v/v) até uma concentração de 2 g/L, desta solução foram aplicados 15 µL em uma placa de sílica gel 60 (Merck) previamente lavada com a fase móvel e ativada por 30 minutos em forno a 60°C. Como fase móvel foi utilizada uma mistura hexano/dietileter/ácido acético (80:20:1, em volume). Como substâncias de referência foram utilizadas trioleína, ácido oléico e óleo de soja refinado. A placa foi revelada em uma câmara saturada com vapores de iodo metálico até uma adequada visualização das bandas.

5.2.5. Composição dos lipídeos em ácidos graxos

Para a determinação da composição de ácidos graxos foi realizada uma derivatização a ésteres metílicos mediante transesterificação direta da biomassa seca e posterior análise por cromatografia gasosa. O protocolo de transesterificação foi adaptado de Lewis (LEWIS T., *et al.*, 2000). Vinte miligramas de biomassa liofilizada foram transesterificadas usando 3 mL de uma mistura metanol/ácido clorídrico/clorofórmio (10:1:1, em volume) a 90°C durante uma hora. Os ésteres produzidos foram extraídos três vezes utilizando 2 mL de hexano/clorofórmio (4:1, v/v) e 1 mL de água, a mistura foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos para uma completa separação das fases. A fase leve (hexano com metil ésteres) é separada, seca sobre sulfato de sódio anidro e filtrada com membrana de 0.45 µm. A amostra foi mantida a -20°C até injeção no cromatografo.

Na análise cromatográfica foi utilizado um sistema Varian Star 3600 CX com detector de ionização de chama (FID) e coluna DB-23, 30 m x 0.53 mm da J&W Scientific. Como fase móvel usou-se hélio (15 psi, split 1/100) com temperaturas no injetor e no detector de 250°C e 300°C. A programação da rampa de temperatura para a coluna foi: temperatura inicial de 50°C durante 2 min, gradiente de 10°C/min até 180°C com um tempo de espera de 5 min, gradiente de 5°C/min até atingir uma

temperatura final de 240°C. O tempo total da corrida foi de 32 minutos. O volume de injeção foi de 1 µL.

A identificação dos ésteres metílicos foi feita mediante comparação do tempo de retenção com padrões previamente injetados (Supelco 37 FAME mix). A quantificação foi feita mediante a técnica do padrão externo.

5.2.6 Calculo de parâmetros

Nos ensaios de inibição a velocidade máxima específica de crescimento foi obtida a partir do ajuste linear entre $\ln(X/X_0)$ e o tempo. O coeficiente angular da reta com melhor ajuste (R^2 máximo) foi o valor escolhido para o parâmetro. A velocidade específica de consumo de substrato foi calculada de uma maneira análoga.

O valor cetano do biodiesel correspondente ao lipídeo produzido foi calculado utilizando a equação de Klopfenstein para um ester de ácido graxo puro (Eq. 5.1).

$$\text{Valor cetano} = 58.1 + 2.8 \frac{(n-8)}{2} - 15.9 \times (\text{número de insaturações}) \quad (\text{Eq. 5.1})$$

Sendo n o número de carbonos da cadeia. O valor cetano da mistura foi calculado como a media ponderada do valor cetano obtido para cada ácido graxo segundo sua composição final no lipídeo microbiano. (KRISNANGKURA K., 1986)

5.2.7 Métodos numéricos

O ajuste dos modelos de inibição foi feita por minimização da soma das diferenças quadráticas entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo, usando o modelo de regressão não-linear de gradiente reduzido generalizado “GRG” disponibilizado pela função Solver da planilha de calculo Excel (BROWN A.M., 2001). A resolução do sistema de equações diferenciais do modelo de crescimento e produção de lipídeos foi realizada usando a rotina Runge-Kutta ODE45 de Matlab 7.0. O ajuste gráfico das curvas obtidas pelos modelos foi realizado usando o programa OriginPro 7.5G.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Estudos de inibição por substrato

Visando determinar o efeito da concentração do substrato no crescimento, foram obtidas cinéticas usando concentrações de xilose na faixa de 10 até 300 g/L utilizando uma relação C/N não limitante, tentando assim restringir o processo de acúmulo e priorizar o crescimento (figura 5.1). Os perfis de biomassa total durante as primeiras 48 horas estão apresentados na figura 5.1^a, os experimentos utilizando 10 g/L atingiram a fase estacionária na faixa de tempo estudada, as fermentações utilizando 200 e 300 g/L não apresentaram crescimento significativo nas condições testadas.

Segundo os dados cinéticos obtidos, em um processo em batelada simples, é possível utilizar concentrações iniciais de xilose de até 60 g/L, concentrações de 90 g/L apresentam uma repressão importante no crescimento, e acima deste valor os efeitos inibitórios são fortes até inibir totalmente o crescimento em concentrações próximas de 200 g/L.

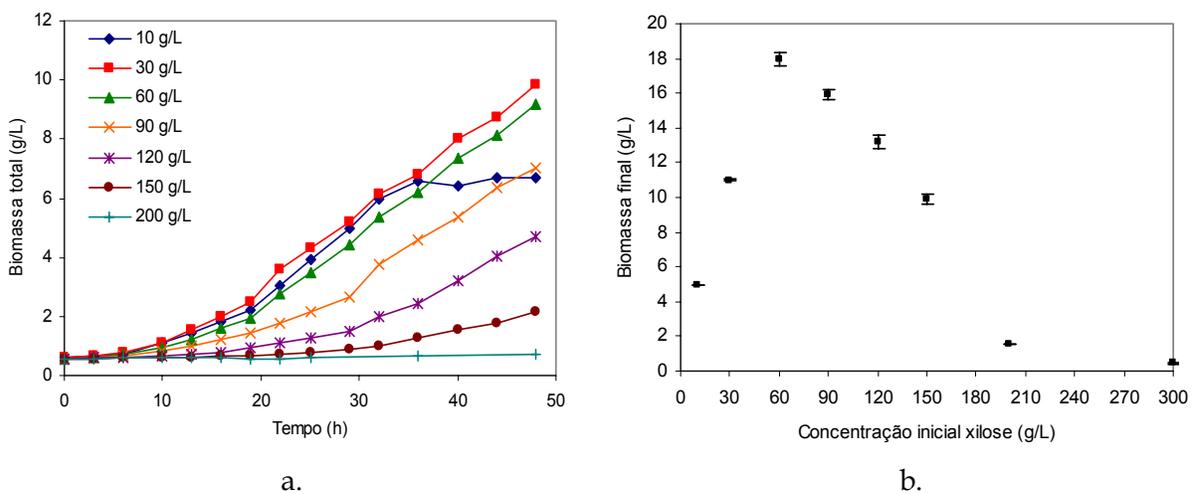


Figura 5.1: Efeito da concentração inicial de xilose no crescimento de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296
a. cinéticas de crescimento, b. biomassa final após 120 h de cultivo

A biomassa final (Figura 5.1b) atingiu um valor máximo de 18 g/L para experimentos com concentração inicial de 60 g/L de xilose, nas concentrações de 90 e 120 g/L foram obtidos valores elevados de biomassa final (superiores a 14 g/L), mas com conversões muito inferiores às conseguidas com concentrações menores de xilose (tabela 5.1). É importante destacar que sempre são desejadas elevadas conversões do substrato para que o processo seja viável economicamente; os valores de conversão também podem ser usados análise de redundância e assim identificar erros na análise dos dados. Neste caso, as concentrações finais de biomassa atingidas foram consistentes com as conversões obtidas.

A tabela 5.1 apresenta o conteúdo de lipídeos presente na biomassa. Este foi superior ao esperado devido à relação C/N utilizada, demonstrando que esta levedura é capaz de produzir triglicerídeos mesmo em relações C/N baixas (10 g/g), isto dificulta o análise do crescimento já que os parâmetros ajustados utilizando os dados de biomassa total não representam o processo de crescimento da biomassa cataliticamente ativa, mas sim o processo conjunto de crescimento - acúmulo. As velocidades específicas de crescimento calculadas representam, então, a taxa específica de aumento da biomassa total.

Tabela 5.1: Lipídeos acumulados a diferentes concentrações iniciais de substrato

Concentração inicial de xilose (g/L)	Conversão de xilose (%)	Conteúdo de lipídeos (%)	$Y_{l/s}$ (g/g)
10	100	14.6	0.0903
30	100	14.0	0.0490
60	85.2	17.3	0.0580
90	51.0	22.2	0.0797
120	35.5	14.5	0.0460
150	17.8	16.5	0.0616
200	7.30	n.d.	n.d.
300	1.50	n.d.	n.d.

n.d.: não determinado

Foi observado que o rendimento da produção de lipídeos ($Y_{L/S}$) foi máximo na maior valor na menor concentração inicial de xilose testada, para as outras concentrações avaliadas o rendimento não apresentou desvios importantes.

A análise cinética do consumo de substrato feito para cada concentração de xilose permitiu calcular as velocidades específicas de consumo de substrato. Estas velocidades diminuem exponencialmente com o aumento dos níveis iniciais de xilose (figura 5.2). Na concentração de 90 g/L de xilose, onde foram evidenciados os primeiros sinais de inibição, o valor deste parâmetro já apresenta uma queda de 50% quando comparado ao obtido na menor concentração de xilose testada.

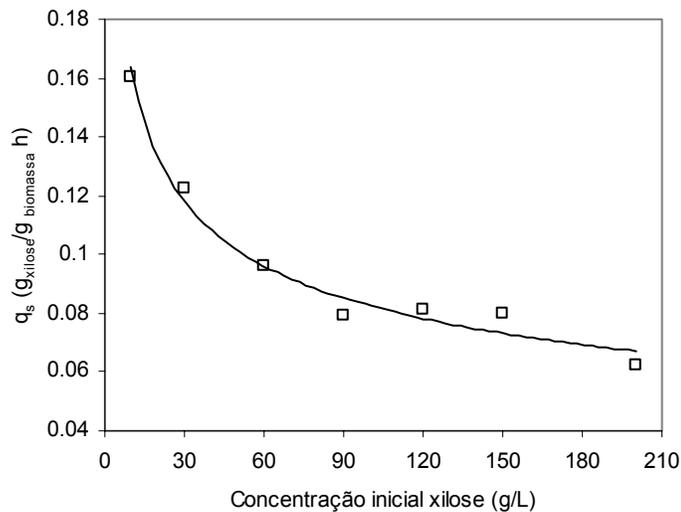


Figura 5.2: Velocidade específica de consumo de substrato em função da concentração inicial de substrato

5.3.2 Modelos de inibição

A partir das cinéticas geradas foram calculadas as velocidades máximas específicas de crescimento para cada nível de substrato testado. Observou-se que o efeito da concentração inicial de xilose na velocidade específica foi característico de uma inibição por substrato convencional, onde o crescimento é estimulado a baixas concentrações, atingindo um valor máximo de 0.0923 h^{-1} em 30 g/L de xilose. Acima deste ponto a velocidade de crescimento decresce quase linearmente até atingir um valor de zero em concentrações superiores a aproximadamente 210 g/L.

Os resultados anteriores indicaram que o modelo de Monod para a velocidade específica de crescimento não poderia ser utilizado para descrever o crescimento de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296. O modelo de Monod prediz que a o valor da velocidade específica de crescimento é proporcional à concentração de substrato, atingindo um patamar em altas concentrações do mesmo (MONOD J., 1949), ignorando assim os efeitos inibitórios encontrados a concentrações iniciais de xilose acima de 30 g/L.

Como a literatura não foi descrito ainda o ajuste de modelos de inibição no cultivo de leveduras oleaginosas, tomou-se como referência a teoria desenvolvida para o processo de produção de polihidroxialcanoatos (PHA). Os PHA são biopolímeros microbianos produzidos intracelularmente sob condições de crescimento não-balanceadas, as quais são similares às encontradas no processo de acúmulo de lipídeos em leveduras oleaginosas. Mulchandani desenvolveu estudos de inibição para o crescimento e acúmulo de poly-β-hidroxibutirato usando *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697 (MULCHANDANI A., et al., 1989). Nesse estudo foi proposta uma expressão para descrever a cinética de inibição por substrato (equação 5.1)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \left[1 - \left(\frac{S}{S_m} \right)^n \right] \quad (\text{Eq. 5.1})$$

Sendo S a relação N/C, K_s a constante de saturação, S_m a relação N/C onde a velocidade específica de crescimento é zero e n a constante do modelo. Nos experimentos de inibição desenvolvidos a relação C/N foi mantida, por isto, na aplicação deste modelo S será a concentração inicial de xilose. Na literatura adaptações deste tipo já foram utilizadas. (KHANNA S., SRIVASTAVA A.K, 2005)

Com o objetivo de avaliar outras expressões, foram testadas as expressões de Luong (equação 5.2) desenvolvida para o crescimento de *Candida utilis* em butanol (LUONG J.H.T., 1987) e Andrews (equação 5.3) aplicada amplamente para diversos inibidores (ANDREWS J.F., 1968).

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S} \left[1 - \frac{S}{S_m} \right]^m \quad (\text{Eq. 5.2})$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_{Si}}} \quad (\text{Eq. 5.3})$$

A Figura 5.3 mostra o ajuste dos três modelos de inibição propostos aos dados experimentais usando a técnica de regressão não-linear GRG, como comparação foi inserida a predição do modelo de Monod utilizando o valor da velocidade máxima de crescimento determinada no procedimento de ajuste para cada um dos modelos.

