



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Estratégias para o aumento do rendimento em biomassa e lípidos
na levedura *Rhodosporidium toruloides*

Laura Isabel Tangerino Martins

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sobre a orientação e co-orientação de:

Professora Doutora Sara Isabel Cacheira Raposo

Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

2015

Estratégias para o aumento do rendimento em biomassa e lípidos
na levedura *Rhodosporidium toruloides*

Laura Isabel Tangerino Martins

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sobre a orientação e co-orientação de:

Professora Doutora Sara Isabel Cacheira Raposo

Professora Doutora Maria Emília Lima Costa

2015

Estratégias para o aumento do rendimento em biomassa e lípidos na levedura *Rhodosporidium toruloides*

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o(a) autor(a) deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Laura Isabel Tangerino Martins

Laura Isabel Tangerino Martins

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A realização desta dissertação não teria sido possível sem a contribuição de várias pessoas, às quais gostaria de deixar os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Sara Raposo, pela disponibilidade que sempre teve, pelos conhecimentos transmitidos e, principalmente, pelo sincero apoio que demonstrou em todos os momentos deste percurso.

À Professora Doutora Maria Emília Costa, pela ajuda que prestou e por todos os conhecimentos partilhados.

À Mestre Ana Constantino e à Mestre Brígida Rodrigues, pela ajuda laboratorial e não só, que foi essencial para o meu sucesso. Agradeço também a amizade e os bons momentos no laboratório e fora dele.

Ao Mestre Fábio Guerreiro, por todos os truques ensinados sobre a nossa levedura, fundamentais para o progresso da minha dissertação, bem como pela amizade e boa disposição.

Ao Diogo, agora Mestre Diogo Gonçalves, pelo apoio incondicional, paciência e pelo ânimo que me deu durante este percurso.

Aos restantes colegas de laboratório, pelo espírito de equipa e pelos excelentes momentos passados.

À minha família e amigos, por todo o apoio demonstrado, não só durante a realização desta dissertação, mas ao longo de toda a minha vida, sem os quais teria sido impossível chegar até aqui.

Resumo

Esta dissertação focou-se na otimização das condições de crescimento e de acumulação de lípidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, usando resíduos de alfarroba como fonte de carbono, como uma alternativa mais sustentável para a produção de biodiesel de segunda geração.

Estudos iniciais revelaram que o melhor meio YPD para a produção de biomassa no inóculo é o meio constituído por 15 g/L de açúcares de alfarroba, com uma biomassa máxima de 9,22 g/L. De seguida foram testados diferentes rácios C/N, em o rácio C/N 330, com 70 g/L de açúcares e 0,1 g/L de sulfato de amónio apresentou os melhores resultados.

Avaliou-se o efeito do arejamento na produção de biomassa e lípidos, verificando-se que o caudal de arejamento de 0,3 vvm é insuficiente para induzir o metabolismo lipídico, havendo apenas produção de biomassa. Com o caudal de arejamento de 0,75 vvm já foi possível chegar a uma concentração de lípidos de 1,25 g/L.

De modo a aumentar a produção de lípidos e biomassa avaliou-se o efeito do uso de n-dodecano. A adição de 1 % (v/v) de n-dodecano melhora as condições de transferência de massa, aumentando cerca de 20 % o valor de K_{La} do meio. O uso do vetor aumentou a concentração de lípidos de para 2,57 g/L e o rendimento lipídico sofreu um incremento para 33 % (p/p). Foi ainda feito um ensaio em modo *fed-batch*, conseguindo-se produzir elevadas quantidades de biomassa, 25,23 g/L e uma concentração de lípidos de 1,40 g/L. Contudo esta produção lipídica foi inferior, à obtida em *batch* com adição do vetor e com idêntico caudal de arejamento, sugerindo que neste caso o arejamento foi insuficiente para induzir acumulação de lípidos.

O estudo do perfil em ácidos gordos sugere que o óleo produzido pela levedura *R. toruloides*, usando a alfarroba como fonte de carbono, é adequado para a produção de biodiesel de segunda geração.

Palavras-chave: *Rhodospiridium toruloides*, lípidos, alfarroba, biorreator, n-dodecano, biodiesel

Abstract

This dissertation was focused on the optimization of the growth conditions and lipid accumulation by the yeast *R. toruloides* CECT 1499, using carob kibbles as the carbon source, and creating a more sustainable alternative for the production of second generation biodiesel.

Initial studies showed that the best YPD medium for biomass production in the inoculum is the medium with 15 g/L of carob sugars, which reached a maximum biomass of 9.22 g/L. Prior to this, were tested different C/N ratios, where the C/N ratio of 330, with 70 g/L of sugars and 0.1 g/L of ammonium sulfate, showed the best results.

Then, the effect of aeration for biomass and lipids production was evaluated, and it was found that the 0.3 vvm aeration flow rate is insufficient to induce lipid metabolism, producing only biomass. With the aeration flow rate of 0.75 vvm it was possible to reach a concentration of lipids of 1.25 g/L.

In order to increase the lipids and biomass production, the effect of using n-dodecane as an oxygen vector was evaluated. The addition of 1% (v/v) of n-dodecane improves mass transfer conditions, with a 20% increase of the K_{La} value in the medium. The utilization of the oxygen vector promoted an increase in lipid concentration to 2.57 g/L and the lipid yield increased to 33 % (w/w). It was also tested a fed-batch operation mode, which produced large amounts of biomass, 25.23 g/L, and a lipid concentration of 1.40 g/L. However, this lipid production was inferior to that obtained in batch mode, also with the vector and the same aeration flow rate, suggesting that, in this case, the aeration was insufficient to induce lipid accumulation.

The analysis of the fatty acid profile suggested that the oil produced by the yeast *R. toruloides*, using the carob as a carbon source, it is suitable for the production of second generation biodiesel.

Key words: *Rhodospiridium toruloides*, lipids, carob, bioreactor, n-dodecane, biodiesel

Lista de abreviações

ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACL	ATP-citrato liase
ADR	1-acil-DHAP reductase
AGAT	1-acil-G-3-P aciltransferase
AMP	Adenosina Monofosfato
C/N	Rácio molar Carbono/Azoto
CECT	Culturas Espanholas de Cultivo Tipo
CIMA	Centro de Investigação Marinha e Ambiental
DAG	Diacilglicerol
DHAP	Dihidroxiacetona-fosfato
DAPAT	DHAP aciltransferase
DO	Densidade ótica
FAS	Complexo Ácido Gordo sintase
FCT	Faculdade de Ciências e Tecnologia
G-3-P	Glicerol-3-fosfato
GAT	G-3-P aciltransferase
GEE	Gases de Efeito de Estufa
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
K _G	Coefficiente global de transferência de massa na fase gasosa
K _L	Coefficiente global de transferência de massa na fase líquida
K _{La}	Coefficiente volumétrico de transferência de massa
LEBA	Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental
LPA	Ácido liso-fosfatídico
MNO	Microrganismo não oleaginosos
MO	Microrganismo oleaginoso

NADPH	Fosfato de dinucleotído de adenina e nicotinamida
PA	Ácido fosfatídico
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
Prod Vol _L	Produtividade volumétrica de lípidos
Prod Esp _{L/x}	Produtividade específica de lípidos
STR	<i>Stirred Tank Reactor</i>
TAG	Triglicérido
TR	Taxa respiratória
TR _{esp}	Taxa respiratória específica
UF	Unidades de fluorescência
UFC	Unidade Formadora de colónias
Y _{L/S}	Rendimento de lípidos em função do substrato
Y _{L/X}	Rendimento de lípidos em função da biomassa
YPD	<i>Yeast extract Peptone dextrose</i>
Y _{X/S}	Rendimento de biomassa em função do substrato
% dO ₂	Porcentagem de oxigénio dissolvido no meio
μ	Taxa específica de crescimento

Índice

Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Lista de abreviações	VII
Índice de figuras	XII
Índice de tabelas	XV
1 Introdução.....	1
1.1 Enquadramento teórico	1
1.2 Energias renováveis em Portugal	3
1.3 Microrganismos oleaginosos.....	5
1.3.1 <i>Rhodospiridium toruloides</i>	6
1.3.2 Matérias-primas de baixo custo.....	6
1.3.2.1 Alfarroba.....	6
1.4 Processo geral da produção de biodiesel.....	7
1.5 Acumulação lipídica em microrganismos oleaginosos	10
1.5.1 Síntese de ácidos gordos.....	13
1.5.2 Síntese de triglicéridos.....	14
1.6 Fatores influentes na acumulação lipídica	16
1.6.1 Rácio molar C/N.....	16
1.6.2 Oxigénio	17
1.6.2.1 Transferência de massa de oxigénio	18
1.6.2.2 Vetores de oxigénio	19
1.7 Objetivos	21

2	Materiais e métodos.....	22
2.1	Matéria-prima.....	22
2.1.1	Extração dos açúcares solúveis da alfarroba	22
2.2	Microrganismo e sua conservação	23
2.3	Meios de cultura e condições de crescimento celular	23
2.3.1	Armazenamento e conservação	23
2.3.2	Pré-inóculo e inóculo.....	23
2.3.3	Meio para acumulação lipídica.....	24
2.3.4	Crescimento em balão erlenmeyer	24
2.3.5	Crescimento em Reator biológico STR.....	25
2.4	Ensaio Experimentais	26
2.4.1	Efeito da concentração de fonte de carbono na produção de biomassa.....	26
2.4.2	Determinação do melhor rácio C/N para produção de lípidos	26
2.4.3	Estratégias para aumentar a acumulação lipídica	27
2.4.3.1	Influência do n-dodecano como vetor de oxigénio no K_{La}	27
2.4.3.2	Efeito do oxigénio na produção de lípidos	27
2.4.3.3	Crescimento e produção de lípidos pela levedura <i>R. toruloides</i> em modo <i>Fed-batch</i>	27
2.5	Métodos analíticos.....	28
2.5.1	Leitura da densidade ótica	28
2.5.2	Determinação do número de unidades formadoras de colónias	28
2.5.3	Determinação do peso seco	29
2.5.4	Determinação da taxa respiratória	29
2.5.5	Determinação do coeficiente de transferência de massa	30

2.5.6	Quantificação de lípidos neutros	30
2.5.7	Quantificação de açúcares solúveis	31
2.5.8	Quantificação de ião amónio	32
2.5.9	Extração de lípidos totais.....	33
2.5.10	Análise do perfil de ácidos gordos.....	33
2.6	Parâmetros cinéticos de crescimento.....	34
2.6.1	Taxa específica de crescimento	34
2.6.2	Produtividade volumétrica de lípidos	35
2.6.3	Produtividade específica de lípidos	35
2.6.4	Rendimento de lípidos em função da biomassa.....	35
2.6.5	Rendimento de lípidos em função do substrato.....	35
2.6.6	Rendimento de biomassa em função do substrato.....	36
2.7	Tratamento estatístico	36
3	Resultados e discussão.....	37
3.1	Efeito da concentração de fonte de carbono na produção de biomassa	37
3.2	Determinação do melhor rácio C/N para produção de lípidos	41
3.2.1	Efeito do aumento do ião amónio no rácio C/N	46
3.3	Estratégias para aumentar a acumulação lipídica.....	50
3.3.1	Influência do n-dodecano como vetor de oxigénio no K_{La}	50
3.3.2	Efeito do arejamento na produção de lípidos	52
3.3.3	Influência do vetor de oxigénio, n-dodecano, na produção de lípidos	56
3.3.4	Crescimento e produção de lípidos pela levedura <i>R. toruloides</i> em modo <i>fed-batch</i>	62
3.4	Análise do perfil de ácidos gordos	67

4	Conclusão	71
5	Perspetivas futuras	74
6	Bibliografia.....	75

Índice de figuras

Figura 1. Esquema da Direção Geral de Energia de Geologia com o contributo da energia renovável no consumo de energia primária em Portugal no ano de 2013. A biomassa inclui lenhas, licores sulfíticos, biogás e 50% de resíduos sólidos urbanos. Outros renováveis inclui energia solar (térmica e fotovoltaica), geotermia e outros resíduos renováveis ¹⁸	3
Figura 2. Esquema geral do uso de diversos óleos para a produção de biodiesel de primeira e segunda geração ^{1,11,57,128}	8
Figura 3. Representação esquemática da reação geral de transesterificação de TAG com álcool. (Adaptado de Demirbas, 2008 ¹).....	9
Figura 4. Representação esquemática das três reações consecutivas do processo de transesterificação de TAG com álcool. (Adaptado de Lukovi <i>et al.</i> , 2009 ⁵⁵).....	9
Figura 5. Esquema representativo do fluxo celular de malato de citrato, como precursores de acetil-CoA e NADPH, essenciais para a produção de TAG em MO. Os enzimas utilizados encontram-se numerados de 1 a 7. 1- piruvato descarboxilase, 2- malato desidrogenase, 3- enzima málico, 4- piruvato desidrogenase, 5- citrato sintase, 6- ATP citrato liase, 7- citrato/malato translocase. (Adaptado de Ratledge, 2004 ⁶⁰).....	11
Figura 6. Esquema da biossíntese de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados. (Adaptado de Ratledge, 2004 ⁶⁰).....	14
Figura 7. Esquema representativo da biossíntese de TAG. (Adaptado de Sorger <i>et al.</i> , 2003 ⁵⁴).....	15
Figura 8. Representação esquemática da transferência de massa de oxigénio, num reator biológico com arejamento. (Adaptado de Flickinger, 2013 ⁷⁹).....	18
Figura 9. Representação esquemática dos cinco mecanismos possíveis para a transferência de massa de oxigénio na presença de um vetor de oxigénio. C - célula; B - bolha de ar; V – vetor de oxigénio (Adaptado de Cascaval <i>et al.</i> , 2006 ⁷²).....	20