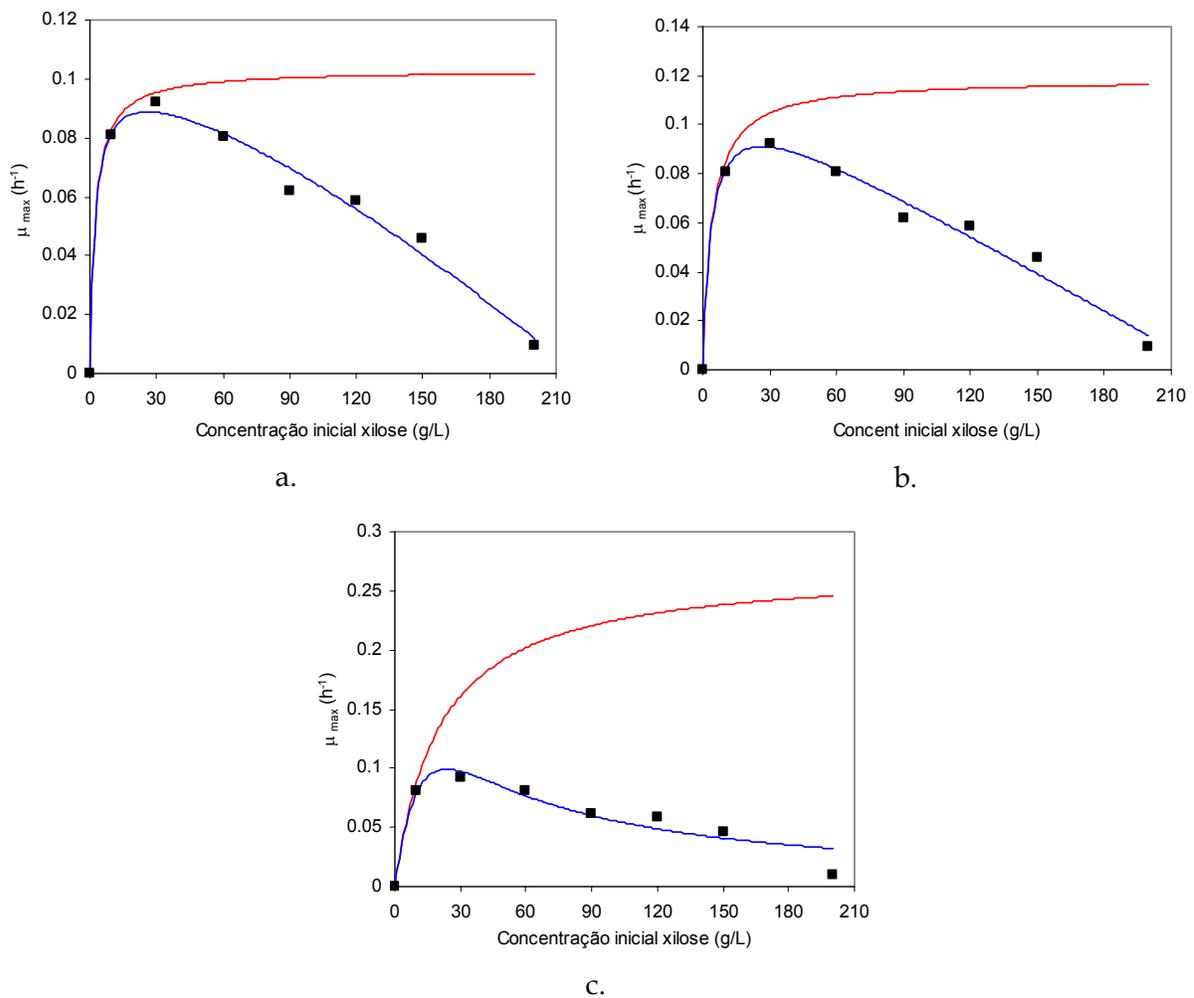


Figura 5.3: Velocidade máxima específica de crescimento em função da concentração inicial de substrato, ajuste de diferentes modelos (—) em comparação ao comportamento predito por Monod (—), a. Mulchandani, b. Luong, c. Andrews

Os três modelos representaram similarmente os dados até concentrações iniciais de 60 g/L de xilose, após esse valor encontraram-se ajustes com tendências diferentes. Mulchandani prediz uma curva côncava com queda progressiva na velocidade específica de crescimento até zero; pelo contrário, Andrews apresenta uma diminuição rápida da velocidade, mas com tendência assintótica a um valor mínimo. Luong apresentou uma redução linear deste parâmetro cinético.

Tabela 5.2: Valores dos parâmetros e grau de ajuste dos modelos de inibição

Modelo	μ_{\max} (h ⁻¹)	K_S	K_{Si}	S_m	m	n	Erro padrão	R ²
Mulchandani	0.103	2.368	---	219.8	---	1.326	0.00550	0.985
Luong	0.118	3.976	---	227.0	1.000	---	0.00577	0.983
Andrews	0.271	20.46	27.33	---	---	---	0.0118	0.913

Quando se compara cada modelo com seu homólogo de Monod até 30 g/L de concentração inicial de xilose, fica claro que os parâmetros determinados pelo modelo de Mulchandani são os que melhor representam a natureza dos experimentos, o valor da constante de saturação K_S e da concentração inibitória total S_m estão muito próximos aos encontrados experimentalmente (tabela 5.2). As velocidades máximas de crescimento obtidas pelo modelo de Luong e Andrews superestimam o crescimento real da linhagem, razão pela qual o modelo de Monod afasta-se dos valores experimentais inclusive para concentrações iniciais baixas de substrato. Assim, o modelo de Mulchandani foi escolhido para representar a cinética de inibição apresentada por *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, devido à qualidade de ajuste obtida e à significância física dos seus parâmetros.

Poucos estudos de inibição foram realizados para o cultivo de leveduras oleaginosas, Sattur e Karanth realizaram estudos de inibição por glicose na faixa de 20 a 100 g/L usando *Rhodotorula gracilis* CFR-1 a uma relação C/N fixa de 70, nas concentrações estudadas não foi encontrado um efeito inibitório importante

(SATTUR A.P., KARANTH N.G., 1991a). Os dados experimentais apresentados pelos autores possuem uma grande dispersão, mesmo assim foram correlacionados com o modelo de Monod, o qual foi descartado posteriormente pelos autores.

Li e colaboradores (LI Y., *et al.*, 2007) desenvolveram estudos de inibição por glicose para *Rhodospiridium toruloides* Y4, encontrando que concentrações acima de 150 g/L tinham um efeito inibitório importante. Os resultados não foram analisados buscando uma compreensão cinética do fenômeno, velocidades específicas de crescimento foram calculadas para alguns dos experimentos e nenhuma expressão cinética foi sugerida.

A literatura não fornece dados suficientes que possibilitem uma comparação de resultados e parâmetros cinéticos. Nenhuma das referências encontradas estabelece a influencia do acúmulo intracelular de lipídeos no cálculo das diferentes velocidades e as implicações disso na descrição matemática do processo. As dificuldades estendem-se inclusive na comparação de parâmetros cinéticos, as diferentes formas de calculo encontradas podem levar a interpretações diferentes de um mesmo fenômeno, um caso particular foi evidenciado no calculo das velocidades de consumo de substrato, onde valores muito dissimiles foram encontrados utilizando diferentes métodos de calculo. O método logarítmico (GORGENS J.F., *et al.*, 2005), proposto como um método acurado para o calculo deste parâmetro não foi aplicável neste estudo devido à proximidade entre os valores calculados; contrário ao evidenciado nas cinéticas de consumo de xilose onde claramente existem diferenças nos coeficientes angulares da curva nas fases exponenciais de consumo.

5.3.3 Cultivo em biorreator

Cultivos sob condições limitantes de nitrogênio (C/N=50) foram realizados em biorreator de 2 L, os resultados da produção de biomassa total, lipídeos, consumo de xilose e nitrogênio amoniacal são apresentados na figura 5.4. O processo de acúmulo foi observado em todas as fases do crescimento, aumentando significativamente a

partir das 24 horas e sem atingir um valor de estabilidade no tempo de cultivo. Após uma fase *lag* de aproximadamente 12 horas, a biomassa total atingiu um valor máximo de 13.2 g/L em 56 horas de cultivo e o conteúdo de lipídeos foi de aproximadamente 30%, no mesmo período toda a xilose foi consumida (28 g/L). A fonte inorgânica de nitrogênio foi consumida em sua totalidade nas primeiras 36 horas.

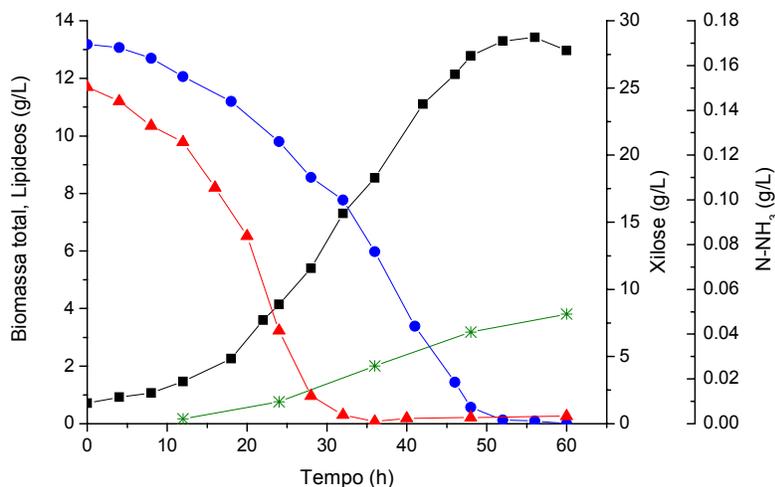


Figura 5.4: Cultivo em biorreator de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296
 ■ Biomassa total, * Lipídeos, ● Xilose, ▲ Nitrogênio amoniacal

O rendimento global lipídeos-substrato ($Y_{L/S}$) obtido foi de 0.14 g/g e a produtividade máxima de 0.064 g/L h. A velocidade máxima específica de crescimento foi calculada em 0.091 h⁻¹. Os resultados finais foram bastante próximos aos obtidos em frascos agitados, porém, uma redução no tempo de fermentação de 50 horas foi evidenciada. Uma elevada taxa de transferência de oxigênio obtida no biorreator pode justificar o aumento na velocidade do processo.

5.3.4. Desenvolvimento do modelo matemático

A descrição matemática do processo de crescimento e acúmulo de lipídeos em leveduras oleaginosas foi pouco explorada até hoje. Ykema propôs um primeiro modelo para *Apiotrichium curvatum* utilizando como parâmetro principal a relação C/N (YKEMA A., et al., 1986). Este modelo é limitado para o modo de operação

proposto pelos autores e não oferece informação sobre os valores das diferentes variáveis ao longo do tempo. Sattur e Karanth apresentaram maior aporte à modelagem do processo, tentando descrever os perfis cinéticos obtidos do cultivo de *Rhodotorula gracilis* CFR-1 (SATTUR A.P., KARANTH N.G., 1991a). A cinética de crescimento foi modelada utilizando o modelo logístico, o qual descreve o processo de crescimento como autocatalítico e de ordem zero para o substrato.

Para o processo de acúmulo Sattur e Karanth propuseram que a produção de lipídeo fosse mista, isto é associada e não-associada ao crescimento, utilizando um modelo do tipo Luederkin-Piret, o consumo da fonte de carbono foi calculado como uma função dependente do crescimento e da produção de lipídeos, usando os fatores de rendimentos como parâmetros da expressão. (SATTUR A.P., KARANTH N.G., 1991b)

Baseado nos modelos anteriores e nos dados experimentais, foi proposto um modelo para o cultivo em batelada simples utilizando a cinética de inibição de Mulchandani e o modelo de Luederkin-Piret para o substrato. Assume-se que a biomassa é formada por dois compostos, a biomassa ativa (R) e o lipídeo (P):

$$X = R + P \quad (\text{Eq. 5.4})$$

Para a biomassa ativa, a taxa de crescimento pode ser expressa como:

$$\frac{dR}{dt} = \mu R \quad (\text{Eq. 5.5})$$

Substituindo a expressão de Mulchandani na equação do crescimento tem-se que:

$$\frac{dR}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S} \left[1 - \left(\frac{S}{S_m} \right)^n \right] R \quad (\text{Eq. 5.6})$$

A produção de lipídeos descreve-se como associada e não-associada ao crescimento:

$$\frac{dP}{dt} = k_1 \frac{dR}{dt} + k_2 R \quad (\text{Eq. 5.7})$$

Devido a que nova biomassa ativa só será sintetizada enquanto nitrogênio estiver disponível, assim, todo o nitrogênio será consumido na fase exponencial de crescimento, isto é:

$$-\frac{dN}{dt} = k_3 \frac{dR}{dt} \quad (\text{Eq. 5.8})$$

O consumo de substrato pode ser consequência da síntese de biomassa ativa, produção de lipídeo e funções de manutenção da célula, o balanço de xilose então pode se descrever como:

$$-\frac{dS}{dt} = k_7 \frac{dR}{dt} + k_8 \frac{dP}{dt} + k_6 R \quad (\text{Eq. 5.9})$$

Substituindo a equação 5.7 em 5.9 e agrupando as constantes cinéticas em duas só, obtém-se:

$$-\frac{dS}{dt} = k_4 \frac{dR}{dt} + k_5 R \quad (\text{Eq. 5.10})$$

O sistema composto das equações 5.6, 5.7, 5.8 e 5.10 representa um modelo matemático não-estruturado simples para a cinética do cultivo em batelada simples de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296. O modelo foi resolvido tentando representar os dados experimentais obtidos para o cultivo em biorreator, assim, os valores iniciais alimentados no algoritmo de solução foram aqueles utilizados experimentalmente (Tabela 5.3).