Figura 10. Perfil de crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com concentração inicial de açúcares totais de alfarroba de 15 g/L, 70 g/L e 200 g/L. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 104 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C..... 38

Figura 11. Perfil de consumo dos açúcares presentes no extrato de alfarroba, pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com as concentrações iniciais de açúcares totais de (A) 15 g/L, (B) 70g/L e (C) 200 g/L. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 104 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C. 39

Figura 12. Perfil da quantidade de células viáveis ao longo do crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com concentração inicial de açúcares totais de alfarroba de 15 g/L, 70 g/L e 200 g/L. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 104 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C. 41

Figura 13. Perfis de crescimento, acumulação lipídica e consumo de açúcares totais de alfarroba pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com concentração inicial de açúcares totais de alfarroba de (A e B) 15 g/L (rácio C/N 70), (C e D) 50 g/L (rácio C/N 240), (E e F) 70 g/L (rácio C/N 330), (G e H) 150 g/L (rácio C/N 700) e (I e J) 200 g/L (rácio C/N 930). Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer, a 200 rpm e 30 ± 1 °C. 43

Figura 14. Perfis de crescimento, acumulação lipídica e consumo de açúcares totais de alfarroba pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com concentração inicial de ião amónio de 0,5 g/L e de açúcares totais de alfarroba de (A e B) 70 g/L (rácio C/N 180), (C e D) 150 g/L (rácio C/N 390) e (E e F) 200 g/L (rácio C/N 520). Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C. 47

Figura 15. Perfis de crescimento e acumulação lipídica, de consumo de açúcares totais de alfarroba, e de variação de pH e % dO₂, pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com os caudais de arejamento de (A, B e C) 0,3 vvm e (D, E e F) 0,75 vvm. Os crescimentos foram realizados em reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C. 53

Figura 16. Perfis de crescimento e acumulação lipídica (A), de consumo de açúcares totais de alfarroba (B), e de variação de pH e % dO₂ (C), pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com o caudal de arejamento de 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano. O crescimento foi realizado em reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1°C. 57

Figura 17. Valores de K_{LA} obtidos durante o crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes caudais de arejamento, 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1°C. Para o caudal de arejamento de 0,75 vvm não foi possível determinar o K_{LA} às 72 e 144 h, por os valores de % dO₂ se apresentarem muito baixos. 60

Figura 18. Valores de TR (A) e TR_{esp} (B) obtidos durante o crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes caudais de arejamento, 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1°C. Para o caudal de arejamento de 0,75 vvm não foi possível determinar a TR e TR_{esp} às 72 e 144 h, por os valores de % dO₂ se apresentarem muito baixos. 61

Figura 19. Perfis de crescimento e acumulação lipídica (A), de consumo de açúcares totais de alfarroba (B), e de variação de pH e % dO₂ (C), pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em modo *fed-batch*, com o caudal de arejamento de 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano. Foram feitas adições de aproximadamente 30 g/L de extrato de alfarroba às 48 e 96 h. O crescimento foi realizado em reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1°C. 63

Figura 20. Valores de K_{LA} obtidos durante o crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes caudais de arejamento, 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano em modo *batch* e *fed-batch*. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1°C. Para o caudal de arejamento de 0,75 vvm não foi possível determinar o K_{LA} às 72 e 144 h, por os valores de % dO₂ se apresentarem muito baixos. 66

Figura 21. Valores de TR (A) e TR_{esp} (B) obtidos durante o crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes caudais de arejamento, 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano em modo *batch* e *fed-batch*. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Para o caudal de arejamento de 0,75 vvm não foi possível determinar a TR e TR_{esp} às 72 e 144 h, por os valores de % dO₂ se apresentarem muito baixos. 66

Índice de tabelas

Tabela 1. Conteúdo lipídico de alguns microrganismos oleaginosos ^{9,14,28,27,31,34}	5
Tabela 2. Alguns dos limites obrigatórios para garantir a qualidade do biodiesel na Europa, impostos pela Norma Europeia de Qualidade EN14214 ⁵³	7
Tabela 3. Parâmetros cinéticos de crescimento da levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 com diferentes concentrações iniciais de açúcares totais de alfarroba. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 104 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C.	38
Tabela 4. Parâmetros cinéticos de crescimento e acumulação lipídica pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 com diferentes concentrações iniciais de açúcares totais de alfarroba, correspondentes a diferentes rácios C/N. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer, a 200 rpm e 30 ± 1 °C.	44
Tabela 5. Parâmetros cinéticos de crescimento e acumulação lipídica pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 com diferentes concentrações iniciais de açúcares totais de alfarroba e de íão amónio de 0,5 g/L, correspondentes a diferentes rácios C/N. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C.	48
Tabela 6. Valores de K_{La} obtidos com os caudais de arejamento 0,3 e 0,75 vvm em reator biológico STR 2 L, com ou sem a adição de 1% (v/v) n-dodecano. Os ensaios foram realizados a uma temperatura de 30 ± 1 °C e agitação de 200 rpm.	51
Tabela 7. Parâmetros cinéticos de crescimento e acumulação lipídica pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 em reator biológico STR de 2 L com diferentes caudais de arejamento, 0,3 e 0,75 vvm, e em balão erlenmeyer, com o mesmo rácio C/N 330. Os crescimentos foram realizados durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C.	54

Tabela 8. Parâmetros cinéticos de crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes caudais de arejamento, 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 58

Tabela 9. Parâmetros cinéticos de crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com 0,75 vvm na ausência e na presença de 1 % (v/v) de n-dodecano, em modo de cultivo *batch* e *fed-batch*. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 64

Tabela 10. Perfil de ácidos gordos produzidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, comparados com os perfis de ácidos gordos de outras estirpes e óleos usados para a produção de biodiesel^{35,109,120,122-125}. 68

1 Introdução

1.1 Enquadramento teórico

Existem dois principais tipos de recursos energéticos: fóssil e renovável. No entanto, a maioria da energia usada atualmente provém de combustíveis fósseis, como o carvão, o gás natural e, principalmente, o petróleo. Estes combustíveis fósseis representam cerca de 80% da totalidade de fontes energéticas existentes no mundo ¹.

Assim, tanto o aumento mundial do consumo de energia, bem como a inevitável escassez dos recursos fósseis, levam a que cada vez seja mais importante a utilização de energias renováveis, essencialmente no sector dos transportes, diminuindo-se assim a dependência de petróleo a nível mundial. Neste sentido, muitos são os países que têm vindo a aumentar o investimento em biocombustíveis, de modo a também evitarem conflitos geopolíticos, económicos e ambientais ¹⁻³.

Os sectores de energia, como as centrais elétricas, a indústria e os transportes, são responsáveis por 80% das emissões de gases de efeito estufa (GEE) na União Europeia (UE). Em particular, os transportes foram responsáveis por 20% do total de emissões de GEE em 2011, na UE ^{2,4}.

No sentido de minimizar os efeitos dos GEE, o Parlamento Europeu e o Conselho da EU lançaram a diretiva 2009/28/CE, com o objetivo de promover a utilização de energia proveniente de fontes renováveis. Esta diretiva estabelece que até 2020, 20 % do total de energia consumida na EU deve ser renovável, e cada Estado-Membro deve assegurar que, pelo menos, 10 % do consumo final de energia nos transportes seja proveniente de fontes renováveis ⁵. Consequentemente, a diretiva 2009/28/CE foi transposta pelo Decreto-lei n.º 117/2010, de 25 de Outubro, e pelo Decreto-lei n.º 39/2013, de 18 de Março, publicados em Diário da República, de modo a melhorar a eficiência energética do país ⁵⁻⁷.

Tendo em conta que a UE importa 50% e Portugal importa 85% da energia total consumida, de modo a atingir as metas anteriormente descritas, será necessária cada vez mais a utilização de fontes de energia renováveis, bem como o aumento de produção de biocombustíveis ².

Tanto os Decretos-lei anteriormente referidos, como a diretiva 2009/28/CE definem os biocombustíveis como combustíveis líquidos ou gasosos, utilizados nos transportes, produzidos a partir de biomassa, sendo a biomassa a fração biodegradável de produtos, resíduos ou detritos de origem biológica provenientes da agricultura, incluindo substâncias de origem animal e vegetal, da exploração florestal e de indústrias afins, incluindo da pesca e da aquicultura, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos ⁵⁻⁷.

Os biocombustíveis de primeira geração são obtidos a partir de produtos agrícolas, o que apresenta desvantagens como a competição com a produção de bens alimentares e o seu consequente aumento de preço, além do elevado custo de produção associado e todos os problemas éticos, sociais e económicos que representam para a sociedade. Estima-se que o preço das matérias agrícolas destinadas à produção de biocombustíveis de primeira geração representa entre 80% a 85% do custo total da produção do biocombustível. Estes factos levam à necessidade de criar biocombustíveis de segunda geração, que são produzidos a partir de resíduos agroindustriais ou produtos não alimentares, como sendo as matérias-primas não comestíveis. Com esta alternativa deixa de existir competição com a produção de bens alimentares e possibilita-se o aproveitamento de produtos de baixo valor comercial ⁸⁻¹¹.

Existem diversos biocombustíveis, como por exemplo o bioetanol, biopropanol, biobutanol, biometanol, bioglicerol, biohidrogénio, bioéter, biogás e o biodiesel ^{1,12,13}.

O biodiesel é obtido a partir da transesterificação de óleos renováveis, consistindo em ésteres monoalquilo de ácidos gordos. Este pode ser usado diretamente como um combustível ou usado como aditivo ao gasóleo convencional, pois apresenta propriedades de combustão semelhantes ao diesel fóssil. Atualmente, a maioria do biodiesel produzido mundialmente, é obtido a partir da transesterificação de óleos vegetais ou animais, ou seja, biodiesel de primeira geração ^{1,8,9,14}.

Uma alternativa a este processo pode ser o uso de microrganismos oleaginosos, que produzem óleos microbianos, considerados de segunda geração, com composição química e valor energético semelhantes aos óleos vegetais e animais. Para além disso, os resíduos agroindustriais podem ser usados como substrato para o crescimento destes microrganismos, obtendo-se assim uma alternativa ainda mais sustentável ^{9,15}.

1.2 Energias renováveis em Portugal

Nos últimos anos a dependência energética de Portugal tem vindo a diminuir. Estatísticas da Direção Geral de Energia de Geologia mostram que em 2013 situou-se nos 73,9 %, apresentando uma redução que 14,9 pontos percentuais em relação ao ano de 2005 ¹⁶. Esta redução deveu-se maioritariamente à maior produção de energia hídrica e eólica em Portugal. Ainda assim, tendo em conta que a média da UE se situa em 54,0 %, Portugal é um dos países da UE com maior dependência energética, encontrando-se em oitavo lugar ¹⁶.

No entanto, Portugal foi o sexto melhor país na incorporação de energias renováveis, sendo a média da UE de 15,0 %. Dados da Direção Geral de Energia de Geologia mostram que em 2004 a incorporação de fontes de energia renováveis no consumo final bruto de energia era de 19,2 %, aumentando para 25,7 % em 2013. Estes dados demonstram a boa prestação de Portugal na tentativa de cumprir a sua meta de 31,0 % imposta para 2020 ^{16,17}.

Segundo a Direção Geral de Energia de Geologia, no ano de 2013 a contribuição das fontes de energia renováveis no consumo de energia primária foi de 24 %, dos quais 5 % correspondem aos biocombustíveis. No entanto, em Portugal o petróleo ainda continua a ser a principal fonte de energia (Figura 1) ¹⁸.

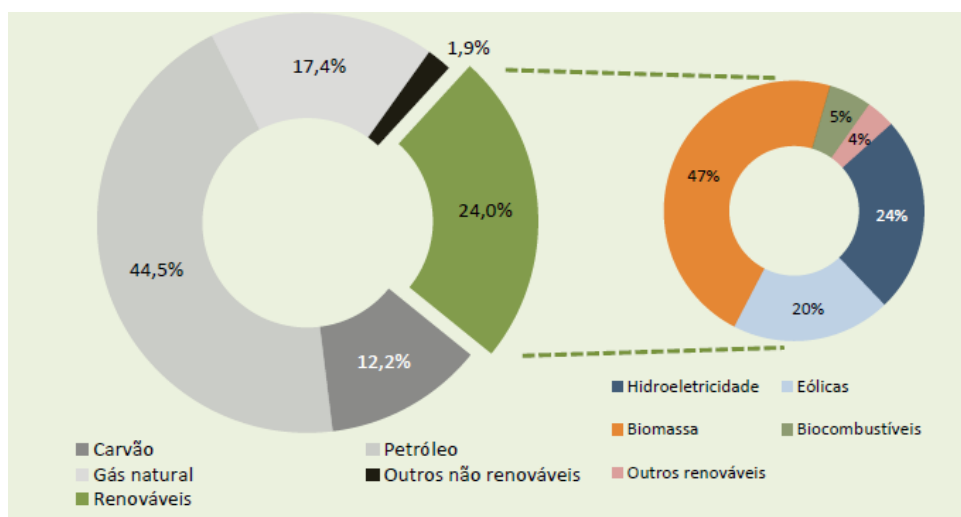


Figura 1. Esquema da Direção Geral de Energia de Geologia com o contributo da energia renovável no consumo de energia primária em Portugal no ano de 2013. A biomassa inclui lenhas, licores sulfíticos, biogás e 50% de resíduos sólidos urbanos. Outros renováveis inclui energia solar (térmica e fotovoltaica), geotermia e outros resíduos renováveis ¹⁸.

A nível dos biocombustíveis, Portugal apenas produz biodiesel, não tendo nenhuma unidade de produção de bioetanol. Assim todo o bioetanol necessário para incorporação nos combustíveis fósseis é importado, sendo que em 2014 foram importadas cerca de 8 mil toneladas deste biocombustível ¹⁸.

Em Portugal, no ano de 2014, foram produzidas cerca de 340 mil toneladas de biodiesel, das quais 323 mil toneladas foram incorporadas no diesel fóssil (gasóleo) e cerca de 6 mil toneladas foram para venda direta no estado puro. Por sua vez, em 2007, apenas foram produzidas 183 mil toneladas de biodiesel, das quais 150 mil toneladas foram incorporadas. A incorporação de biodiesel no diesel fóssil teve início em 2006, com o enquadramento do Decreto-Lei nº 62/2006 de 21 de Março, que definiu que até final de 2010 todos os combustíveis para efeitos de transporte deveriam apresentar 5,75 % de biocombustíveis ^{18,19}.

Em 2012 foram produzidos 1493 milhões de litros de biodiesel de primeira geração, a nível mundial. Sendo que houve um aumento bastante acentuado, comparativamente aos 793 mil litros que foram produzidos em 1991 ²⁰. Estatísticas de 2010 indicam que os países com maior produção são a Alemanha, Brasil, França, Argentina e Estados Unidos da América, correspondendo a 55% da produção mundial ²¹.

O custo de produção de biodiesel de 1º geração é geralmente 1,5 a 3 vezes mais elevado do que o custo de produção de diesel fóssil. Este varia consoante a matéria-prima usada, sendo que o biodiesel produzido a partir de gordura animal, óleo de colza, óleo de girassol e óleo de soja ronda 0,28, 0,30, 0,49, e 0,26 €/L, respetivamente ^{1,22}. O custo de produção de diesel fóssil ronda os 0,16 €, sendo que, atualmente, em Portugal é vendido ao consumidor a cerca de 1,28 € (consultado a 16/6/2015) ^{23,24}.

Atualmente, a produção de biodiesel usando microrganismos oleaginosos, a partir de matérias-primas de baixo valor ainda não é uma realidade, sendo mais dispendiosa do que a produção de biodiesel de primeira geração e de diesel fóssil ¹¹. Todavia, estudos desenvolvidos por Koutinas *et al.* (2014) indicam que a produção de óleo microbiano apresenta um custo superior relativamente à produção de óleos vegetais. Foi estimado por que a produção de óleo microbiano a partir de glucose tem um custo aproximado de 4,34€/Kg, assumindo-se o preço da glucose como 315€/tonelada. Neste caso, a glucose apresenta 79.28% dos custos totais de produção e transesterificação do biodiesel ^{25,26}. Koutinas *et al.* (2014) estimam que se o custo de produção de

óleo microbiano for reduzido em 50% na próxima década, este poderá competir com o preço do biodiesel produzido a partir de óleos vegetais e gorduras animais ²⁵.

1.3 Microrganismos oleaginosos

Muitos são os microrganismos, como microalgas, fungos, bactérias e leveduras, que têm a capacidade de acumular lípidos em condições específicas de crescimento ^{9,14,15,27-30}.

Os lípidos produzidos consistem em 80% a 90% de TAG e numa pequena quantidade de ésteres de esterol, que no seu conjunto são denominados lípidos neutros. Estes lípidos neutros são armazenados em corpos lipídicos, que por sua vez são organelos revestidos por uma camada fosfolipídica com algumas proteínas agregadas ^{31,32,33}.

Os microrganismos oleaginosos são considerados como tal quando conseguem acumular mais 20% da sua biomassa seca em lípidos neutros ^{9,15,28,29}. Alguns destes microrganismos estão apresentados na tabela 1, com o respetivo conteúdo lipídico.

A utilização de leveduras face aos restantes microrganismos pode ser vantajosa, porque para além da produção de biodiesel ser mais barata, estas apresentam uma maior taxa de crescimento e não são tão afetadas pelas condições climatéricas como as microalgas ^{9,31}. Algumas leveduras dos géneros *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospodium*, *Cryptococcus* e *Lipomyces*, podem acumular até cerca de 60-70% da sua biomassa seca em lípidos, usando a glucose como fonte de carbono ^{9,15,28-31}. No entanto, as leveduras oleaginosas correspondem apenas a 5% do total de espécies de leveduras conhecidas (cerca de 600) ^{9,28}

Tabela 1. Conteúdo lipídico de alguns microrganismos oleaginosos ^{9,14,28,27,31,34}.

Microrganismo	% Lípidos da biomassa seca	Microrganismo	% Lípidos da biomassa seca
Microalgas		Leveduras	
<i>Chlorella emersonii</i>	25 – 63	<i>Candida curvata</i>	30 - 58
<i>Botryococcus braunii</i>	25 – 75	<i>Cryptococcus albidus</i>	25 - 65
<i>Nitzschia sp.</i>	45 – 47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	30 - 72
<i>Schizochytrium sp.</i>	50 – 77	<i>Rhodospodium toruloides</i>	42 - 79
Bactérias		Fungos	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27 – 38	<i>Aspergillus oryzae</i>	18 - 57
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18 – 24	<i>Cunninghamella echinulata</i>	27 - 50
<i>Rhodococcus opacus</i>	24 – 25	<i>Mortierella isabellina</i>	53 - 86

1.3.1 *Rhodospodium toruloides*

A levedura *Rhodospodium toruloides*, inicialmente descrita por Banno em 1967, é vastamente conhecida pela sua capacidade de produção de lípidos neutros^{30,35-38}. Esta levedura pertencente à ordem Sporidiobolales, filo Basidiomycota do reino Fungi, é um telemorfo das leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula gracilis*^{31,39-43}.

É uma levedura não patogénica, estritamente aeróbia e mesófila, isolada a partir de corníferas. Normalmente apresenta uma pigmentação cor-de-rosa ou vermelha^{39,40,44}.

Para além da produção de lípidos, a levedura *R. toruloides* é também pode ser usada para outras aplicações, como a produção de carotenoides (particularmente o β -caroteno) que podem atuar como precursores da vitamina A, como pigmentos naturais e apresentar atividade antioxidante. Pode ainda sintetizar enzimas biotecnologicamente importantes como a cefalosporina esterase, a epóxido hidrólase e a fenilalanina amónio-liase^{39,41,44-47}.

1.3.2 Matérias-primas de baixo custo

Para a produção de lípidos pelos microrganismos oleaginosos podem ser usadas matérias-primas ricas em açúcares como substrato. Exemplo disso são alguns resíduos agro-industriais, como os resíduos de alfarroba.

1.3.2.1 Alfarroba

A alfarrobeira, de nome científico *Ceretonia siliqua L.*, é um importante elemento da vegetação na maioria dos países mediterrânicos⁴⁸⁻⁵¹, sendo os principais países produtores de alfarroba a Espanha (41%), Itália (15%), Marrocos (12,5%) e Portugal (10,5%)⁴⁹.

Atualmente, são produzidas a nível mundial cerca de 400 mil toneladas por ano de alfarroba, sendo que apenas na região do Algarve são produzidas, em média, cerca de 50 mil toneladas por ano, com um preço comercial de 200€ por tonelada⁴⁸.

A vagem de alfarroba é constituída por sementes e polpa, correspondentes a 10% e 90% da biomassa total, respetivamente⁴⁸⁻⁵¹. A alfarroba é utilizada principalmente para a produção de goma de alfarroba, a partir das sementes da mesma.⁴⁹⁻⁵¹

Assim, a polpa de alfarroba é considerada um subproduto do valioso aproveitamento das sementes. No entanto, a polpa apresenta um elevado conteúdo de açúcares, entre 48% a 56% da sua composição total, incluindo a sacarose (32-38%), a frutose (5-7%) e a glucose (5-6%)⁴⁹. Por este motivo, a polpa é também utilizada para ração de animais ou como substituto do cacau, para a confeção de alguns bens alimentares, como alimentos dietéticos, doces regionais e bebidas⁴⁹⁻⁵¹. Porém, em Portugal, apenas 38% da polpa de alfarroba é aproveitada, sendo a restante considerada um resíduo agroindustrial, que pode ser facilmente utilizada como substrato na produção de biocombustíveis, por parte de microrganismos fermentativos ou oleaginosos^{50 48}.

1.4 Processo geral da produção de biodiesel

O biodiesel tem diversas vantagens em relação ao diesel fóssil, como o facto de ser renovável, sustentável, biodegradável, mais seguro de usar e transportar, não-tóxico, ter baixas emissões de GEE, proporcionar uma melhor lubrificação do motor e poder ser produzido a partir de numerosas matérias-primas^{9,14,1}. No entanto, também apresenta algumas desvantagens como ter maior viscosidade, menor conteúdo energético, menor velocidade e potência do motor e um preço mais elevado¹.

O biodiesel tem de cumprir os limites impostos pela Norma Europeia de Qualidade EN14214 através de várias propriedades como a massa específica, viscosidade, volatilidade, ponto de inflamação, ponto de combustão, calor de combustão e o número de cetano (tabela 2)^{1, 52,53}.

Tabela 2. Alguns dos limites obrigatórios para garantir a qualidade do biodiesel na Europa, impostos pela Norma Europeia de Qualidade EN14214⁵³.

Propriedade	Valor
Quantidade de ésteres (%)	96,5
Massa específica a 15°C (kg/m ³)	860 - 900
Viscosidade a 40°C (mm ² /s)	3,5 - 5
Ponto de inflamação (°C)	> 101,0
Número de cetano	≥ 51,0
Quantidade de água (mg/kg)	≤ 500,0

Simplificadamente, a produção do biodiesel é a transesterificação de óleos em ésteres alquila, como representado no seguinte esquema.

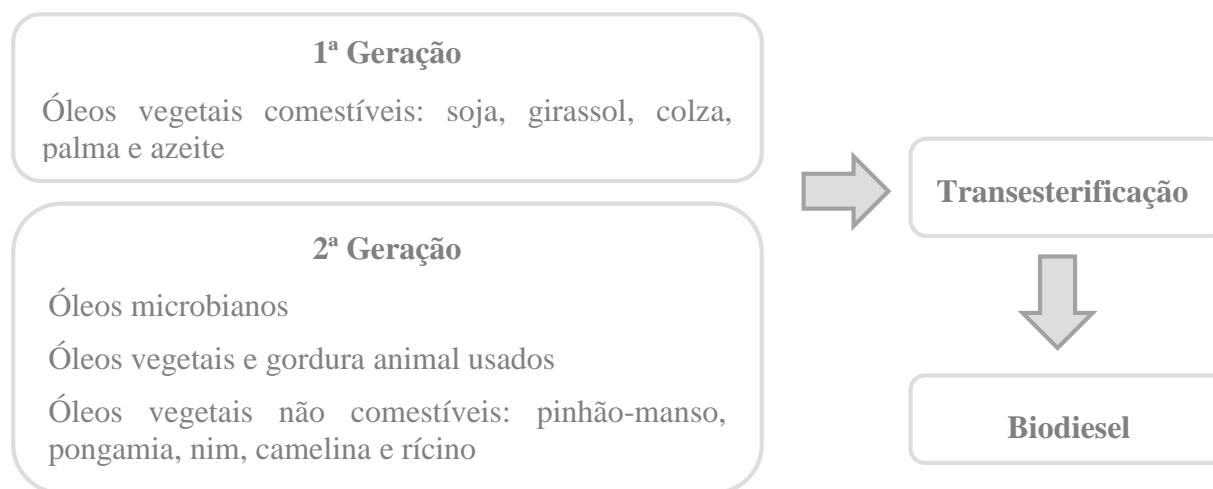


Figura 2. Esquema geral do uso de diversos óleos para a produção de biodiesel de primeira e segunda geração^{1,11,57,129}.