Para resolver o sistema foi necessário estabelecer os valores de dois grupos de parâmetros, o primeiro envolvendo os correspondentes à expressão de crescimento (Eq. 5.6) provenientes dos estudos de inibição e o segundo referente às constantes cinéticas do modelo ($k_1 - k_5$). Na tabela 5.4 apresentam-se os valores dos parâmetros utilizados na simulação do modelo.

Tabela 5.3: Condições iniciais utilizadas na resolução do modelo matemático

Variável	Valor inicial (g/L)
R	0.671
P	0.0428*
N	0.148
S	28.24

*correspondente a um conteúdo de lipídeos de 6%

Tabela 5.4: Valores dos parâmetros cinéticos utilizados na resolução do modelo matemático

Constantes cinéticas	Valores para batelada simples *
$\mu_{max,cel}$	0.070 h ⁻¹
$\mu_{max,global}$	0.103 h ⁻¹
K_S	2.368 g/L
S_m	219.8 g/L
n	1.326
k_1	0.370 g _{lip} /g _{cel}
k_2	0.001 g _{lip} /g _{cel} h
k_3	0.016 g _N /g _{cel}
k_4	3.000 g _{xil} /g _{cel}
k_5	0.001 g _{xil} /g _{cel} h

*Os valores das constantes k_1 - k_5 não foram otimizados

Duas diferentes soluções foram obtidas diferindo estas no valor da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) utilizado. Uma primeira solução foi obtida utilizando a velocidade específica de crescimento determinada nos ensaios de inibição; definiu-se, então, este parâmetro como uma *velocidade específica máxima de crescimento global* já que foi determinado a partir dos perfis de biomassa total (célula + lipídeo). Os resultados desta primeira solução são apresentados na figura 5.5 como linhas descontínuas, observa-se que o modelo não representa adequadamente os

dados do biorreator, todas as curvas possuem velocidades superiores às encontradas experimentalmente o que evidencia um erro no valor da velocidade específica máxima.

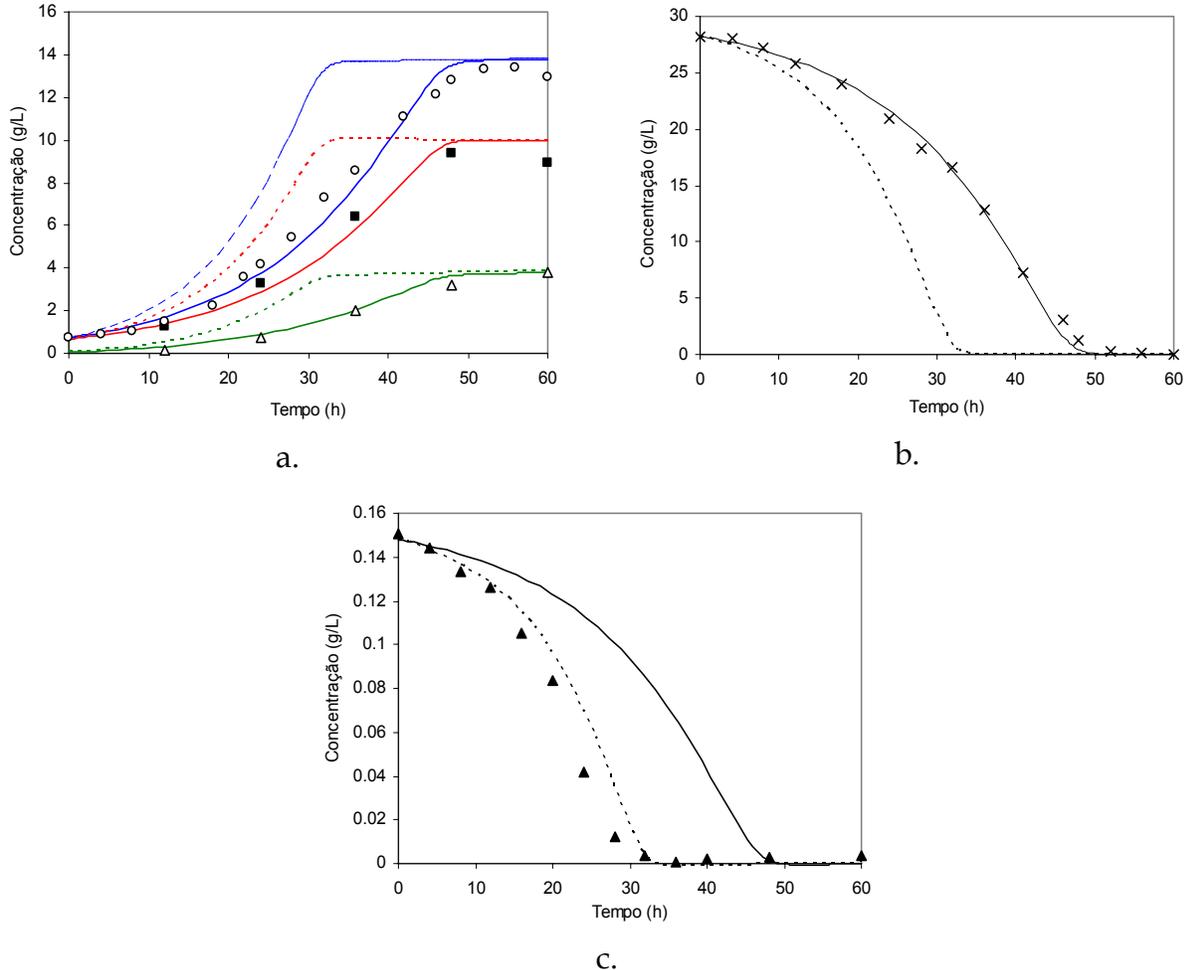


Figura 5.5: Comparação dos resultados simulados com o modelo matemático proposto e os dados experimentais obtidos em biorreator. As linhas descontínuas representam a simulação utilizando a μ_{\max} global, as contínuas utilizando a μ_{\max} celular $\circ, (-)$ biomassa total; $\blacksquare, (-)$ biomassa livre; $\triangle, (-)$ lipídeos; $\times, (-)$ xilose; $\blacktriangle, (-)$ N-NH₃

Conceitualmente, o valor da velocidade específica máxima de crescimento deve determinar-se a partir de dados que representem o comportamento da célula, isto é da biomassa cataliticamente ativa, devido a que não foi possível obter um crescimento sem acúmulo (mesmo utilizando um meio rico em nitrogênio) o valor determinado não pode ser utilizado na equação 5.6 já que esta equação representa só o crescimento celular.

Dos dados obtidos em biorreator foi calculado o valor da *velocidade específica máxima de crescimento celular* ajustando o modelo logístico aos dados de biomassa celular (biomassa total - lipídeos), este valor inserido no modelo produz uma nova solução, linhas contínuas da figura 5.5, que representa em boa proporção os dados experimentais. A solução para o nitrogênio (figura 5.5c) mostrou-se afastada dos valores medidos, isto pode ter como causa que a medição do nitrogênio foi parcial já que o nitrogênio orgânico não foi quantificado.

5.3.5 Composição dos lipídeos microbianos

O análise por cromatografia em camada delgada dos lipídeos produzidos permitiu estabelecer uma grande similaridade dos mesmos com os óleos vegetais. Na figura 5.6 observa-se que os lipídeos microbianos estão compostos em sua maioria por triglicerídeos e não apresentam quantidades apreciáveis de ácidos graxos livres. As bandas inferiores possuem similaridade com as apresentadas pelo óleo de soja, correspondendo estas possivelmente a mono e diglicerídeos. Não foram encontradas maiores diferenças entre os lipídeos produzidos em frascos agitados e em biorreator.

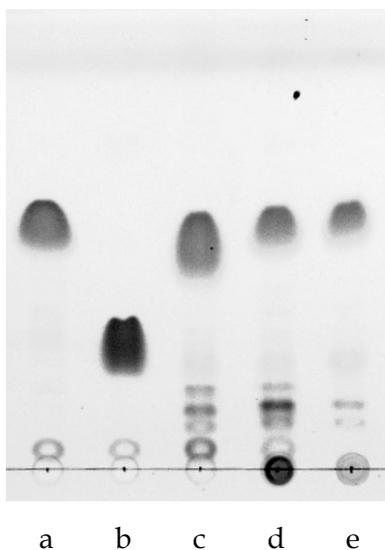


Figura 5.6: Análise dos lipídeos microbianos por CCD.
a. Trioleína, b. Ácido oléico, c. Óleo de soja,
d. Lipídeo microbiano biorreator, e. Lipídeo microbiano frasco agitado

Os lipídeos produzidos ao final da fermentação no biorreator foram derivatizados e analisados por cromatografia gasosa. O cromatograma (figura 5.7) apresentou excelente resolução e permitiu a identificação dos ácidos graxos da amostra, os lipídeos microbianos apresentaram majoritariamente cinco ácidos graxos, possuindo cadeias entre 14 e 18 carbonos e graus de insaturação baixos, o que é desejável para a aplicação deles na produção de biodiesel.

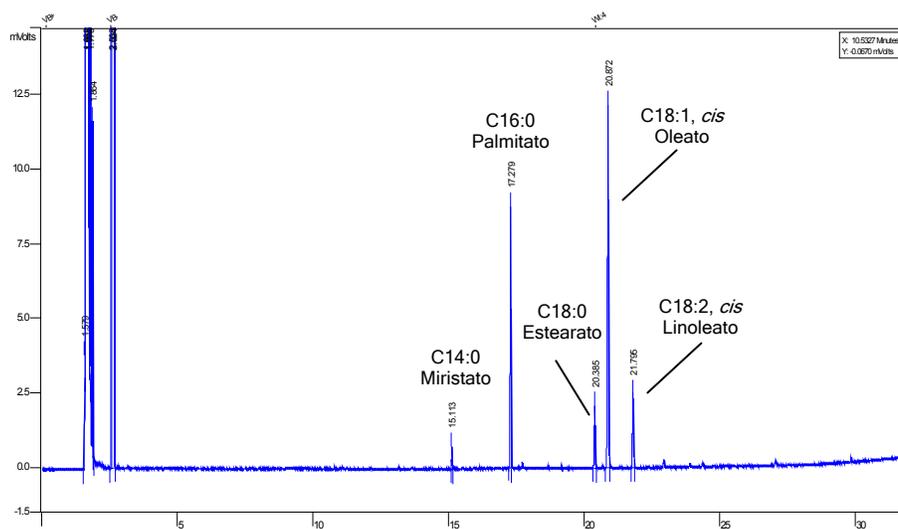


Figura 5.7: Cromatograma gasoso dos lipídeos microbianos produzidos por *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 em biorreator

O conteúdo relativo de ácidos graxos é apresentado na tabela 5.5 e é comparado com duas composições obtidas da literatura, os lipídeos produzidos pela linhagem escolhida são compostos principalmente de ácido oléico e palmítico, de acordo com os dados da literatura. Em comparação com a linhagem de *Lipomyces starkeyi* utilizada por Liu e Zhao, a utilizada neste estudo não apresentou ácido palmitoleico, mas mostrou um conteúdo maior de ácido linoléico.

Tabela 5.5: Comparação da composição dos ácidos graxos produzidos por *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 em biorreator com outros da literatura

Ácido graxo	(% , peso) [†]		
	<i>L. starkeyi</i> DSM 70296*	<i>L. starkeyi</i> ¹	<i>R. toruloides</i> ²
Mirístico (C14:0)	0.83	0.4	1.3
Palmítico (C16:0)	20.38	33.0	20.0
Palmitoleico (Δ^9 C16:1)	n.d. [†]	4.8	0.6
Esteárico (C18:0)	10.77	4.7	14.6
Oléico (Δ^9 C18:1, <i>cis</i>)	56.06	55.1	46.9
Linoléico ($\Delta^{9,12}$ C18:2, <i>cis</i>)	11.96	1.6	13.1
Linolênico ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3)	n.d.	n.d.	3.5

* Dados baseados em análise de CG

[†] Áreas de pico inferiores a 0.1% foram consideradas desprezíveis e são apresentadas como “não detectado”, (n.d.)

¹ Liu B., Zhao Z.K., 2007

² Li, *et al.*, 2007

Visando a aplicação dos lipídeos obtidos para a produção de biodiesel, foi estimado o valor cetano do biodiesel correspondente. Utilizando a equação de Klopfenstein (KRISNANGKURA K., 1986) para o cálculo deste parâmetro, foi estimado em 58.8 o valor cetano do biodiesel microbiano. Os valores mínimos admissíveis do valor cetano para biodiesel são de 47 segundo a ASTM D 6751 (USA), 49 pela DIN 51606 (Alemanha) e 51 pela EM 14214 (Organização europeia). Assim, o biodiesel produzido a partir dos lipídeos microbianos de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 atende as especificações internacionais para este combustível.

5.4 Conclusões

A linhagem *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 apresentou uma velocidade específica de crescimento máxima de 0.092 h⁻¹ utilizando uma concentração inicial de xilose de 30 g/L, efeitos inibitórios foram detectados para concentrações acima de 60 g/L.

A expressão de Mulchandani descreveu corretamente a cinética de inibição por substrato encontrada, com um coeficiente de correlação de 0.985. A concentração inibitória total encontrada pelo modelo foi de 219.8 g/L de xilose, bastante próxima à encontrada experimentalmente.

O cultivo em biorreator apresentou uma maior velocidade de crescimento (0.090 h^{-1}) em comparação às obtidas em frascos agitados em seções anteriores, reduzindo assim o tempo de fermentação e aumentando a produtividade.

O modelo não-estruturado desenvolvido para o cultivo em batelada representou adequadamente os perfis experimentais da maioria das variáveis de importância. No entanto é necessário rever a expressão que descreve o consumo de nitrogênio, já que somente foram utilizados os dados de nitrogênio amoniacal e não os totais. Além disto, o modelo deve ser validado em outras concentrações de xilose para podermos confirmar sua adequação.

A composição dos lipídeos produzidos, os quais apresentam baixa saturação e um valor cetano do biodiesel correspondente de 58.8, indica que pode ser obtido um biodiesel que satisfaça as especificações exigidas internacionalmente.

5.5 Referências bibliográficas

ALVAREZ A.F., ALVAREZ H.M., KALSCHUEER R., WALTERMANN M., STEINBUCHER A., Cloning and characterization of a gene involved in triacylglycerol biosynthesis and identification of additional homologous genes in the oleaginous bacterium *Rhodococcus opacus* PD630, *Microbiology*, 154, 2327-2335, 2008.

ANDREWS J.F., A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibiting substrates, *Biotechnology and Bioengineering*, 10, 707-723, 1968.

BLIGH E.G., DYER W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917, 1959.

BROWN A.M., A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet, *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 65, 191-200, 2001.

GORGENS J.F., VAN ZYL W.H., KNOETZE J.H., Reliability of methods for the determination of specific substrate consumption rates in batch culture, *Biochemical Engineering Journal*, 25, 109-112, 2005.

KHANNA S., SRIVASTAVA A.K., A simple structured mathematical model for biopolymer (PHB) production, *Biotechnology Progress*, 21, 830-838, 2005.

KRISNANGKURA K., A simple method for estimation of cetane index of vegetable oil methyl esters, *Journal of American Oil Chemists Society*, 63(4), 552-553, 1986.

LEWIS T., NICHOLS P.D., McMEEKIN T.A., Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs, *Journal of microbiological methods*, 43, 107-116, 2000.

LI Y., ZHAO Z.K., BAI F., High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture, *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 312-317, 2007.

LIU B., ZHAO Z.K., Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 775-780, 2007

LUONG J.H.T., Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 242-248, 1987

MANIRAKIZA P., COVACI A., SCHEPENS P., Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 93-100, 2001.

MONOD J., The growth of bacterial cultures, *Annual Reviews of Microbiology*, 3, 371-394, 1949.

MULCHANDANI A., LUONG J.H.T., GROOM C., Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 11-17, 1989.

SATTUR A.P., KARANTH N.G., Mathematical modeling of production of lipids, Part I: Kinetics of biomass growth, *Bioprocess Engineering*, 6 (5), 227-234, 1991a.

SATTUR A.P., KARANTH N.G., Mathematical modeling of production of lipids, Part II: Kinetics of lipid accumulation, *Bioprocess Engineering*, 6 (6), 241-248, 1991b.

SRIENC F., ARNOLD B., BAILEY J.E., Characterization of intracellular accumulation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry, *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 982-987, 1984

WEATHERBURN M.W., Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Analytical Chemistry*, 39 (8), 971-974, 1967.

YKEMA A., VERBREE C., VAN VERSEVELD H.W., SMIT H., Mathematical modeling of lipid production by oleaginous yeast in continuous cultures, *Antonie van Leeuwenhoek*, 52, 491-506, 1986

PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS MICROBIANOS EM BATELADA ALIMENTADA E pH/AUXOSTAT

6.1 Resumo

Neste capítulo foram desenvolvidos estudos de produção de lipídeos microbianos utilizando duas estratégias de batelada alimentada descontínua. Em um primeiro processo iniciou-se com uma batelada simples limitada por nitrogênio seguido de alimentação de xilose; como segunda estratégia foi desenvolvido um processo duplo de alimentação, nitrogênio foi alimentado na primeira fase do cultivo mediante um pH-amônio/auxostat e logo depois foi alimentada xilose na segunda fase do cultivo. Os resultados mostraram que a primeira estratégia apresentou uma concentração final de biomassa de 46.7 g/L com um conteúdo de lipídeos de 45.7%, obtendo-se uma produtividade final de lipídeos de 0.17 g/L h e um rendimento de 0.14 g/g, superiores aos encontrados na estratégia dupla de alimentação. Não obstante, concentrações celulares duas vezes maiores foram obtidas no segundo modo de operação quando comparado com o de alimentação simples, indicando o potencial deste processo em ensaios com um maior número de alimentações. A composição dos lipídeos obtidos é similar à dos óleos vegetais permitindo assim sua aplicação na produção de biodiesel.

6.2 Materiais e métodos

6.2.1 Microrganismo

A levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 foi utilizada em todos os experimentos. O microrganismo foi preservado a -80°C em criovial com 10% de glicerol como descrito na seção 3.2.1.

6.2.2 Meios de cultivo

Em todos os ensaios foi utilizado o meio de fermentação descrito na seção 3.2.2, A preparação do biorreator tais como esterilização, ajuste do pH e preparo do inoculo foram realizadas segundo o estabelecido na seção 5.2.2.

6.2.3 Experimentos em batelada alimentada

Os ensaios foram feitos em um biorreator de 3 L BioFlo III (New Brunswick Scientific-Edison N.J. U.S.A.). O controle e a aquisição de dados do biorreator foi feita mediante o pacote computacional *Foxylogic* de distribuição livre (ANDERSEN M.H., 2008). O volume total de trabalho utilizado foi de 2 L, iniciando-se com 1.8 L de meio e adicionando-se 200 mL de inóculo.

Foram realizados quatro experimentos em batelada alimentada estando divididos em duas fases, primeiramente o cultivo foi conduzido em batelada simples até que a fonte de carbono fosse exaurida, na segunda fase foram feitas alimentações de uma solução de 600 g/L de xilose quando os níveis de oxigênio dissolvido atingirem níveis próximos ao inicial, indicando uma redução na atividade metabólica.

Nos ensaios FB1 e FB2 o pH foi controlado nas duas fases do cultivo utilizando uma solução de NaOH. Nos experimentos FB3 e FB4 o pH na primeira fase foi controlado com uma solução de NH_4OH induzindo o processo de crescimento celular ao manter níveis elevados de nitrogênio (relações C/N baixas), na segunda fase a

solução de controle de pH foi alternada para NaOH, suspendendo a alimentação de nitrogênio (relações C/N elevadas) e estimulando o acúmulo de lipídeos. A influência de outros parâmetros de operação como a concentração de xilose e o nível oxigênio dissolvido (O.D.) também foi testada. A descrição detalhada das condições de operação utilizadas em cada experimento é apresentada na tabela 6.1.

Tabela 6.1: Condições de operação para os experimentos de produção de lipídeos em batelada alimentada

Parâmetro	FB1	FB2	FB3	FB4
Concentração inicial de xilose (g/L)	30	60	60	60
Relação C/N (g/g)	50	50	50	50
Agitação (rpm)	400	Automática (400-600)	Automática (400-600)	Automática (400-600)
Aeração (vvm)	1.0	1.0 (O.D. 20%)	1.0 (O.D. 20%)	1.0 (O.D. \geq 50%)
Controle pH (pH inicial 5.5)	NaOH 2M	NaOH 2M	NH ₄ OH (5%) NaOH 2M	NH ₄ OH (15%) NaOH 2M
Alimentações	2 (até 15 g/L)	3 (até 30 g/L)	3 (até 30 g/L)	3 (até 30 g/L)

Nos experimentos FB2-4 a agitação foi controlada automaticamente segundo o nível de oxigênio dissolvido estabelecido. O fermentador foi amostrado assepticamente em espaços regulares de tempo para análise de biomassa seca, concentração de células, consumo de substrato, consumo de nitrogênio e produção de lipídeos. Os cultivos foram suspensos quando atingida a fase estacionária na última alimentação, aproximadamente entre 120 e 150 horas de fermentação.

6.2.4 Metodologia analítica

As determinações de biomassa seca, xilose, nitrogênio amoniacal, lipídeos totais e composição dos mesmos foram realizadas segundo o descrito na seção 5.2.4.

A determinação da concentração celular (células/mL) foi feita utilizando uma câmara de Neubauer melhorada (Laboroptik, Alemanha) de 0.1 mm de profundidade. A contagem foi feita em duplicata para cada amostra analisada e seguindo as instruções do fabricante.

6.2.5 Calculo de parâmetros

Os rendimentos lipídeo-substrato e biomassa livre - lipídeo, assim como a produtividade dos ensaios foram determinados da maneira usual, como descrito nas seções anteriores.

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Cultivos em batelada alimentada

Procurando níveis de acúmulo de lipídeos superiores aos obtidos nos experimentos realizados em biorreator em batelada simples (seção 5.3.3), foram realizados dois experimentos nos quais alimentou-se xilose após o termino da primeira fase do cultivo (batelada simples). O ensaio FB1 foi iniciado utilizando as mesmas condições do cultivo em biorreator estabelecidas no capítulo anterior. Na figura 6.1 apresentam-se os perfis de concentração das variáveis medidas no decorrer da fermentação.

Na primeira fase do cultivo atingiram-se os níveis de acúmulo e concentração de biomassa comparáveis aos obtidos no capítulo 5, às 60 horas de fermentação a concentração de biomassa total apresentou um valor de 12.3 g/L com um conteúdo de lipídeos de 24.1% (figura 6.1a), os níveis de nitrogênio $N-NH_3$ caíram rapidamente durante a fase exponencial de crescimento até níveis próximos de zero nas primeiras 40 horas, mantendo estes valores até o final da fermentação.

A contagem de células realizada permitiu estabelecer que no final do cultivo em batelada foi atingida uma concentração celular de 273×10^6 células/mL (figura 6.1b), valor superior, porém na mesma ordem ao reportado na literatura para outra linhagem de *Lipomyces starkeyi* cultivada em 3% de glicose (USUKA Y., *et al*, 1974). O perfil de oxigênio (figura 6.1c) possui uma forte correspondência ao perfil de crescimento nesta fase do cultivo, durante as primeiras 20 horas o consumo de oxigênio apresentou uma velocidade baixa, seguida de uma forte aceleração até as 45 horas atingindo um mínimo de 20% de saturação, na fase estacionaria o oxigênio dissolvido recuperou-se rapidamente indicando um cese na atividade metabólica. Um perfil similar já foi reportado (USUKA Y., *et al*, 1985). A resposta deste parâmetro, junto com sua medição em tempo real, permitiram sua utilização como variável de controle para a alimentação da xilose.

Na segunda fase do cultivo FB1, foi alimentada xilose nas 64 e 88 horas de cultivo (Figura 6.1a) atingindo concentrações de 16 e 15 g/L respectivamente; sendo esta totalmente consumida em cada etapa. Pode se observar que nesta etapa o conteúdo de lipídeos incrementou-se significativamente, quase duplicando seu valor inicial, e atingindo 0 42.5% correspondente a uma concentração final de lipídeos próxima a 9 g/L.

Durante a segunda etapa, a concentração celular permaneceu num patamar, cuja media foi de 276×10^6 células/mL e com níveis mínimos de nitrogênio (Figura 6.1b), isto significa que a xilose alimentada não foi utilizada pela célula para se multiplicar, mas sim para a síntese de lipídeos e para funções de manutenção.