Os óleos usados para a produção de biodiesel são constituídos essencialmente por triglicéridos ou triacilgliceróis (TAG), um tipo específico de lípidos. Os TAG são as moléculas que conseguem acumular maior quantidade de energia nos microrganismos eucarióticos⁵⁴. Estes são formados por uma molécula de glicerol ligada a três ácidos gordos. Por sua vez, os ácidos gordos são ácidos carboxílicos com cadeias alifáticas, que podem ser saturados ou insaturados consoante o número de ligações duplas na respetiva cadeia alifática^{28,55,56,52}. Os ácidos gordos maioritariamente presentes nos óleos usados, ideais para a produção de biodiesel, são os ácidos palmítico (C_{16:0}), palmitoleico (C_{16:1}), esteárico (C_{18:0}), oleico (C_{18:1}), linoleico (C_{18:2}) e linolénico (C_{18:3})^{52,57,27}.

No entanto, normalmente tanto os óleos vegetais ou animais, assim como os óleos microbianos apresentam viscosidades demasiado elevadas para serem usados como substitutos do diesel fóssil. O método mais utilizado para a resolução deste problema é a transesterificação, apesar de existirem outros como a diluição, microemulsificação ou pirólise^{1,58, 55,52}. Através deste processo também é possível baixar o ponto de inflamação e aumentar o número de cetano⁵⁵

A transesterificação, também designada por alcoólise, é a reação reversível que ocorre entre um TAG e um álcool para formar ésteres alquila de ácidos gordos (biodiesel), na presença de um catalisador. Por se tratar de uma reação reversível, é necessário usar álcool em excesso, de modo

a mudar o equilíbrio da reação para o sentido da formação dos produtos ^{1,14,27,52,55-58}. A reação geral de transesterificação está representada na Figura 3.

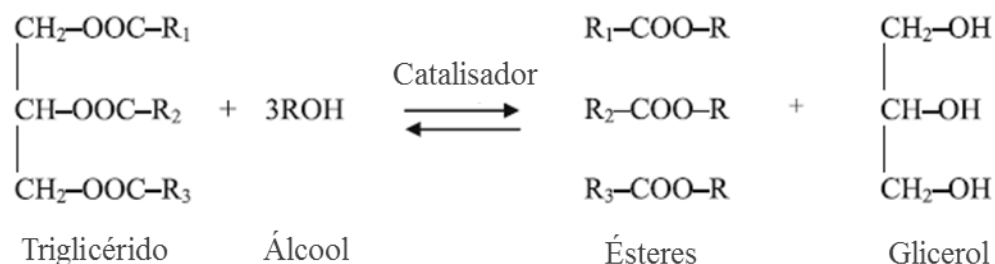


Figura 3. Representação esquemática da reação geral de transesterificação de TAG com álcool. (Adaptado de Demirbas, 2008 ¹)

Mais precisamente, o processo de transesterificação consiste em três reações reversíveis consecutivas, com a formação intermediária de diglicerídeos e monoglicerídeos, como representado na Figura 4 ^{55,56,58}. Com conversão total, cada mole de TAG dá origem a três moles de ésteres alquilo e uma mole de glicerol ⁵⁵.

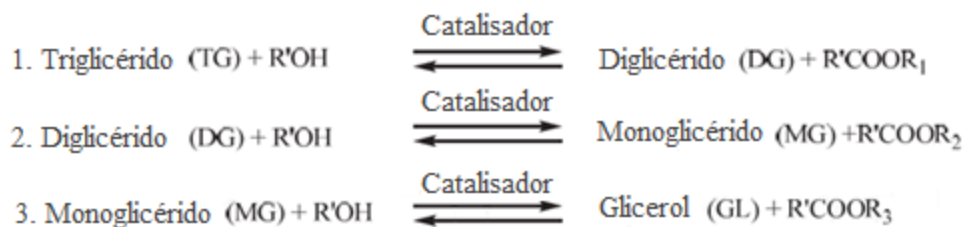


Figura 4. Representação esquemática das três reações consecutivas do processo de transesterificação de TAG com álcool. (Adaptado de Lukovi *et al.*, 2009 ⁵⁵)

O álcool mais utilizado para o processo de transesterificação é o metanol, ou seja, é realizada uma metanólise. Através das três reações consecutivas e reversíveis de TAG com o metanol, ocorre a formação de ésteres metílicos de ácidos gordos ^{1,14,27,52,55-58}.

Geralmente, a transesterificação é feita na presença de um catalisador, permitindo melhorar a velocidade de reação e respetivo rendimento. A reação pode ser catalisada com a adição de um ácido, uma base ou uma enzima. A utilização de enzimas como biocatalisador, como por exemplo as lípases, têm sido cada vez mais desenvolvida como alternativa aos processos químicos. Isto porque a sua recuperação é mais fácil, são reutilizáveis, são usadas a temperaturas mais baixas, reduzem a produção de resíduos químicos e permitem uma extração do glicerol mais simples ^{1,56,57}.

1.5 Acumulação lipídica em microrganismos oleaginosos

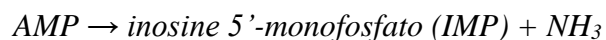
A acumulação de lípidos em microrganismos oleaginosos (MO) ocorre mais frequentemente na presença de excesso de carbono e de um nutriente em concentração limitante. O nutriente limitante mais usado para induzir a acumulação lipídica é o azoto (ver secção 1.6.1) ^{9,27,28,31,32,59}.

No entanto, microrganismos não oleaginosos (MNO) também são capazes de acumular lípidos nas mesmas condições anteriormente referidas, porém só conseguem acumular até 10% da sua biomassa seca em lípidos. A restante fonte de carbono é canalizada para a formação de polissacarídeos, como o amido e o β -glucano ^{31,60}.

Assim, é possível afirmar que o que diferencia os MO dos MNO não é o facto de possuírem um mecanismo de biossíntese lipídica diferente, pois este mecanismo está presente em todos os microrganismos. A diferença está na capacidade que os MO têm de produzir continuamente acetil-coenzima A (acetil-CoA), um precursor da síntese de TAG, no citosol da célula ^{31,60}. Isto porque nos MO a quantidade de citrato mitocondrial, essencial para a produção de acetil-CoA, é três a quatro vezes mais elevada do que nos MNO ³¹.

Enquanto que nos MNO a acetil-CoA é produzida a partir da glicólise, nos MO existe uma fonte adicional de acetil-CoA, pois o excesso de citrato produzido na mitocôndria é transportado desta para o citosol através do ciclo malato/citrato ^{32,60,61}. Porém, quando a concentração de citrato é demasiado alta, este é excretado para o exterior da célula, diminuído o pH do meio e, conseqüentemente, a acumulação de lípidos ³¹.

Durante o ciclo de Krebs, o isocitrato é metabolizado através da ação catalisadora do enzima isocitrato desidrogenase. Por sua vez, a atividade deste enzima é dependente da presença de adenosina monofosfato (AMP), dependência que não se verifica em MNO. A concentração de AMP é regulada através da ação do enzima AMP deaminase, representada na Reação 1 ^{60, 61}.



(Reação 1)

É a atividade deste enzima, AMP deaminase, que é regulada positivamente pela limitação de azoto do meio de crescimento. Logo, o esgotamento do azoto por parte do MO desencadeia

uma série de reações consecutivas e interligadas que resultam na produção de acetil-CoA, tal como representado na Figura 5^{31,60}.

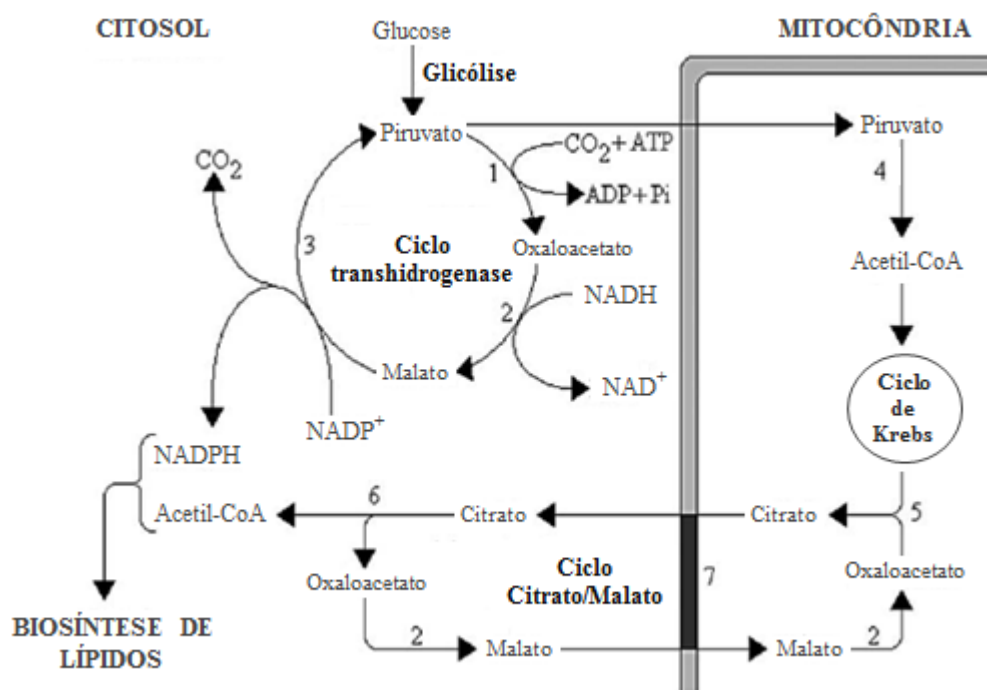


Figura 5. Esquema representativo do fluxo celular de malato de citrato, como precursores de acetil-CoA e NADPH, essenciais para a produção de TAG em MO. Os enzimas utilizados encontram-se numerados de 1 a 7. 1- piruvato descarboxilase, 2- malato desidrogenase, 3- enzima málico, 4- piruvato desidrogenase, 5- citrato sintase, 6- ATP citrato liase, 7- citrato/malato translocase. (Adaptado de Ratledge, 2004⁶⁰)

Assim, quando se esgota o azoto, há uma diminuição da quantidade celular de AMP, incluindo na mitocôndria, pois a atividade do enzima AMP deaminase aumenta até cinco vezes mais. Conseqüentemente, a atividade do enzima isocitrato desidrogenase na mitocôndria, que é dependente da presença de AMP, diminui. Logo, o isocitrato não é metabolizado, o que leva à sua acumulação, sendo necessária a ação do enzima aconitase, que catalisa a isomerização de isocitrato em citrato, equilibrando as suas concentrações. A atividade deste enzima resulta num aumento de citrato na mitocôndria. O citrato em excesso é então transferido para o citosol através da ação do enzima citrato translocase, entrando assim no ciclo malato/citrato^{31,60}. Já no citosol o citrato é então clivado pelo ATP-citrato liase (ACL), enzima que não se encontra presente na maioria dos MNO, dando origem à acetil-CoA e ao oxaloacetato (Reação 2)^{32,60,61,28}.

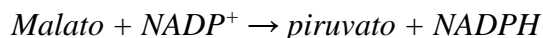


(Reação 2)

A acetil-CoA é posteriormente usada para a síntese de ácidos gordos. Por outro lado, o oxaloacetato é convertido em malato pela enzima malato desidrogenase, voltando a entrar na mitocôndria com a ajuda do enzima malato translocase. Uma vez na mitocôndria, e com a ação do malato desidrogenase, o malato é novamente convertido em oxaloacetato, que com o citrato sintase é transformado em citrato. Assim, é então completado o ciclo malato/citrato, garantindo-se o fluxo contínuo de citrato para a produção de acetil-CoA ^{31,60}.

Para além de possuírem todas as enzimas acima referidas, possibilitando a produção contínua de acetil-CoA, os MO também são capazes de produzir quantidades suficientes de NADPH, um redutor igualmente importante na síntese de TAG ^{60,32}.

A principal fonte de NADPH provém da conversão do malato a piruvato, durante o ciclo transhidrogenase, com a ação do enzima málico (Reação 3), como está representado na figura 3 ⁶⁰⁻⁶².



(Reação 3)

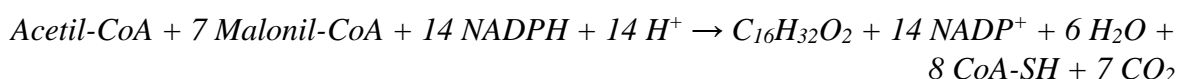
No entanto, algumas leveduras que são conhecidas por serem oleaginosas, como *Lipomyces sp.* e *Candida sp.*, não apresentam o enzima málico. O que sugere a existência de outros mecanismos de produção de NADPH, como a via das pentoses-fosfato ⁶⁰⁻⁶².

Porém, o enzima málico é encontrado na maioria dos MO, e por isso já foi sugerido que este pode formar um complexo enzimático juntamente com o enzima ACL e o complexo ácido gordo sintase (FAS), para facilitar o alongamento dos ácidos gordos ^{32,60}.

1.5.1 Síntese de ácidos gordos

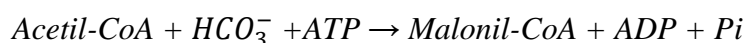
A síntese de ácidos gordos ocorre no citosol e é realizada pelo FAS, que necessita de um fornecimento constante de acetil-CoA e malonil-CoA. Em que o acetil-CoA é a unidade inicial da biossíntese, e o malonil-CoA é a unidade de alongamento que fornece dois carbonos em cada passo do alongamento da cadeia. Como já anteriormente referido, as moléculas de NADPH são essenciais na formação de TAG, isto porque para cada passo de alongamento da cadeia alifática são necessárias também duas moles de NADPH ^{28,60,61}.

Assim, são necessários sete malonil-CoA e 14 NADPH para cada acetil-CoA, de modo a formar um ácido gordo com uma cadeia de 16 carbonos (Reação 4) ⁶³.



(Reação 4)

O enzima malonil-CoA é formado pelo enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), através da condensação de um acetil-CoA com um anião de bicarbonato (Reação 5). O ACC é assim mais um dos enzimas essenciais na biossíntese de TAG ³².



(Reação 5)

Os ácidos gordos produzidos no FAS são saturados e têm 14 ou 16 carbonos, sendo que posteriores reações de alongamento ou desnaturação ocorrem no reticulo endoplasmático, originando uma ampla variedade de ácidos gordos saturados, insaturados ou polinsaturados, maioritariamente com 16 e 18 carbonos (Figura 6) ^{32,60}.

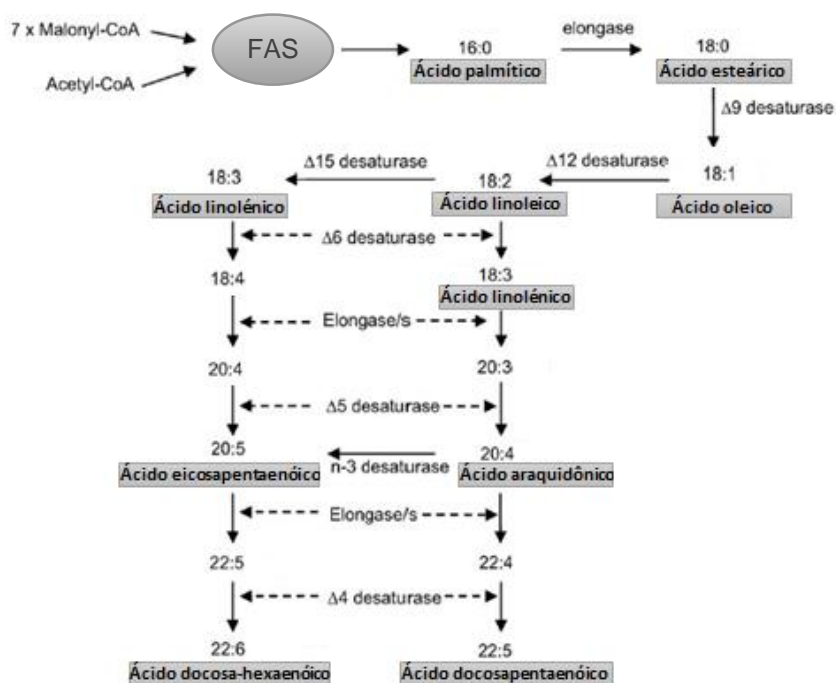
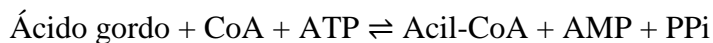


Figura 6. Esquema da biossíntese de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados. (Adaptado de Ratledge, 2004 ⁶⁰)

1.5.2 Síntese de triglicéridos

A síntese de TAG ocorre no retículo endoplasmático ou nos corpos lipídicos, geralmente através de três acilações, pela acção do enzima aciltransferase ^{31,32,54,59}. O grupo acilo provém do acil-CoA, um composto formado pela ligação do CoA a um ácido gordo, sendo esta reacção catalisada pelo enzima acil-CoA sintetase (Reacção 6) ⁶⁴.



(Reacção 6)

Adicionalmente, a produção de TAG envolve a síntese do ácido fosfatídico (PA) e do diaclicerol (DAG), os dois principais intermediários neste metabolismo, tal como representado na Figura 7 ^{31,32,54,59}.

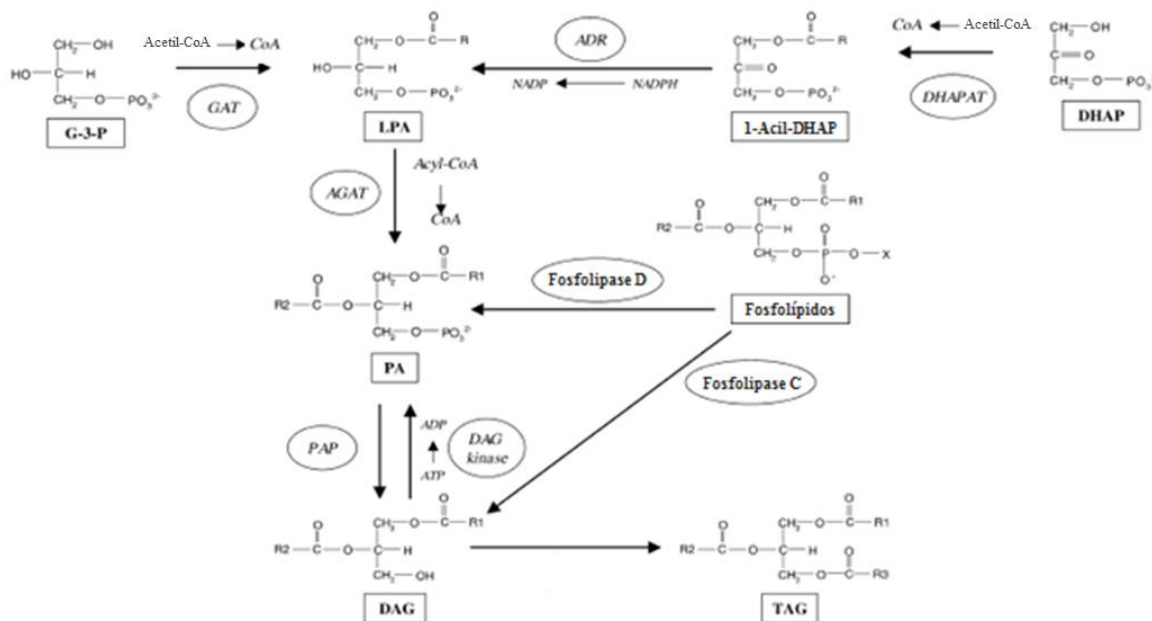


Figura 7. Esquema representativo da biosíntese de TAG. (Adaptado de Sorger *et al.*, 2003⁵⁴)

A formação de PA é precedida pela produção de 1-acil-G-3-P, ou seja, o ácido lisofosfatídico (LPA). Existem duas vias possíveis para a formação de LPA, a via do glicerol-3-fosfato (G-3-P) e a via do dihidroxiacetona-fosfato (DHAP). Na primeira via, o G-3-P sofre uma acilação pela G-3-P aciltransferase (GAT) originando o LPA. Este G-3-P é derivado de um glicerol por ação do enzima glicerol quinase. Por sua vez, na segunda via o DHAP é acilado pelo DHAP aciltransferase (DHAPAT), formando-se o 1-acil-DHAP, que depois é reduzido a LPA pela ação do enzima 1-acil-DHAP redutase (ADR). Depois de formado por uma destas duas alternativas, o LPA sofre acilação pelo enzima 1-acil-G-3-P aciltransferase (AGAT), resultando na produção de PA. O PA pode ainda ser produzido a partir de fosfolípidos, através da ação do enzima fosfolipase D. Através da desfosforilação do PA, uma reação catalisada pelo enzima fosfatase do ácido fosfatídico, é formado o DAG, o segundo intermediário do metabolismo de produção de TAG^{31,32,54,65}.

Por último, a acilação do DAG para formar TAG pode ser feita por duas vias diferentes, uma dependente de acil-CoA e outra independente. Na primeira, o grupo acil do acil-CoA é transferido para o DAG pelo enzima diacilglicerol aciltransferase, originando-se o TAG. Por sua vez, na via independente de acil-CoA o grupo acilo é proveniente de fosfolípidos. O DAG sofre

assim uma acilação pelo enzima fosfolipido-diaglicerol aciltransferase, formando-se os TAG^{31,32,65}.

1.6 Fatores influentes na acumulação lipídica

São vários os fatores que influenciam a acumulação de lípidos neutros por parte de microrganismos oleaginosos, tais como o oxigênio dissolvido, os nutrientes disponíveis, o pH, a temperatura e as concentrações de íons metálicos e sais inorgânicos^{9,27,31,32,66}.

A temperatura, para além de influenciar na acumulação lipídica, também afeta a composição de ácidos gordos produzidos, sendo que idealmente deve ser mantida entre 25 °C e 30 °C. Porém, a temperatura mais usada para o cultivo de *R. toruloides* é 30 °C^{27,31,66}.

O valor de pH ótimo difere consoante o microrganismo usado, pois os MO podem acumular lípidos com valores de pH entre 3 e 7. Para a levedura *R. toruloides* o pH que favorece a acumulação de lípidos situa-se entre 5,5 e 6^{31,35,66,67}.

Contudo, a acumulação lipídica só é iniciada quando um nutriente essencial para a proliferação celular se torna limitante no meio de crescimento. Alguns desses nutrientes essenciais para o crescimento são o azoto, magnésio, zinco, ferro e fósforo. No entanto, o azoto é o nutriente mais utilizado como fator limitante, sendo esta condição de cultura normalmente referida como rácio carbono/azoto (C/N). Este parâmetro é fácil de controlar e apresenta elevados rendimentos de produção de lípidos. A concentração de alguns microelementos como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , e Ca^{2+} também pode melhorar significativamente a produção de lípidos, pois estes aumentam a atividade do enzima ACL^{27,31,66}. Este estudo foi focado nas condições de transferência de oxigênio e no rácio C/N, sendo estes os parâmetros a seguir desenvolvidos.

1.6.1 Rácio molar C/N

Visto que a maioria dos MO têm taxas específicas de crescimento baixas, o sucesso da uma boa acumulação lipídica passa pelo aumento dessa taxa, de modo a produzir elevadas concentrações de biomassa no menor espaço de tempo possível. Deste modo, o rácio molar C/N deve ser otimizado de modo a que haja uma alta proliferação celular, seguida de uma fase estacionária devido ao esgotamento do azoto, em que o carbono se encontra em excesso. Logo, no início do crescimento o azoto presente no meio é usado para a síntese de proteínas e ácidos

nucleicos, enquanto o carbono é usado para processos energéticos e anabólicos. Quanto o azoto se torna limitante, a proliferação cessa e a fonte de carbono é diretamente canalizada para a síntese de lípidos^{9,27,31}. Por isso, é necessário utilizar rácios C/N altos quando se trabalha em modo descontínuo, de forma a haver a limitação do azoto. Com a levedura *R. toruloides* normalmente são usados rácios C/N entre 50 e 140^{15,27,28,31,66,68,69}. Porém, Li *et al.* (2006) otimizaram a composição de nutrientes ótima para a acumulação lipídica pela *R. toruloides*, concluindo que o melhor rácio C/N era de 420, com 70g/L de glucose, 0.1g/L de (NH₄)₂SO₄ e 0.75g/L de extrato de levedura⁶⁶. Em 2009, Liu *et al.* também usaram um rácio C/N mais elevado, correspondendo a 340⁷⁰.

No entanto, através do modo de cultura em modo semi-descontínuo é possível controlar melhor o rácio C/N ao longo do tempo. Li *et al.* (2007) reportaram que com este modo de operação se obtêm valores de rendimentos lipídicos elevados pela levedura *R. toruloides*, em que no início da cultura se utilizam rácios C/N baixos, para promover a formação de biomassa, sendo o rácio C/N alterado com uma ou mais adições de soluções de glucose e sem adição de azoto^{29,68}. Wiebe *et al.* (2012) também conseguiram obter um rendimento em lípidos ($Y_{L/x}$) de 75% (p/p) a funcionar em modo *fed-batch*, em que com um rácio inicial de 40, através de adições de glucose resultou no aumento gradual do rácio até 100. Com a mesma cultura, a funcionar em modo descontínuo foram testados 2 rácios C/N diferentes, 40 e 80, obtendo-se a um $Y_{L/x}$ de 23% e 61% (p/p), respetivamente⁶⁸.

1.6.2 Oxigénio

O arejamento é um fator essencial em crescimentos de microrganismos aeróbios, tal como a levedura *R. toruloides*. Logo, é necessário controlar o oxigénio dissolvido no meio, através do caudal de arejamento e agitação, porque o fornecimento de menores quantidades de oxigénio do que aquelas que o microrganismo precisa pode torna-se no principal fator limitante para um bom crescimento, e para uma elevada produção de lípidos neutros, no caso de leveduras oleaginosas⁷¹⁻⁷⁴.