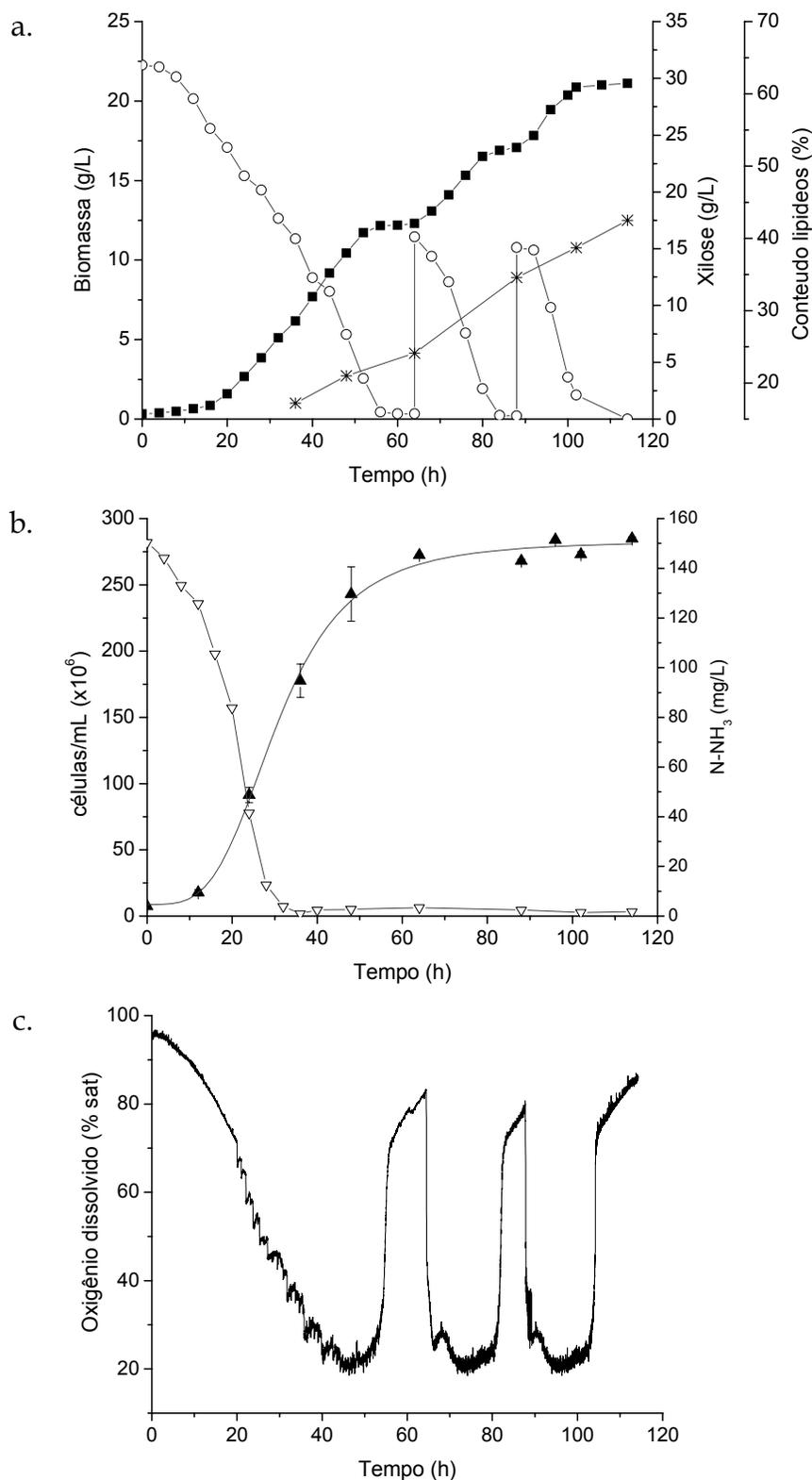


Figura 6.1: Perfis de concentração para o cultivo em batelada alimentada FB1.

a. Biomassa total (■), xilose (○), conteúdo de lipídeos (*)

b. Concentração celular (▲), nitrogênio amoniacal (▽)

c. Oxigênio dissolvido (-)

Os níveis de oxigênio nas alimentações tiveram um comportamento similar ao apresentado na etapa em batelada simples, atingindo níveis mínimos de 20% de saturação e voltando a valores elevados no final de cada alimentação (Figura 6.1c). A duração de cada alimentação foi de 24 horas sendo a duração total do ensaio de 114 horas.

Para o segundo ensaio em batelada alimentada sem alimentação de nitrogênio (FB2), a concentração inicial de xilose foi aumentada para 60 g/L, isto como resultado do análise feito nos estudos de inibição. Ensaio preliminares revelaram que, utilizando esta concentração e mantendo a agitação e a aeração nos níveis fixados em FB1, o cultivo rapidamente atingiria níveis mínimos (0% sat) de oxigênio dissolvido; decidiu-se utilizar a estratégia de controle em cascata fornecida pelo programa de controle para manter a concentração de oxigênio dissolvido em um valor de 20% de saturação mudando automaticamente a agitação dentro de uma faixa de 400 a 600 rpm. A vazão de ar foi mantida em 1 vvm dependendo assim os níveis de oxigênio da agitação utilizada.

Na figura 6.2 apresentam-se os perfis de comportamento cinético para o experimento FB2, a duração da primeira fase em batelada simples incrementou-se em 6 horas, comprovando assim que a velocidade de crescimento manteve-se em níveis elevados, sem apresentar efeitos inibitórios significativos.

No final da batelada simples do experimento FB2, foi atingida uma concentração de biomassa total de 25.7 g/L, sendo este valor o dobro do obtido no ensaio FB1, o conteúdo de lipídeos foi levemente superior correspondendo este a uma concentração de lipídeos de 8.23 g/L (Figura 6.2a), quase o total dos lipídeos produzidos no final das alimentações do ensaio FB1. Mantiveram-se conversões totais de xilose e nitrogênio amoniacal, duplicou-se também a concentração celular alcançando valores de 530×10^6 células/mL nas 70 horas de cultivo (Figura 6.2b). Nas 30 horas de cultivo o oxigênio dissolvido atingiu valores inferiores de 20% de

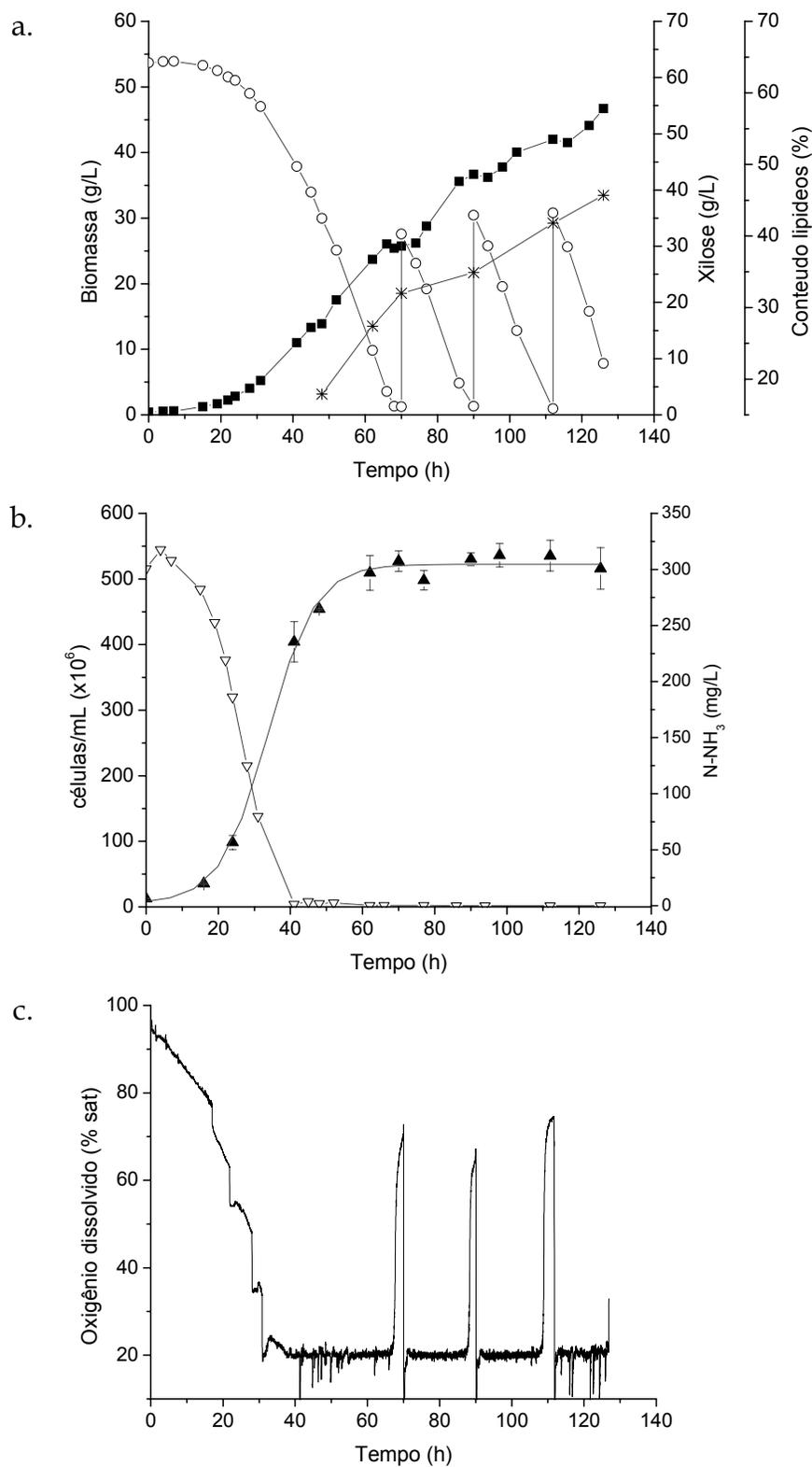


Figura 6.2: Perfis de concentração para o cultivo em batelada alimentada FB2.

a. Biomassa total (■), xilose (○), conteúdo de lipídeos (*)

b. Concentração celular (▲), nitrogênio amoniacal (▽)

c. Oxigênio dissolvido (-)

saturação (Figura 6.2c), ativando-se o sistema de controle e mantendo efetivamente este valor controlando a agitação na faixa de 450 a 470 rpm.

Três alimentações de xilose foram feitas na segunda fase do cultivo, atingindo uma concentração de aproximadamente 30 g/L em cada uma (Figura 6.2a). No final da fermentação obteve-se uma biomassa total de 47 g/L e um nível de acúmulo de 45.7% correspondente a uma concentração de lipídeos de 21.3 g/L. A concentração celular nesta fase de acúmulo manteve-se estável em um valor médio de 524×10^6 células/mL (Figura 6.2b) indicando que nesta fase o aumento da biomassa total foi consequência da síntese e acúmulo de lipídeos.

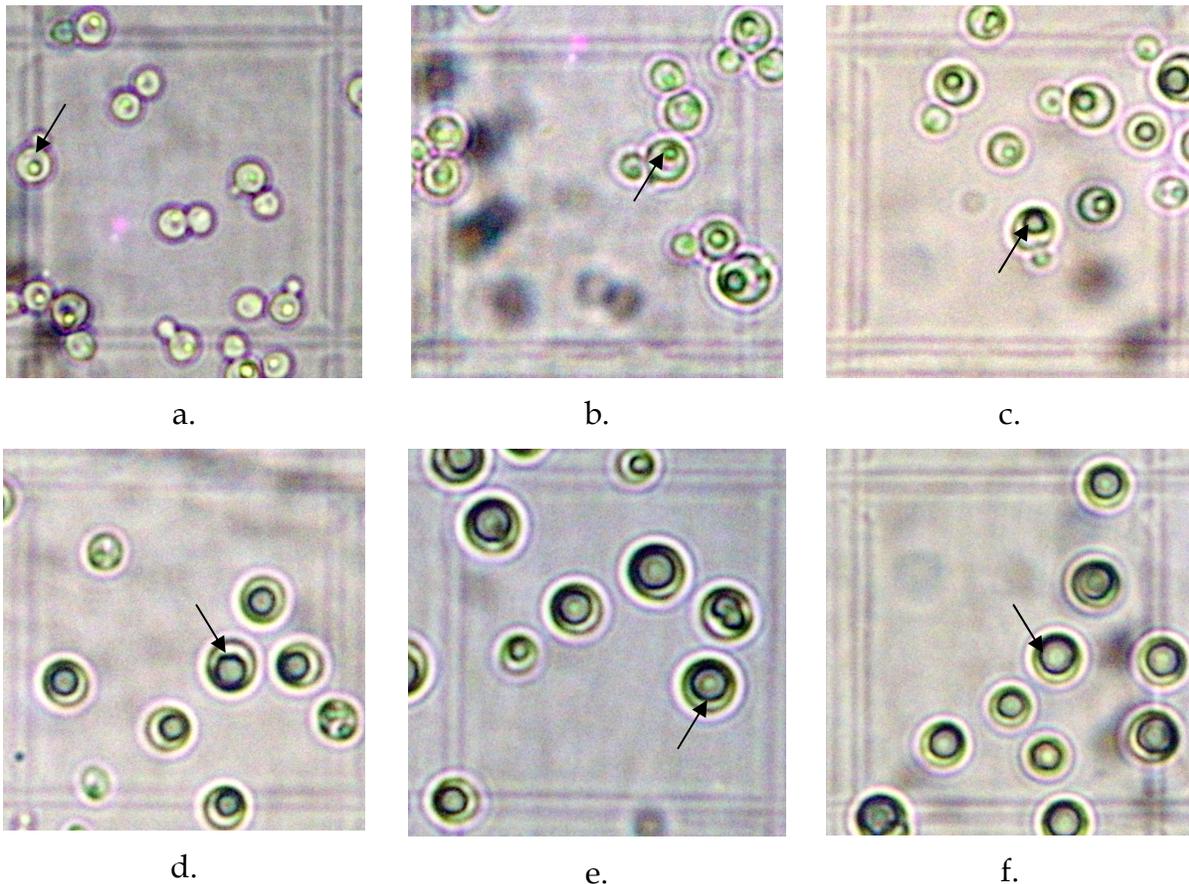


Figura 6.3: Micrografias do processo de acúmulo de lipídeos durante o cultivo em batelada alimentada FB2. O quadrado no fundo de cada micrografia possui uma largura de 50 μm . A seta indica a inclusão lipídica dentro da célula.
a. 0 h, b. 24 h, c. 48 h, d. 72 h, e. 96 h, f. 120 h.

Durante este ensaio o processo de síntese e armazenamento intracelular dos lipídeos foi registrado mediante micrografias cada 24 horas, na figura 6.3 apresenta-se a seqüência deste processo. No início da fermentação, as células de *Lipomyces starkeyi* apresentaram um tamanho médio (diâmetro) de 5 μm e uma inclusão lipídica apenas perceptível, após dois dias de cultivo o tamanho das células aumentou até 6.2 μm e os lipídeos tornaram-se facilmente visíveis em todas as células; observou-se também durante este período uma alta taxa de divisão celular evidenciada pela presença de brotes ainda aderidos nas células. Das 48 às 72 horas houve um aumento importante no tamanho celular médio atingindo um valor de 7.6 μm junto com um aumento do tamanho da inclusão. Nas ultimas 48 horas evidenciou-se que as células chegaram num tamanho máximo de 10 μm , outras células menores que ainda não apresentavam este tamanho também começaram um aumento do diâmetro.

6.3.2 Cultivos com alimentação de nitrogênio (pH-amonio/auxostat) e alimentação de carbono

Os resultados descritos anteriormente mostraram que o processo de acúmulo acontece com maior velocidade na segunda etapa do cultivo, onde existe uma limitação muito forte de nitrogênio e alta disponibilidade de fonte de carbono. Isto permitiu estabelecer conceitualmente um processo de dupla alimentação, no qual primeiramente é alimentado nitrogênio para estimular a divisão celular, em uma segunda etapa é fornecida ao meio fonte de carbono, elevando as relações C/N e induzindo a produção de lipídeos. Este processo foi executado nos ensaios FB3 e FB4 utilizando a estratégia de pH-amonio/auxostat na primeira etapa (batelada simples) seguida de alimentação de carbono como realizado nos ensaios anteriores.

O experimento FB3 mostrou na primeira etapa do processo um comportamento similar ao correspondente no experimento FB2 (Figura 6.4a), porém a velocidade de crescimento apresentada nesta etapa foi inferior o que foi evidenciado num aumento de 20 horas na duração desta fase. A biomassa máxima atingida foi de

24 g/L e um conteúdo de lipídeos de 28%. A concentração celular final desta etapa foi inferior chegando a 400×10^6 células/mL (Figura 6.4b), esta queda pode atribuir-se a que níveis de nitrogênio amoniacal de 500 mg/L podem ser inibitórios para a linhagem.

Na segunda fase do cultivo, o processo de acúmulo apresentou uma velocidade menor à apresentada nos experimentos anteriores, o aumento na biomassa total apresentado nesta fase foi devido a um fenômeno conjunto de crescimento e acúmulo, o crescimento teve predominância nas duas primeiras alimentações e a síntese de lipídeos só na terceira alimentação, quando a relação C/N tornou-se favorável (Figuras 6.4a,b). A concentrações celular final de 570×10^6 células/mL foi levemente superior à atingida no ensaio FB2, o conteúdo de lipídeos final de 38% foi inferior. O perfil de oxigênio dissolvido (Figura 6.4c) foi similar ao obtido no ensaio FB2, não entanto a velocidade de consumo na primeira fase foi menor, chegando ao nível mínimo só no final da mesma, indicando assim uma atividade metabólica menos intensa quando comparada com o ensaio FB2.

No ensaio FB4 outras condições experimentais do pH-amônio/auxostat foram testadas, tentando diminuir o volume de hidróxido de amônia utilizado para a correção do pH, a concentração deste foi aumentado para 15%; os níveis de oxigênio dissolvido foram mantidos em aproximadamente 50%, tentando aumentar a velocidade de consumo de nitrogênio para entrar mais rapidamente na fase de acúmulo. Problemas no eletrodo polarográfico (calibração, entupimento da membrana por adesão celular) não permitiram o controle preciso obtido nos experimentos anteriores.

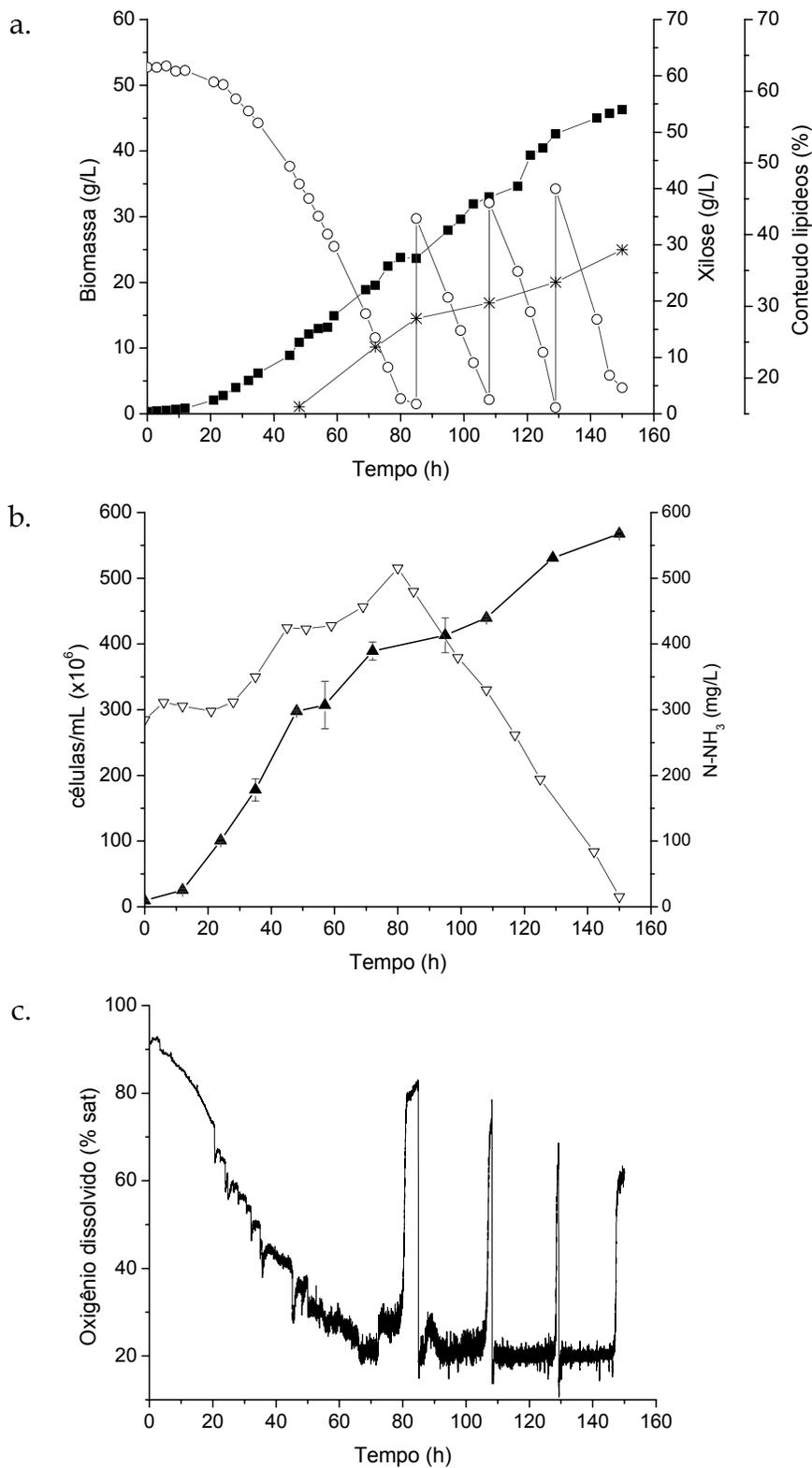


Figura 6.4: Perfis de concentração para o cultivo em batelada alimentada FB3.

a. Biomassa total (■), xilose (○), conteúdo de lipídeos (*)

b. Concentração celular (▲), nitrogênio amoniacal (▽)

c. Oxigênio dissolvido (-)

A primeira fase do experimento FB4 decorreu de maneira similar à correspondente no experimento FB3 (Figura 6.5), as concentrações de biomassa total, células e nitrogênio amoniacal tiveram valores semelhantes, a xilose foi totalmente consumida nas 74 horas de duração desta etapa. Obteve-se um acúmulo de lipídeos no fim desta etapa de 24.4% correspondendo a uma concentração de 6.1 g/L.

Na segunda fase do cultivo, foi retirada a alimentação de nitrogênio e alimentada xilose em três oportunidades, na figura 6.5a observa-se um aumento rápido da biomassa total após as 78 horas, não obstante o conteúdo de lipídeos cresceu lentamente até um valor máximo de 28% nas 101 horas, mantendo-se relativamente constante até o final do experimento.

Os perfis de biomassa total e de conteúdo de lipídeos indicaram que, nestas novas condições experimentais, o carbono alimentado gerou biomassa livre e não lipídeos, isto é confirmado na figura 6.4b onde observa-se um aumento significativo da concentração celular, atingindo valores máximos de 1100×10^6 células/mL, duplicando assim os níveis alcançados em experimentos anteriores. A junção de dois fatores, baixas relações C/N e alta concentração de oxigênio dissolvido, aparentemente estimularam o processo de duplicação celular.

A utilização de uma solução de maior concentração de hidróxido de amônia não modificou de maneira importante o perfil de concentração de nitrogênio amoniacal (figura 6.4b), devido a que esta depende da queda do pH produzida. Foi requerida menos quantidade de solução para o controle de pH, porém devem ser utilizadas tubulações menores para permitir uma alimentação mais precisa.

O perfil de oxigênio dissolvido (figura 6.4c) apresentou um comportamento instável durante a segunda fase do cultivo, observaram-se faixas de estabilização diferentes em cada alimentação, mas afastadas do valor desejado. Ainda assim, foi mantido um nível de oxigênio superior ao utilizado nos experimentos anteriores.

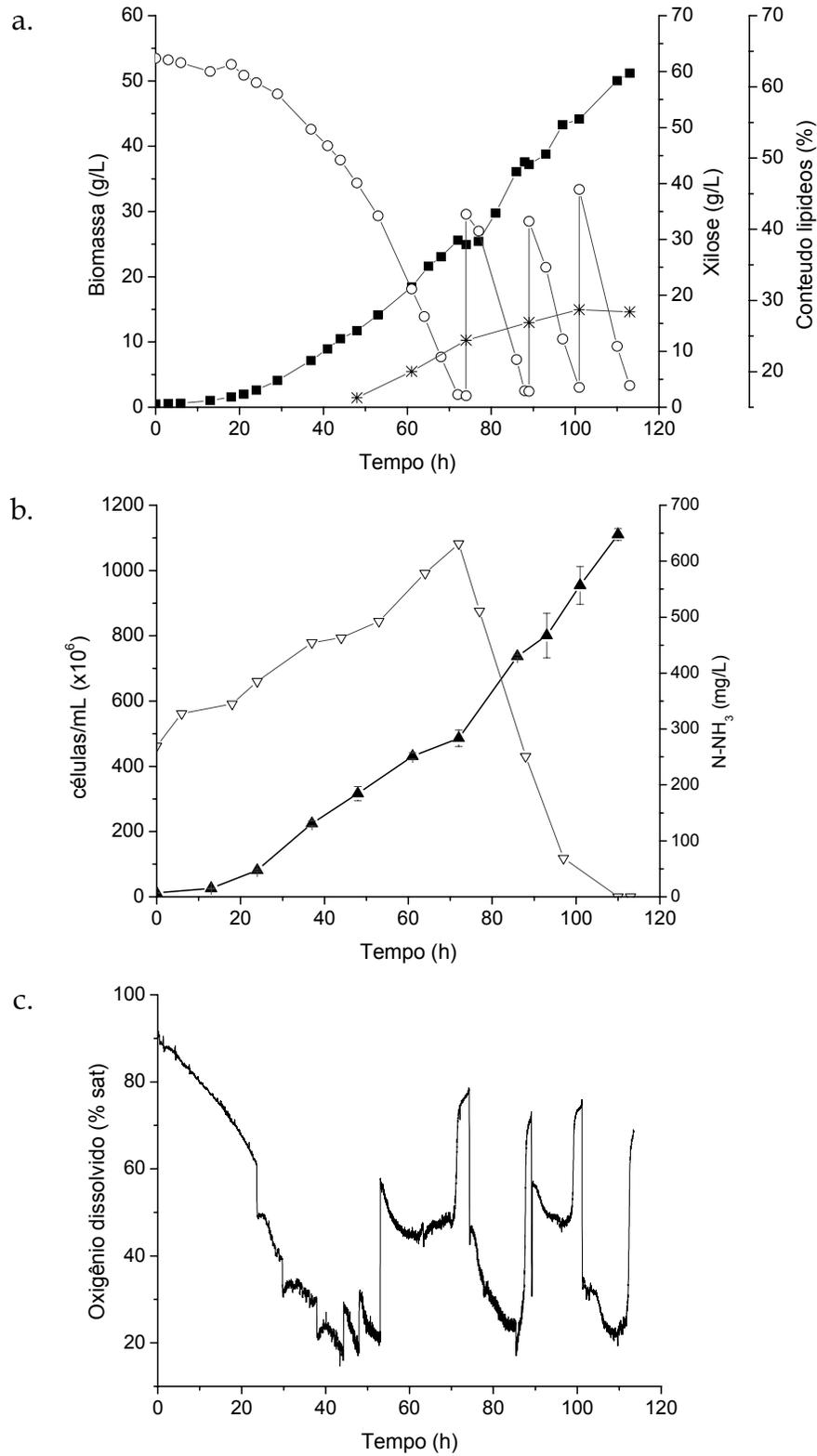


Figura 6.5: Perfis de concentração para o cultivo em batelada alimentada FB4.

a. Biomassa total (■), xilose (○), conteúdo de lipídeos (*)

b. Concentração celular (▲), nitrogênio amoniacal (▽)

c. Oxigênio dissolvido (-)

6.3.3 Análise da utilização do substrato

Anteriormente foi estabelecido que na segunda fase dos experimentos, onde alimentou-se xilose em duas (FB1) ou três (FB 2, 3 e 4) oportunidades, a síntese de nova biomassa diminui e o carbono é direcionado para a síntese de lipídeos. Os parâmetros de rendimento biomassa livre a substrato ($Y_{X \text{ livre}/S}$) e lipídeo a substrato ($Y_{L/S}$) permitem avaliar quantitativamente a eficiência da utilização da xilose na síntese destes dois produtos.