Para a acumulação de lípidos com a levedura *R. toruloides*, normalmente são utilizados caudais de arejamento altos, por esta ser uma levedura estritamente aeróbia. Geralmente, são utilizados caudais entre 0,8 vvm e 2,0 vvm, sendo que a maioria dos autores referem que utilizam

o caudal de arejamento de 1,0 vvm. Vários autores indicam que ajustam a agitação de modo a regular a percentagem de oxigénio dissolvido (% dO₂) de modo a que esta não entre em valores limitativos, ou seja, que se mantenha sempre acima de 30 % e idealmente entre 50 % e 80 %^{36,38,39,75-77}. Assim, a eficiência de transferência de massa de oxigénio torna-se crucial nestes sistemas aeróbios.

1.6.2.1 Transferência de massa de oxigénio

As culturas de microrganismo em bioreatores com arejamento podem ser caracterizadas como sistemas com as fases gasosa, líquida e sólida. Nestes sistemas, constituídos por vários passos que apresentam diferentes resistências à transferência de massa, o oxigénio é transferido a partir da bolha de gás para a fase líquida e depois consumido pelo microrganismo, onde é transportado para o local da fosforilação oxidativa (Figura 8)^{78,79}.

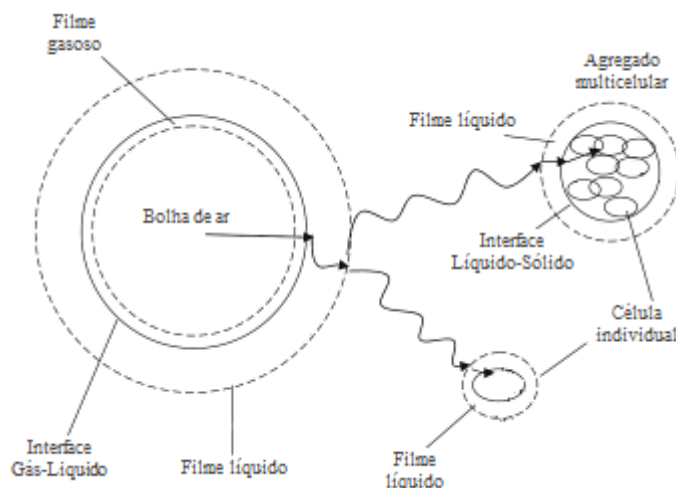


Figura 8. Representação esquemática da transferência de massa de oxigénio, num reator biológico com arejamento. (Adaptado de Flickinger, 2013⁷⁹)

Tendo em conta que existe uma boa agitação do meio, pode-se assumir que o transporte de oxigénio na fase líquida é rápido, podendo ser desprezado. Tal como a resistência no filme líquido à volta da célula, porque por esta ser de dimensões reduzidas a força motriz necessária para transportar o oxigénio para o organismo é baixa. A resistência intracelular também é desprezável, por se tratar de curtas distâncias^{79,80}.

Assim, a principal resistência à transferência de massa de oxigênio no meio de cultura encontra-se no filme líquido à volta da bolha de ar, tratando-se de uma transferência de massa gás-líquido^{79,80}.

A transferência da massa gás-líquido é o modelo mais estudado. Neste sistema, quando o oxigênio é transferido na interface gás-líquido forma-se um gradiente de pressão parcial no filme da fase gasosa, ao mesmo tempo que no filme da fase líquida se forma um gradiente de concentração de oxigênio⁷⁸⁻⁸¹. Mas, devido ao facto das pressões parciais de oxigênio na interface são difíceis de medir, são usados coeficientes de massa globais para as fases líquida e gasosa (K_L e K_G). No entanto, assume-se que a resistência à transferência de massa no lado gasoso da interface pode ser desprezada⁷⁸⁻⁸⁰. Contudo, é mais fácil determinar experimentalmente o produto do K_L com a , em que a é a área da interface gás-líquido por unidade de volume do líquido. Assim, o valor de K_La corresponde ao coeficiente de transferência de massa volumétrico, determinado com base na Equação 1, em que C^* corresponde à concentração de saturação de oxigênio dissolvido e C à concentração de oxigênio dissolvido no líquido^{78-80,82}.

$$\frac{dC}{dt} = K_La (C^* - C)$$

(Equação 1)

1.6.2.2 Vetores de oxigênio

A eficiência do arejamento do meio de cultura depende fortemente da solubilização e taxa de difusão do oxigênio no meio. A transferência de oxigênio é otimizada essencialmente pela diminuição da distância entre as bolhas de ar e o microrganismo, ou seja, reduzindo a espessura do filme líquido à volta das bolhas e das células. Geralmente, elevadas velocidades de agitação no bioreator resolveriam o problema, mas podem também aumentar a sensibilidade das células e levar à lise celular^{72, 83, 71}.

No entanto, uma possível forma de aumentar esta eficiência, sem aumentar a agitação ou o caudal de ar, é através do uso de vetores de oxigênio não tóxicos para os microrganismos, como os hidrocarbonetos, perfluorcarbonos ou óleos de silicone^{45,71,78,83,84}. A solubilidade do oxigênio nestes compostos hidrofóbicos é 10 a 20 vezes mais alta do que em água^{72,79,85}.

Os hidrocarbonetos, como o n-dodecano, o n-hexano e o hexadecano, são os vetores mais usados em larga escala, devido ao seu preço mais baixo^{84,85}. Os perfluorcarbonos mais usados são a perfluorodecalina e o brometo de perfluorooctilo⁸⁶.

Assim, com a adição dos vetores de oxigênio ao meio de cultura, passa-se a ter 4 fases diferentes no reator, as fases gasosa, aquosa, orgânica e sólida. Deste modo, existem cinco diferentes formas de transferir o oxigênio para os microrganismos, como esquematizado na Figura 9. A transferência de oxigênio ocorre diretamente da bolha de ar para a célula, com a célula adsorvida à bolha ou não, ou com a ajuda do vetor, adsorvido ou não à bolha, ou simultaneamente adsorvido à bolha de ar e à célula^{72,78,83}.

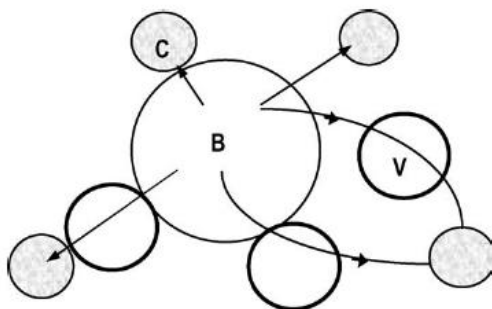


Figura 9. Representação esquemática dos cinco mecanismos possíveis para a transferência de massa de oxigênio na presença de um vetor de oxigênio. C - célula; B - bolha de ar; V - vetor de oxigênio (Adaptado de Cascaval *et al.*, 2006⁷²)

Entres estes mecanismos de transferência de oxigênio, o mais provável de acontecer é aquele em que o oxigênio é transferido através do vetor que está adsorvido na bolha de ar e depois pela fase aquosa até chegar ao microrganismo. Neste processo a principal resistência à transferência de oxigênio é a difusão deste na interfase gás-liquido entre o vetor e a fase aquosa. Assim, o K_{La} pode também ser usado para descrever a transferência de oxigênio nestes sistemas^{72,83}.

1.7 Objetivos

Esta dissertação de mestrado foi realizada no laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA), localizado na Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT) e integrado no Centro de Investigação Marinha e Ambiental (CIMA), da Universidade do Algarve.

Este trabalho teve como objetivo principal a otimização das condições de crescimento e de acumulação de lípidos da levedura *R. toruloides* CECT 1499, usando resíduos de alfarroba como fonte de carbono, com o intuito de se produzir óleo microbiano rico em ácidos gordos, que pode ser usado para a produção de biodiesel de segunda geração.

Os objetivos específicos foram:

- Determinar a melhor concentração de fonte de carbono para a produção de biomassa no inóculo.
- Selecionar o melhor rácio C/N para o crescimento e produção de lípidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499.
- Estudar a influência do n-dodecano como vetor de oxigénio na transferência de oxigénio.
- Avaliar o efeito das condições de arejamento e do uso de n-dodecano na produção de biomassa e de lípidos, em reator biológico STR.
- Avaliar o crescimento e produção de lípidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em modo *batch* e *fed-batch*.
- Caracterizar o perfil de ácidos gordos produzidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499.

2 Materiais e métodos

2.1 Matéria-prima

Os resíduos de alfarroba foram a matéria-prima selecionada para ser utilizada como substrato para o crescimento da levedura *R. toruloides*. Estes resíduos, denominados por *kibbles*, foram gentilmente fornecidos pela Empresa Industrial Fareense, Lda.

2.1.1 Extração dos açúcares solúveis da alfarroba

A extração aquosa de açúcares foi realizada segundo o método otimizado por Manso *et al.* (2010)⁸⁷ e Lima-Costa *et al.* (2012)⁴⁸, através da dissolução da farinha de alfarroba, a qual é obtida com a moagem de *kibbles*.

Para isso, foi necessário secar os *kibbles* de alfarroba numa estufa (Binder FD53,EUA) a 50 ± 1 °C durante a noite. Depois de serem retirados da estufa e arrefecerem, procedeu-se à moagem dos *kibbles* com um moinho elétrico (IKA-MF 10B, Alemanha), até se obter uma farinha fina.

De seguida, foi preparada uma solução com um rácio de 30 % (p/v) de farinha de alfarroba e água destilada. A solução aquosa foi agitada numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 150rpm, a 30 ± 1 °C, durante 1 h. Após a extração, procedeu-se à ultracentrifugação da solução resultante, numa ultracentrifuga (Beckman Coulter J2-MC, EUA) com um rotor JA-14, a 12000rpm, a 4 °C, durante 25 min. Os sólidos ainda possivelmente presentes no sobrenadante obtido foram removidos por filtração a vácuo, com filtros de papel de porosidade de 0,45 µm (Whatman 1).

Geralmente, o extrato obtido apresenta uma concentração de açúcares totais dissolvidos de cerca de 140 g/L. Logo, caso seja necessária a preparação de meios de cultura com concentrações de açúcares superiores, deve-se concentrar este mesmo extrato. Para isso, é utilizado um evaporador rotativo (Heidolph 94200, Alemanha), com o banho entre 75 e 80 °C. O extrato final foi armazenado a -21 ± 1 °C, até à sua posterior utilização.

2.2 Microrganismo e sua conservação

O microrganismo usado para a realização deste estudo foi a levedura *Rhodospordium toruloides* CECT 1499, adquirida ao banco de Coleções Espanholas de Cultivo Tipo (CECT), pertencente à Universidade de Valência, situada em Espanha.

A levedura foi repicada para placas de *Petri* com meio sólido *Potato Dextrose Agar* PDA (ver secção 2.3.1), incubadas numa estufa (Selecta, Espanha) durante 72 h a 30 ± 1 °C e seguidamente armazenadas a 4 °C. A repicagem foi feita sempre que são preparados pré-inóculos para um novo ensaio. Para conservação a longo prazo, a estirpe foi armazenada em tubos criogénicos a -80 ± 1 °C.

2.3 Meios de cultura e condições de crescimento celular

Todos os meios de cultura preparados foram sujeitos a uma esterilização por autoclavagem (Uniclave 87, Portugal), com calor húmido a 121 ± 1 °C, durante 20 min.

2.3.1 Armazenamento e conservação

Para a conservação e armazenamento da levedura em placas de *Petri* é utilizado o meio sólido *Potato Dextrose Agar* (PDA). Este meio sólido é constituído por 200 mL/L de extrato de batata, 20 g/L de glucose e 20 g/L de agar.

Adicionalmente, para o ensaio da determinação do número de unidades formadoras de colónias (ver secção 2.6.2), a levedura cresceu em placas de *Petri* com meio sólido *Yeast extract Peptone Dextrose* (YPD). O meio YPD é constituído por 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glucose e 20 g/L de agar.

2.3.2 Pré-inóculo e inóculo

Preparou-se um pré-inóculo da levedura *R. toruloides* em meio líquido PDA (200 mL/L de infusão de batata e 20 g/L de glucose). A levedura *R. toruloides*, proveniente de meio sólido, foi inoculada em 40 mL de meio PDA líquido num balão erlenmeyer de 100 mL, em duplicado. O pré-inóculo foi mantido numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 200 rpm, a 30 ± 1 °C, durante 72 h.

Posteriormente, preparou-se o inóculo em meio YPD (10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona) com 15 g/L de açúcares solúveis de extrato de alfarroba. A passagem para este meio do inóculo foi feita em duplicado com 10% (v/v) de suspensão celular do meio PDA líquido, para 200 mL de meio de inóculo, em balões erlenmeyer de 500 mL. O inóculo foi igualmente mantido numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 200 rpm, a 30 ± 1 °C, durante 48 h. Estes tempos de incubação garantiram que fosse possível a levedura proliferar-se o suficiente, para que se iniciasse todos os diferentes ensaios com uma concentração celular de 1×10^7 cel/mL, aproximadamente.