A figura 6.6 mostra a evolução do valor do rendimento de biomassa livre em cada etapa dos experimentos, durante a batelada inicial o valor deste parâmetro foi o maior atingido em todos os experimentos, com um valor médio de 0.30 g/g. Como era de se esperar, nas alimentações subsequentes o valor deste parâmetro foi menor, chegando a níveis mínimos na segunda ou terceira alimentação (experimentos FB1, 2 e 3); no experimento FB4 o rendimento de biomassa livre não apresentou uma queda forte nas últimas duas alimentações, o que pode ser explicado pela alta proliferação celular que foi observada neste período.

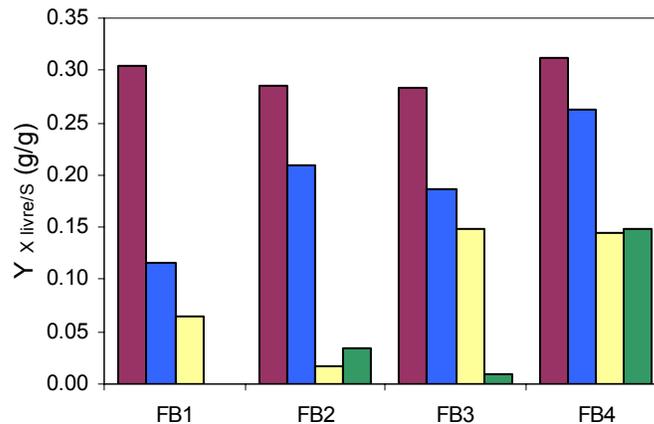


Figura 6.6: Evolução do rendimento biomassa livre/substrato em cada etapa de alimentação Batelada inicial (■), 1ª alimentação (■), 2ª alimentação (■), 3ª alimentação (■) (valores não cumulativos)

É importante evidenciar que o processo de suspensão da síntese celular não acontece imediatamente no começo da fase de alimentação de carbono, por exemplo no experimento FB2, na primeira alimentação o rendimento de biomassa livre foi reduzido só em um 20%, já na terceira alimentação houve uma redução de 88% em comparação ao obtido na batelada inicial. Este tipo de mudanças no metabolismo, passar de um regime de crescimento a um de síntese de lipídeos, podem não ser tão rápidas devido a que a maquinaria enzimática envolvida é muito grande; ao cair os níveis de nitrogênio também os níveis de AMP, é produzida então uma diminuição e inclusive o cese da atividade da enzima isocitrato desidrogenase, isto leva à acumulação de citrato, primeiro passo na cascata de eventos no processo de síntese de lipídeos (RATLEDGE C., 2002).

O rendimento lipídeo-substrato também foi analisado em cada etapa de alimentação, na figura 6.7 apresenta-se em conjunto os valores deste parâmetro para cada experimento. No ensaio FB1 observou-se a tendência esperada, após um rendimento baixo na batelada inicial o rendimento incrementou-se substancialmente nas duas alimentações, chegando a dobrar o valor na última delas.

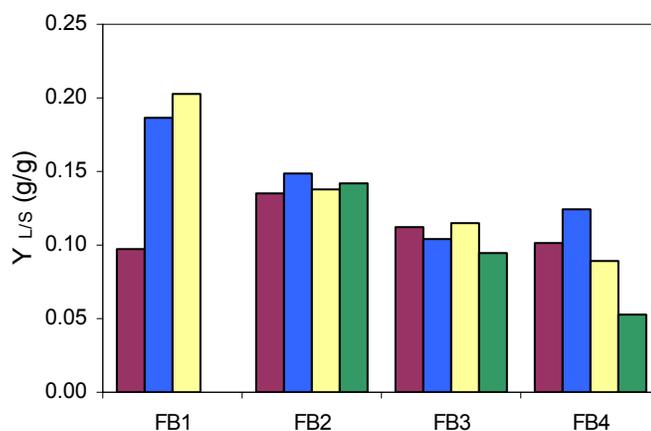


Figura 6.7: Evolução do rendimento lipídeo/substrato em cada etapa de alimentação
 Batelada inicial (■), 1ª alimentação (■), 2ª alimentação (■), 3ª alimentação (■)
 (valores não cumulativos)

No ensaio FB1 foram obtidos os maiores rendimentos individuais de lipídeos, atingindo um valor 0.20 g/g, sendo este o valor máximo prático atingível

(RATLEDGE C., 1991). O comportamento observado indica que o fluxo de carbono foi direcionado para a síntese de lipídeos na segunda fase de cultivo, aumentando-se assim a eficiência global do processo.

Nos outros experimentos a tendência observada foi diferente, nos ensaios FB2 e FB3 o rendimento lipídeo - substrato manteve-se num valor médio de 0.14 g/g e 0.11 g/g respectivamente. O valor médio calculado para FB2 foi maior ao obtido para FB3, isto devido provavelmente à maior limitação por nitrogênio à que foi exposto o microrganismo neste ensaio, em FB3 a síntese de biomassa continuou até a segunda alimentação impedindo um aproveitamento do carbono na síntese de lipídeos.

Não obstante, mesmo sob uma forte limitação de nitrogênio, o rendimento de lipídeos não se incrementou nas alimentações como aconteceu no ensaio FB1; partindo do fato que a xilose foi consumida totalmente é possível afirmar que houve um direcionamento do carbono para outras funções celulares, sendo estas a síntese de outros produtos ou manutenção celular. Uma possível hipótese que tente descrever a causa deste comportamento pode basear-se nos níveis de oxigênio utilizados, devido à maior concentração celular obtida em comparação com o ensaio FB1, níveis de oxigênio dissolvido de 20% de saturação podem não ser suficientes para fornecer as necessidades da linhagem. Sob condições limitantes de nitrogênio, outra espécie de levedura oleaginosa também de metabolismo aeróbico rigoroso aumentou a produção de lipídeos quando foram incrementados os níveis de oxigênio dissolvido (CHOI S.Y., *et al.* 1982).

Durante o ensaio FB4 tanto os níveis de oxigênio como de nitrogênio foram mantidos em níveis elevados na segunda fase do cultivo, pelo que uma diminuição do rendimento de produção de lipídeos foi observada, em concordância com a síntese de biomassa observada (Figura 6.6)

6.3.4 Composição dos lipídeos

Foi observado que a composição dos lipídeos produzidos mudava durante o decorrer da fermentação. Para o experimento FB2 as maiores mudanças na composição ocorreram na fase de cultivo em batelada (figura 6.8) onde o teor de ácido oléico passou de um mínimo de 34.8% nas 24 horas até 44.1% nas 90 horas, o ácido linoléico apresentou uma diminuição relativa de 82% no mesmo intervalo de tempo. O ácido esteárico apresentou um nível máximo de 15.5% nas 48 horas de cultivo, os outros ácidos presentes mantiveram-se relativamente constantes durante esta fase do cultivo. Estas mudanças na composição foram encontradas também para *Cryptococcus curvatus* cultivado também sob condições limitantes de nitrogênio (HASSAN M., *et al.*, 1996); o fungo *Cunninghamella echinulata* apresentou também um comportamento similar quando cultivado em condições limitantes similares, não assim *Mortierella isabellina* cuja composição manteve-se estável nas 170 horas de cultivo. Nestes dois fungos grandes teores de ácidos graxos poliinsaturados foram encontrados (PAPANOKOLAU S., *et al.*, 2007).

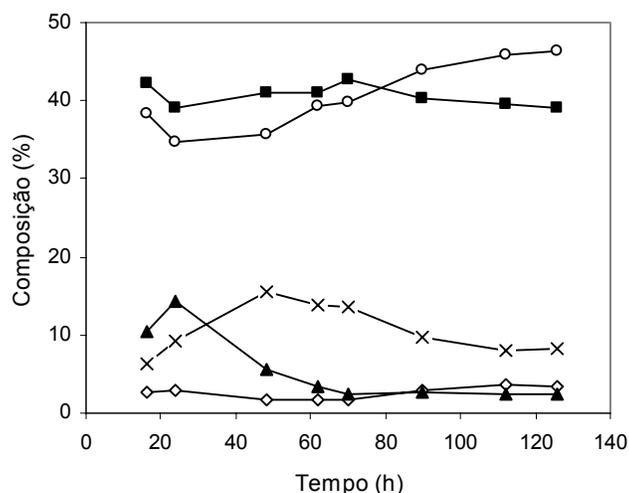


Figura 6.8: Perfis de concentração de ácidos graxos dos lipídeos produzidos no experimento FB2. C16:0 (■), Δ^9 C16:1 (\diamond), C18:0 (×), Δ^9 C18:1, cis (○), $\Delta^9,12$ C18:2, cis (▲)

Durante a segunda fase de cultivo, continuo-se a comportamento apresentado nas ultimas horas do cultivo em batelada, com uma tendência à estabilização da

composição no final do experimento, a diminuição do teor de ácido linoléico apresentada é desejada visando a utilização destes lipídeos como biodiesel, já que o combustível correspondente manteria valores elevados do número de cetano. Nas 126 horas a composição de ácidos graxos dos lipídeos produzidos foi de 0.43% de ácido mirístico, 39.17% de ácido palmítico, 3.41% de ácido palmitoleico, 8.24% de ácido esteárico, 46.34% de ácido oléico e 2.41% de ácido linoléico. Esta composição final é similar à apresentada por *Lipomyces starkeyi* AS 2.1560 quando cultivada numa mistura de glicose e xilose (ZHAO X., *et al.*, 2008), em contraste, *Lipomyces starkeyi* DSM 70295 cultivada a 30°C em um meio complexo (*Worth broth*) apresentou teores elevados de ácido linoléico (28.1%) (SUUTARI M., *et al.*, 1996) não observados em outros gêneros de leveduras oleaginosas.

6.3.5 Resultados finais

Dos resultados apresentados até agora foi possível estabelecer que as alimentações feitas geraram um acúmulo de lipídeos superior ao obtido em ensaios de batelada simples, não obstante este modo de operação supõe uma maior duração do processo. Para avaliar objetivamente o efeito benéfico das alimentações na produção de lipídeos foi calculada a produtividade global do processo em função do tempo de processo (figura 6.9), o tempo foi adimensionalizado para permitir uma melhor comparação de processos com diferente duração; o ensaio FB4 não foi incluído na análise devido que os dados de produtividade mostraram um comportamento atípico, possivelmente pela instabilidade do oxigênio dissolvido.

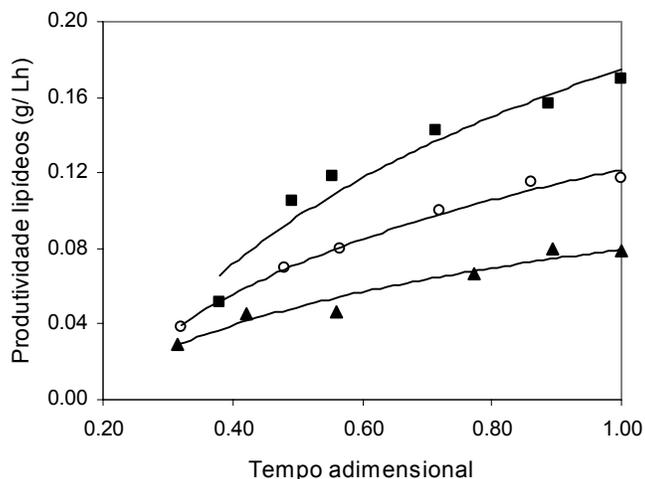


Figura 6.9: Produtividade da produção de lipídeos no decorrer das fermentações.

FB1 (▲), FB2 (■), FB3 (○)

A produtividade dos três processos aumentou com cada alimentação feita, mantendo-se uma tendência crescente, a concavidade das curvas indica que se o processo de alimentação continuasse produtividades maiores serão obtidas até atingir um máximo, após do qual a alimentação de substrato não produziria ganhos na produtividade. As células possuem um limite de armazenamento intracelular pelo que é possível prever um máximo de produtividade. Experimentos de maior duração são necessários para demonstrar esta hipótese.