2.3.3 Meio para acumulação lipídica

O meio de cultivo usado neste trabalho baseou-se no meio descrito por Li *et al.* (2006)⁶⁶. A constituição do meio de cultura para acumulação de lípidos diferiu nos diferentes ensaios realizados, consoante o rácio C/N definido. A concentração de açúcares totais do extrato de alfarroba variou entre 15 e 200 g/L, enquanto que a concentração de sulfato de amónio ((NH₄)₂SO₄) variou entre 0,1 e 0,5 g/L. Os restantes constituintes do meio mantiveram-se constantes, o extrato de levedura 0,75 g/L, o sulfato de magnésio (MgSO₄·7H₂O) 1,5 g/L e o fosfato monopotássico (KH₂PO₄) 0,4 g/L.

2.3.4 Crescimento em balão erlenmeyer

Os ensaios para acumulação lipídica em balões erlenmeyer foram realizados em modo descontínuo (*batch*) durante 200 h numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 200 rpm, à temperatura de 30 ± 1 °C. O crescimento foi feito em triplicado com 200 mL de meio em balões erlenmeyer de 500 mL, com uma concentração inicial de 1×10^7 cel/mL, aproximadamente.

Após a inoculação, o crescimento celular, a acumulação lipídica e o consumo de nutrientes foram controlados com a recolha de amostras de 4 em 4 h, nos primeiros dois dias, e nos restantes, de 12 em 12 h. Estas recolhas foram sempre feitas em condições de esterilidade, numa câmara de fluxo laminar (Telstar Bio II A, Espanha) utilizando material esterilizado por autoclavagem (Uniclave 87, Portugal), com calor húmido a 121 ± 1 °C, durante 20 min.

Para cada amostra foram feitas as análises que permitiram acompanhar o perfil de crescimento, produção de metabolitos e consumo de nutrientes, tais como, a leitura da densidade

ótica por espectrofotometria, a determinação do número de unidades formadoras de colónias, a determinação do peso seco, a quantificação de lípidos neutros intracelulares por espectroscopia de fluorescência, a quantificação de açúcares totais por HPLC e a quantificação de ião amónio pelo método fenol-hipoclorito, tal como descrito na secção 2.5.

2.3.5 Crescimento em Reator biológico STR

Os ensaios em reator biológico para acumulação lipídica por parte da *R. toruloides* foram feitos em modo contínuo (*batch*) e em modo semi-contínuo (*fed-batch*), durante 200 h, a 200 rpm, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Foi utilizado um reator biológico mecanicamente agitado (STR) de 2L com 1,5L de volume útil (Applikon, Holanda).

O reator está ligado a uma unidade de controlo externa (Bio Controller, ADI 1030 Applikon, Alemanha) que monitoriza diferentes variáveis do processo, como a temperatura, percentagem de oxigénio dissolvido (%dO₂) e pH. O vaso está equipado com dois dispersores de ar porosos colocados em paralelo, e com uma turbina de *Rushton*, além das sondas de temperatura, pH e de O₂ dissolvido. A cultura foi mantida a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ através de uma camisa de circulação de água, ligada a um termocirculador.

O caudal de ar que foi controlado por um fluxímetro, que se encontra ligado a uma bomba de ar. O ar utilizado no arejamento da cultura foi esterilizado através da sua passagem por um filtro estéril de membrana hidrofóbica (Millipore), com uma porosidade de 0,2 µm. Os gases libertados para o exterior passaram por um filtro estéril de membrana hidrofóbica (Millipore), com uma porosidade de 0,2 µm, que se encontra a jusante do condensador, o qual é utilizado para minimizar a perda de meio líquido.

Após a inoculação com uma concentração celular de 1×10^7 cel/mL, foram recolhidas amostras tal como nos ensaio em balão erlenmeyer. A recolha destas amostras foi feita, em condições de esterilidade, para frascos previamente esterilizados por autoclavagem (Uniclave 87, Portugal). Para cada amostra foi realizada a leitura da densidade ótica por espectrofotometria, a determinação do número de unidades formadoras de colónias, a determinação do peso seco, a quantificação de lípidos neutros por espectroscopia de fluorescência, a quantificação de açúcares totais solúveis por HPLC e a quantificação de ião amónio pelo método fenol-hipoclorito. Foi ainda

feita a extração dos lípidos totais pelo método de Folch e a caracterização do perfil em ácidos gordos por HPLC.

A cultura foi acompanhada com o registo de 2 em 2 h dos valores de % dO₂ e pH e da medição diária da taxa respiratória e do K_{LA}.

2.4 Ensaios Experimentais

2.4.1 Efeito da concentração de fonte de carbono na produção de biomassa

Foram realizados ensaios em balão erlenmeyer para a determinação da concentração de açúcar (fonte de carbono) que apresentava maior crescimento da levedura *R. toruloides*. Este ensaio também teve o objetivo de definir a curva de crescimento da levedura *R. toruloides* no meio selecionado, de modo a determinar o tempo necessário para se atingir a parte final da fase exponencial e em que a viabilidade celular é máxima, altura em que se deve inocular o meio de acumulação lipídica.

Para isso, foram testados em meio YPD (10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona), diferentes concentrações de açúcares totais de alfarroba, 15 g/L, 70 g/L e 200 g/L.

Os ensaios foram realizados durante 104 horas em balão erlenmeyer de 500 mL, com 200 mL de meio, a 30 ± 1 °C e 200 rpm, em triplicado.

2.4.2 Determinação do melhor rácio C/N para produção de lípidos

Foram realizados ensaios para identificar o rácio C/N que possibilita a obtenção de uma maior acumulação de lípidos pela levedura *R. toruloides*. Assim, foram usadas diferentes concentrações de açúcares totais de alfarroba como fonte de carbono, entre 15 e 200 g/L, mantendo constante a 0,1 g/L a concentração de sulfato de amónio como principal fonte de azoto, sendo os rácios C/N testados de 70, 240, 330, 700 e 930.

Foi ainda efetuado um ensaio em que a concentração de sulfato de amónio foi 0,5 g/L, originando rácios C/N de 180, 390 e 520. Os restantes constituintes do meio foram iguais em todos os ensaios e estão descritos na secção 2.3.3.

Os ensaios foram realizados durante 200 horas em balão erlenmeyer de 500 mL, com 200 mL de meio, a 30 ± 1 °C e 200 rpm, em triplicado.

2.4.3 Estratégias para aumentar a acumulação lipídica

2.4.3.1 Influência do n-dodecano como vetor de oxigénio no K_{La}

Antes de se iniciar crescimentos da levedura *R. toruloides* CECT 1499 em reator biológico STR, primeiro foram feitos ensaios com água destilada de modo a avaliar o efeito que o caudal de arejamento e o uso de vetor de oxigénio têm na transferência de massa de oxigénio.

Para isso foi usado um reator biológico STR de 2 L, com um volume útil de 1,5 L, a uma temperatura de 30 ± 1 °C, com uma velocidade de agitação de 200 rpm, tal como nos crescimentos celulares. Foram testados dois caudais de arejamento, 0,3 e 0,75 vvm, com ou sem a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano, determinando-se o K_{La} pelo método dinâmico, tal como descrito na secção 2.5.5.

2.4.3.2 Efeito do oxigénio na produção de lípidos

De modo a avaliar o efeito do oxigénio no crescimento e na produção de lípidos por parte da levedura *R. toruloides* CECT 1499, foram realizados três ensaios em reator biológico STR de 2 L, em modo *batch*, em que se variaram as condições de arejamento. O primeiro foi realizado com baixo caudal de arejamento, 0,3 vvm, o segundo com um elevado caudal de arejamento, 0,75 vvm, e o terceiro igualmente com 0,75vvm e a adição de um vetor de oxigénio, o n-dodecano na concentração de 1 % (v/v).

Para a realização destes ensaios foi usado o rácio C/N de 330, correspondente a 70 g/L de açúcares totais de alfarroba e 0,1 g/L de sulfato de amónio, com os restantes constituintes do meio como descritos na secção 2.3.3. Os ensaios tiveram a duração de 200 horas, com a agitação mantida a 200 rpm e a temperatura a 30 ± 1 °C, tal como descrito na secção 2.3.5.

2.4.3.3 Crescimento e produção de lípidos pela levedura *R. toruloides* em modo *Fed-batch*

Como último ensaio, foi feito um crescimento em modo *fed-batch* em reator biológico STR de 2 L, de modo a aumentar a produção de lípidos, não limitando a concentração de fonte de carbono e mantendo constante o rácio C/N inicial em 330. Vários são os autores que afirmam que com este modo de operação é possível aumentar a acumulação lipídica^{29,68,75}.

Assim, tal como nos outros ensaios, este ensaio foi realizado com um rácio C/N inicial de 330, com 70 g/L de açúcares totais de alfarroba, e foram feitas adições de 30 g/L de extrato de alfarroba às 48 e 72 h. Foram recolhidas amostras antes e depois das adições. Neste ensaio foi usado o caudal de arejamento de 0,75 vvm, com a adição de 1% (v/v) de n-dodecano, com uma agitação de 200 rpm e a temperatura 30 ± 1 °C. O ensaio decorreu tal como descrito na secção 2.3.5.

2.5 Métodos analíticos

2.5.1 Leitura da densidade ótica

Ao longo de todos os ensaios foi feita a leitura da densidade ótica (DO) de cada amostra recolhida, de modo a acompanhar o crescimento celular. As leituras foram realizadas em triplicado, a um comprimento de onda de 590 nm, num espectrofotómetro (Cintra 202 GBC, Inglaterra), com o *software GBC Spectral*. Como branco foi utilizado o meio de cultura, recolhido antes de este ser inoculado. Tanto as amostras como o branco apresentavam uma diluição de 1:20.

2.5.2 Determinação do número de unidades formadoras de colónias

Através da determinação do número de unidades formadoras de colónias (UFC), foi possível estimar o número de células viáveis presentes na suspensão celular. Para isso, foram usados diariamente 100 µL de amostra recolhida. Este volume foi adicionado a 9,9 mL de tampão fosfato salino (PBS) previamente esterilizado, correspondendo a uma diluição de $1:10^2$. Depois de esta suspensão ser homogeneizada por agitação num vortex (VELP Scientifica, Itália), é retirado 1 mL e adicionado a 9 mL de PBS estéril, e assim sucessivamente, até se obter diluições de $1:10^3$, $1:10^4$ e $1:10^5$. Após a realização de todas as diluições necessárias, foram adicionados 20 µL de cada diluição, em triplicado, em placas de *Petri* com meio sólido YDP. Todo o processo foi feito em condições de esterilidade, numa camara de fluxo laminar (Telstar Bio II A, Espanha) ou com um bico de *Bunsen*, utilizando material estéril. Passadas 72 h, foi possível contar as colónias presentes, que deverão ter uma média mínima de 10, para que os resultados sejam significativos. O número total de leveduras presentes no meio de ensaio foi depois determinado com a multiplicação do número de colónias pelo fator de diluição.

2.5.3 Determinação do peso seco

Para a determinação de pesos secos em ensaios em balões erlenmeyer, foram retiradas amostras de 1,2 mL, em triplicado, para tubos de eppendorf de 1,5 mL, previamente secos numa estufa (Binder FD53, EUA), a 50 ± 1 °C, durante pelo menos 24 h, e pesados numa balança analítica de precisão (XB 120A Precisa, Suíça), depois de arrefecidos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas (Eppendorf AG, Centrifuge 5415 D, Alemanha) a 13000 rpm durante 10 min.

Por sua vez, em ensaios em reator biológico, foram recolhidas amostras de 5 mL, para tubos de centrífuga de 15 mL, que seguidamente foram centrifugadas (Hettrich Zentrifugen Universal 320, Alemanha) a 5000 rpm durante 20 min.

Em ambos os casos, o *pellet* resultante foi novamente centrifugado com um impulso, e em seguida foi retirado o sobrenadante residual ainda presente nos tubos de centrífuga. Os tubos contendo o *pellet*, foram depois colocados a secar na estufa (Binder FD53, EUA), 50 ± 1 °C, durante 72 h. Depois de arrefecidos à temperatura ambiente, os tubos foram pesados na balança analítica de precisão (XB 120A Precisa, Suíça). O peso seco corresponderá à diferença entre a pesagem do tubo com as células e só o tubo.

Os sobrenadantes resultantes da centrifugação foram armazenados a -21 ± 1 °C, para posterior análise dos açúcares solúveis e iões amónio presentes (secções 2.5.5 e 2.5.6, respetivamente).

2.5.4 Determinação da taxa respiratória

A taxa respiratória (TR) representa o consumo de oxigénio por unidade de volume e por unidade de tempo, é expressa em $\mu\text{molO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$ e é calculada através de uma regressão linear entre a percentagem de oxigénio dissolvido (%dO₂) e o tempo. Para isso, o arejamento foi interrompido e de seguida registou-se a variação dos valores de % dO₂ com o tempo. Para ser possível exprimir os valores de taxa respiratória em $\mu\text{molO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$, deve-se ter em conta que a concentração de oxigénio em condições saturantes, à temperatura de 25°C e pressão constante de 1 atm, é 244 $\mu\text{mol/L}$. O valor da taxa respiratória corresponderá ao declive da regressão linear obtida.