O experimento FB2 apresentou a maior produtividade, sendo esta de 0.17 g/L h no final do experimento, sendo um 30% superior à obtida no experimento FB3. Para ensaios em batelada alimentada, Li *et al.* reportaram produtividades finais de 0.54 g/L h para *Rhodospiridium toruloides* após cinco alimentações de glicose, devido a que a concentração máxima inibitória para este microrganismo é de 150 g/L, a concentração de glicose foi mantida em valores elevados, maximizando a produtividade (LI Y., *et al.*, 2007). No cultivo de *Cryptococcus curvatus* em glicose, foram obtidas produtividades máximas de 0.29 g/L h para um processo de batelada alimentada com limitação dupla de nitrogênio e ferro (HASSAN M., *et al.*, 1996). As maiores produtividades de lipídeos reportadas, na ordem de 1 g/L h, foram obtidas

em condições otimizadas do cultivo de *Apiotrichum curvatum* em permeado de soro de leite com reciclo parcial de células, onde uma concentração no estado estacionário de 90 g/L e um conteúdo de lipídeos de 33% foram obtidos (YKEMA A., *et al*, 1988). Para *Lipomyces starkeyi* cultivado em etanol, a maior produtividade de lipídeos reportada foi obtida no modo de batelada alimentada utilizando um sistema de controle por computador, mediante esta técnica foi atingida uma concentração máxima de biomassa de 153 g/L e um conteúdo de lipídeos de 54%. Assim, uma produtividade máxima de 0.59 g/L h foi obtida (YAMAUCHI H., *et al*, 1983). Até agora não foram reportados processos em batelada alimentada utilizando xilose como única fonte de carbono.

Um resumo dos principais resultados obtidos nos experimentos é apresentado na tabela 6.2, o rendimento global de lipídeos foi elevado para FB1 e 2 se comparado com o máximo teórico (0.3 g/g), também foram obtidos baixos rendimentos de biomassa livre.

Tabela 6.2: Resultados finais dos experimentos em batelada alimentada

	FB1	FB2	FB3	FB4
Biomassa final , (g/L)	21.12	46.70	46.28	51.18
Conteúdo de lipídeos , (%)	42.5	45.7	37.9	28.4
Y_{L/S}, global , (g _L /g _S)	0.146	0.139	0.107	0.093
Y_{biom livre/S}, global , (g _{livre} /g _S)	0.197	0.166	0.176	0.234

Na tabela 6.3 são apresentados alguns resultados obtidos da literatura para diferentes processos de produção de lipídeos microbianos. A maioria dos processos desenvolvidos até agora foram em batelada simples, de baixa produtividade e com concentrações baixas de lipídeos, dificultando assim a recuperação do produto. Inicialmente também foram propostos processos contínuos nos quais diversas condições foram testadas (YOON S.H., 1983) e inclusive a divisão do processo em dois reatores em serie, visando a separação dos processos de crescimento e acúmulo

(HALL M.J., 1977). A dificuldade operacional destes processos, junto com a possibilidade de contaminação e instabilidade genética dos microrganismos se reflete em que a pesquisa neste modo de operação não foi mais desenvolvida (SHULER M.L., KARGI F., 1992).

Tabela 6.3: Principais resultados de diferentes processos de produção de lipídeos microbianos

Microrganismo	Modo operação	Substrato	Biom. Final (g/L)	Lipídeos (%)	Y_{L/S} (g/g_x h)	Referência
<i>R. glutinis</i>	Batelada	Glicose	14.0	58	---	Yoon, 1983
<i>R. gracilis</i>	Batelada	Glicose	10.0	68	0.16	Jacob, 1992
<i>C. curvatus</i>	Batelada	Glicose	17.0	22.5	0.12	Hassan, 1996
<i>M. purpureus</i>	Batelada	Glicose	6.8	72	---	Rasheva, 1997
<i>R. toruloides</i>	Batelada	Glicose	28.3	76.1	0.23	Li, 2006
<i>R. glutinis</i>	Batelada	Resíduo	2.44	10	---	Xue, 2006
<i>L. starkeyi</i>	Batelada	Glic e Xil	20.5	61.5	---	Zhao, 2008
<i>R. glutinis</i>	Bat. Alim.	Glicose	185	40	---	Pan, 1986
<i>R. toruloides</i>	Bat. Alim.	Glicose	113	67.5	0.23	Li, 2007
<i>C. prototecoides</i>	Bat. Alim.	Glicose	51.2	50.3	---	Xiong, 2008
<i>Candida 107</i>	Contínuo	Glicose	20.9	25.4	0.14	Hall, 1977
<i>R. glutinis</i>	Contínuo	Glicose	6.7	57.2	0.16	Yoon, 1983

Recentemente os processos em batelada alimentada foram objeto de maior desenvolvimento, devido principalmente a que nesta aplicação teores elevados de lipídeos são pretendidos para assim diminuir os custos de extração envolvidos. Pan J.G. e colaboradores utilizaram *R. glutinis* num processo de batelada alimentada utilizando ar enriquecido com oxigênio para maximizar o crescimento, a altíssima concentração final de biomassa levou ao aumento dramático da viscosidade do caldo e conseqüentemente à potencia necessária para agitação (PAN J.G., *et al*, 1986). Um estudo utilizando a alga heterotrófica *Chlorella protothecoides* demonstrou que a

otimização dos parâmetros deste modo de operação resulta em incrementos significativos na produtividade, chegando a duplicar os valores obtidos em uma estratégia não otimizada (XIONG W., *et al*, 2008).

6.4 Conclusões

Dois processos de produção de lipídeos microbianos em batelada alimentada foram estabelecidos, utilizando uma alimentação simples um alto conteúdo de lipídeos foi obtido. No modo pH-amônio/auxostat altas concentrações celulares foram atingidas. Para validar o efeito conjunto da utilização combinada destes dois modos de operação, experimentos de maior duração com um maior número de alimentações devem ser desenvolvidos.

Os experimentos desenvolvidos nesta seção apresentaram produtividades e rendimentos comparáveis com os obtidos na literatura, porém a utilização de um carboidrato de difícil aplicação em outros processos como é o caso da xilose pode viabilizar o processo de produção de lipídeos microbianos.

6.5 Referências bibliográficas

ANDERSEN M.H., Foxylogic, Fermentor Control Program v4.4, disponível em: <http://imsb.au.dk/~mha/biohome.htm>, acesso em: junho de 2008.

CHOI S.Y., RYU D.Y, RHEE J.S., Production of microbial lipid: Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*, *Biotechnology and Bioengineering*, 24 (5), 1165-1172, 1982.

HALL M.J., RATLEDGE C., Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida 107*) growing on glucose under various conditions in a one and two stage continuous culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 33 (3), 577-584, 1977.

HASSAN M., BLANC P.J., GRANGER L., PAREILLEUX A., GOMA G., Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 31(4), 355-361, 1996.

JACOB Z., Linear growth and lipid synthesis in the oleaginous yeast *Rhodotorula gracilis*, *Folia Microbiologica*, 37(2), 117-121, 1992.

LI Y., ZHAO Z.K., BAI F., High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture, *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 312-317, 2007.

LI Y., ZHAO Z.K., BAI F., Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*, *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(4), 650-656, 2006.

PAN J.G., KWAK M.Y., RHEE J.S., High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen-enriched air, *Biotechnology Letters*, 8(10), 715-718, 1986.

PAPANIKOLAU S., GALIOTOU-PANAYOTOU M., FAKAS S., KOMAITIS M., AGGELIS G., Lipid production by oleaginous mucorales cultivated on renewable carbon sources, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 1060-1070, 2007.

RASHEVA T., KUJUMDZIEVA A., HALLET J.N., Lipid production by *Monascus purpureus* albino strain, *Journal of Biotechnology*, 56, 217-224, 1997.

RATLEDGE C., Microorganisms for lipids, *Acta Biotechnologica*, 11, 429-438, 1991.

RATLEDGE C., Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms, *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 1047-1050, 2002.

SHULER M.L., KARGI F., *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, Prentice Hall, New Jersey, USA, 1992.

SUUTARI M., RINTAMAKI A., LAAKSO S., The effect of temperature on lipid classes and their fatty acid profiles in *Lipomyces starkeyi*, *Journal of American Oil Chemists Society*, 73 (8), 1071-1073, 1996.

USUKA Y, NAGANUMA T., TANAKA K., ODAGIRI Y., Effect of culture pH on the growth and biotin requirement in a strain of *Lipomyces starkeyi*, *Journal of General Applied Microbiology*, 20, 197-206, 1974.

USUKA Y, NAGANUMA T., TANAKA K., ODAGIRI Y., Relation between neutral lípido accumulation and the growth phase in the yeast, *Lipomyces starkeyi*, a fat producing yeast, *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(3), 851-852, 1985.

YAMAUCHI H., MORI H., KOBAYASHI T., SHIMIZU S., Mass production of lipids by *Lipomyces starkeyi* in micro-computer-aided fed-batch culture, *Journal of Fermentation Technology*, 61, 275-280, 1983.

YKEMA A., VERBREE E.C., KATER M.M., SMIT H., Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichium curvatum* in wheypermeate, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 211-218, 1988.

YOON S.H., RHEE J.S., Lipid from yeast fermentation: Effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*, *Journal of American Oil Chemists Society*, 60(7), 1281-1286, 1983.

XIONG W., LI X., XIANG J., WU Q., High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 29-36, 2008

XUE F., ZHANG X., LUO H., TAN T., A new method for preparing raw material for biodiesel production, *Process Biochemistry*, 41, 1699-1702, 2006.

ZHAO X., KONG X., HUA Y., FENG B., ZHAO Z.K., Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 2008

CONCLUSÕES GERAIS

O processo de acúmulo de lipídeos por leveduras oleaginosas da espécie *Lipomyces starkeyi* em batelada simples é afetado principalmente pelos fatores relação C/N e fonte de nitrogênio utilizada, influenciando estes principalmente na velocidade de crescimento e no nível final de acúmulo atingido. Neste modo de operação, relações C/N de 100 g/g podem ser utilizadas.

A levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 foi escolhida para a produção de lipídeos a partir de xilose graças a sua elevada velocidade específica de crescimento (0.087 h^{-1}) e teor de lipídeos (20-30%). O rendimento energético do crescimento em frascos agitados foi estimado em $0.7 J_{\text{biomassa}}/J_{\text{xilose}}$ o que se traduz em um melhor aproveitamento da xilose.

Os estudos de inibição por substrato indicaram que concentrações iniciais de xilose acima de 60 g/L produzem uma forte inibição do crescimento, refletida numa redução da velocidade máxima específica de crescimento. A cinética de inibição foi descrita adequadamente pelo modelo de Mulchandani, este modelo permitiu a elaboração de um modelo matemático que descrevesse o cultivo em batelada simples.

Utilizando um processo de batelada alimentada, foram atingidas concentrações máximas de biomassa total de 46.7 g/L com um conteúdo de lipídeos de 45.7% e uma produtividade de produção de lipídeos de 0.16 g/L h. Estes valores, junto com um rendimento lipídeo/substrato de 50% o teórico máximo são comparáveis com os descritos na literatura para processos similares baseados em hexoses, isto sugere o grande potencial da linhagem selecionada para a conversão deste substrato. Além disso, o valor cetano do biodiesel que poderia ser obtido a partir destes lipídeos (58.8) atende as exigências internacionais, viabilizando assim sua aplicação neste mercado.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar experimentos de inibição por substrato referentes à fonte de nitrogênio, visando uma melhor descrição matemática do comportamento da linhagem respeito a este substrato.

Validar o modelo matemático desenvolvido para batelada simples com diferentes concentrações iniciais de xilose, quantificando o nitrogênio total do meio e com mais dados cinéticos da produção de lipídeos.

Realizar estudos em batelada alimentada com um maior número de alimentações, até identificar o limite máximo de acúmulo da linhagem, ainda não atingido.

Realizar estudos em batelada alimentada sob concentrações de oxigênio dissolvido elevadas (50-60% de saturação), visando estabelecer o efeito do oxigênio no processo de acúmulo (não no crescimento).

Estabelecer um processo contínuo em duas etapas, crescimento e acúmulo, para quantificar o potencial da linhagem selecionada.

Determinar a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo da xilose e na síntese de lipídeos para *L. starkeyi* DSM 70296, isto para identificar possíveis alvos de engenharia metabólica (melhoria na velocidade de consumo de xilose e mecanismos de transporte extracelular).

Desenvolver o balanço energético do processo, visando estabelecer a eficiência energética de converter pentoses em moléculas de alta energia, como os triglicerídeos.

Estabelecer o comportamento da linhagem quando utilizados glicose e xilose simultaneamente.

Estabelecer o efeito dos inibidores derivados do processo de pré-tratamento e hidrólise dos materiais lignocelulósicos no crescimento e acúmulo de lipídeos para a linhagem escolhida.

Testar os processos desenvolvidos com diferentes frações obtidas do processo de hidrólise de bagaço e palha de açúcar.

Avaliar o impacto da extração do lipídeo na economia do processo.