Para calcular a taxa respiratória específica (TR_{esp}) divide-se a taxa respiratória pela concentração de biomassa no tempo da respetiva medição. Este parâmetro representa a taxa de consumo de oxigénio por unidade de biomassa e por unidade de tempo, expresso em $\mu\text{molO}_2/\text{g}\cdot\text{min}$.

Este procedimento é realizado diariamente e apenas em ensaios em reator biológico STR.

2.5.5 Determinação do coeficiente de transferência de massa

O coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigénio (K_{LA}) foi calculado através do método dinâmico^{82,88}, aplicado a sistemas biológicos.

Este método é constituído por duas fases, em que a primeira consiste no corte do arejamento do reator STR, durante o crescimento microbiano, onde se determina a taxa respiratória, como descrito no ponto anterior. Após o abaixamento da concentração do oxigénio dissolvido na cultura (% dO_2), sem que este atinja níveis limitativos (aproximadamente 20 - 30 %), a oxigenação é retomada, Assim que a % dO_2 começa a aumentar registam-se esses mesmos valores ao longo do tempo.

O K_{LA} é obtido através da Equação 2, em que C^* corresponde à concentração de oxigénio dissolvido no equilíbrio e C à concentração de oxigénio dissolvido no meio.

$$\frac{dC}{dt} = K_{LA} (C^* - C)$$

(Equação 2)

Depois de integrar a Equação 2, é possível determinar a regressão linear do valor de $\ln(C^* - C)$ em função do tempo. Logo, o K_{LA} é igual ao simétrico do declive obtido.

Tal como a taxa respiratória, o K_{LA} foi medido diariamente ao longo de cada crescimento em reator biológico STR. Para medir o K_{LA} do meio antes de este ser inoculado, a remoção do oxigénio foi efetuada com a adição de azoto gasoso até se atingir uma % dO_2 próxima de 0 %.

2.5.6 Quantificação de lípidos neutros

A quantificação dos lípidos neutros acumulados pela levedura é feita por espectroscopia de fluorescência, com base no método descrito por Kimura *et al.* (2004)⁸⁹. Este método caracteriza-

se pela rápida estimativa da quantidade de lípidos corados por um corante lipofílico, como o Vermelho de Nilo, que emite fluorescência quando ligado aos lípidos neutros.

A solução corante utilizada foi preparada com a dissolução de Vermelho de Nilo em acetona, com uma concentração de 0,1 mg/mL.

De seguida são realizadas as leituras das amostras de suspensão celular recolhidas ao longo do crescimento, em triplicado. Estas amostras são analisadas com um fluorímetro (F-4500, Hitachi), com um comprimento de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão entre 400 e 700 nm, através do *software FL solutions v2.0*.

Para se obter o valor de fluorescência de cada amostra começa-se por registar o espectro de uma solução com 100 µL de amostra e 2 mL de PBS com 0,15 M de KCl, numa cuvette de quartzo. Posteriormente, adiciona-se à mesma amostra 10 µL de solução corante. Após 5 min de reação, é feita a leitura do novo espectro. Assim, o valor de fluorescência da amostra é obtido através da subtração entre o espectro com solução corante e o espectro sem solução corante. Este valor é expresso em unidades de fluorescência (UF) por unidade de volume e corresponde ao máximo do pico entre os comprimentos de 565 e 585 nm.

De modo a calcular a concentração de lípidos neutros em g/L, determinou-se uma curva padrão usando várias concentrações de trioleína, entre 0 e 5g/L. Foi usada a trioleína (C₅₇H₁₀₄O₆) devido ao facto de esta ser um TAG constituído por uma molécula de glicerol e três moléculas de ácido oleico ⁹⁰.

2.5.7 Quantificação de açúcares solúveis

Os açúcares solúveis no meio (frutose, glucose e sacarose) são determinados por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Para isso, o sobrenadante obtido com a centrifugação das amostras para o peso seco (secção 2.5.3) foi filtrado com um filtro de membrana hidrofóbica (Millipore), com uma porosidade de 0,2 µm, para *vials*, frascos específicos para o equipamento de HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom).

Este equipamento é constituído por uma coluna cromatográfica (Aminex HPX-87P Biorad) ligada a uma pré-coluna (Carbo-P Biorad) e a um forno externo (L-2300). O aparelho é também composto por uma bomba (L-2130), um auto-injetor (L-2200), um detetor (IR L-2490).

O eluente utilizado nesta coluna foi preparado com a adição de 692 µl de uma solução contendo 10 mM de HNO₃, a 1 L de água Milli-Q. De seguida, o eluente foi sonicado num banho de sonicação (Ultrason - Salecta) durante 30 min, para a remoção de todas as bolhas de ar. As análises de quantificação de açúcares foram realizadas a 83 °C, com um fluxo de 0,5 ml/min, durante 20 min.

Para a determinação da concentração de cada açúcar solúvel foram determinadas curvas padrão com sacarose (0 - 110 g/L), frutose (0 - 40 g/L) e glucose (0 - 40 g/L), para cada um dos ensaios realizados. Para concentrações de açúcares muito elevadas, procedeu-se à diluição da amostra de 1:5.

2.5.8 Quantificação de ião amónio

O ião amónio foi quantificado através do método do fenol-hipoclorito, descrito por Weatherburn (1967)⁹¹. Este método tem como base o facto de que, na presença de ião amónio, a mistura de uma solução alcalina com uma solução de fenol e nitroprussiato apresenta uma alteração de cor, passando de incolor a azul.

Assim, para se proceder às medições, começou-se por preparar as duas soluções necessárias. Para a solução de fenol e nitroprussiato (solução A) foram adicionadas 10 g de fenol e 50 mg de nitroprussiato para 1 L de água destilada. Por sua vez, a solução de hipoclorito alcalino (solução B) foi preparada com a adição de 5 g de NaOH e 8,2 mL de hipoclorito, para 1 L de água destilada. Ambas as soluções foram preparadas previamente e protegidas da luz.

Para a quantificação foram adicionados em tubos de ensaio 5 mL de solução A, seguidos de 20 µL de amostra de sobrenadante (secção 2.6.3) e por fim 5 mL de solução B. Entre cada adição, agitou-se no vortex (VELP Scientifica, Itália). Foi igualmente preparado um branco, com a adição de 20 µL de água destilada. Seguidamente os tubos foram colocados em banho-maria a 37 ± 1 °C, durante 20 min. Depois de arrefecidos, leu-se a densidade ótica a 625 nm.

A concentração de ião amónio presente nas amostras foi posteriormente determinada através da realização de uma curva padrão, usando-se soluções com diferentes concentrações de (NH₄)₂SO₄, entre 0 e 2 g/L.

2.5.9 Extração de lípidos totais

A extração dos lípidos totais produzidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 foi realizada tendo como base o método descrito por Folch *et al.* (1957) ⁹².

As extrações das amostras obtidas no final dos ensaios em reator biológico STR foram realizadas em triplicado. Para rebentar as células começou-se por descongelar e congelar as amostras 3 vezes, sujeitando-as a vários choques térmicos, e depois foi usado o sonicador de ponta (VC600 VibraCell Ultrasonic Processor, EUA) em cada amostra, durante 5 min, com pulsos de 30 seg, repetindo o procedimento 3 vezes. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Hettich Zentrifugen Universal 320, Alemanha) a 5000 rpm durante 20 minutos, em que se descartou o sobrenadante. Foram adicionados ao pellet 20 mL de uma solução de clorofórmio/metanol 2:1 (v/v), para 1 g de biomassa. A mistura resultante foi homogeneizada num vortex (VELP Scientifica, Itália) durante 5 min e depois centrifugada a 5000 rpm durante 10 min. Seguidamente adicionou-se 1/5 volumes de NaCl a 0,1 % ao sobrenadante resultante, de modo a garantir a separação de fases, e voltou-se a centrifugar a 5000 rpm durante 5 min. A fase inferior foi recolhida e de seguida procedeu-se à evaporação do clorofórmio no evaporador rotativo (Heidolph 94200, Alemanha). O balão utilizado neste processo foi pesado antes e depois, de modo a se obter o rendimento de lípidos totais obtidos pela extração, através da Equação 3.

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa de lípidos extraídos (g)} / \text{massa de células utilizada (g)}) \times 100 \%$$

(Equação 3)

2.5.10 Análise do perfil de ácidos gordos

A análise de perfil de ácidos gordos foi feita por HPLC, sendo necessário proceder-se primeiro à hidrólise dos TAG obtidos após a extração. O método usado para hidrolisar os TAG tem como base o método descrito por Hein *et al.* (1997) ⁹³.

Começou-se por adicionar à amostra obtida na extração 50 mL de uma solução a 0,5 M de KOH dissolvido em etanol 96 %, para 2 g de lípidos obtidos. A mistura resultante foi colocada em ebulição num sistema de aquecimento por refluxo durante 1 h. Posteriormente, adicionou-se 50 mL de água destilada e depois de a mistura arrefecer, o seu pH foi acertado para 5, com a adição de solução a 5M de H₂SO₄. Depois a mistura foi transferida para uma ampola de decantação, à

qual de adicionou 40 mL de clorofórmio e após a separação de fases foi recolhida a fase inferior. A amostra obtida foi concentrada no evaporador rotativo (Heidolph 94200, Alemanha) e de seguida filtrada para um *vial* com um filtro de membrana hidrofóbica (Millipore), com uma porosidade de 0,2 μm .

Para a deteção dos ácidos gordos presentes foi utilizado um aparelho de HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom), com a coluna Alltima Alltech Hi-Load C18 (Grace), ligada a um forno (L-2300), um auto injetor (L-2200), um detetor (IR L-2490) e uma bomba (L-2130). Foi usado um eluente de água/acetoneitrilo (1:99) previamente sonicado durante 30 min (Ultrason - Salecta), a um fluxo de 1,2 mL/min, com o forno a uma temperatura de 35 °C. Como padrões foram utilizados os ácidos oleico, linoleico, palmítico e esteárico, com concentrações entre 0 e 10 g/L.

2.6 Parâmetros cinéticos de crescimento

2.6.1 Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento (μ), em h^{-1} , foi determinada através do *software* informático de modelação *on-line* DMFit (<http://modelling.combase.cc>). Com este *software* foi possível construir modelos de aproximação de crescimento celular e determinar uma regressão linear a partir do logaritmo do peso seco em função do tempo. O declive da regressão obtida corresponde à taxa específica de crescimento.

Adicionalmente, em casos que não foi possível fazer a modelação pelo *software* DMFit, a taxa específica de crescimento foi determinada através da regressão linear do logaritmo do peso seco em função do tempo (h), relativos à fase exponencial de crescimento. Esta relação é obtida com base na Equação 4, em que $X(t)$ corresponde ao peso seco, em g/L, para um determinado tempo (t) e X_0 ao peso seco inicial.

$$X(t) = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \Leftrightarrow \ln(X(t)) = \ln(X_0) + \mu \cdot t$$

(Equação 4)

Assim, a taxa específica de crescimento corresponderá ao declive da reta obtida.

2.6.2 Produtividade volumétrica de lípidos

A produtividade volumétrica de lípidos ($Prod\ Vol\ L$) é calculada através da divisão da concentração máxima de lípidos produzidos pelo tempo necessário para a atingir. Desta forma, a $Prod\ Vol\ L$ é expressa em mg/L.h.

$$Prod\ Vol\ L\ (mg/L.h) = [lípidos]_{máx} / tempo$$

(Equação 5)

2.6.3 Produtividade específica de lípidos

Por sua vez, a produtividade específica de lípidos ($Prod\ Esp\ L/X$) é calculada da mesma forma que a $Prod\ Vol\ L$, mas tem em conta a quantidade de biomassa existente no tempo em que foi atingida a concentração máxima de lípidos. Assim a $Prod\ Esp\ L/X$ é expressa em $mg_{lípidos\ produzidos} / mg_{biomassa\ produzida} \cdot dia$, e calculada através da Equação 6.

$$Prod\ Esp\ L/X\ (mg/mg.dia) = [lípidos]_{máx} / ([biomassa] - [biomassa]_{inicial}) \cdot tempo$$

(Equação 6)

2.6.4 Rendimento de lípidos em função da biomassa

O rendimento de lípidos produzidos (L) em função da biomassa produzida (x), ou seja o rendimento $Y_{L/X}$, é calculado através da Equação 7, sendo expresso em $g_{lípidos\ produzidos} / g_{biomassa\ produzida}$.

$$Y_{L/X}\ (g/g) = ([lípidos]_{máx} - [lípidos]_{inicial}) / ([biomassa] - [biomassa]_{inicial})$$

(Equação 7)

2.6.5 Rendimento de lípidos em função do substrato

Por sua vez, o rendimento de lípidos produzidos (L) em função do substrato consumido (S), correspondente ao rendimento $Y_{L/S}$, expresso em $g_{lípidos\ produzidos} / g_{substrato\ consumido}$, pode ser determinado através da Equação 8.

$$Y_{L/S}\ (g/g) = ([lípidos]_{máx} - [lípidos]_{inicial}) / ([açúcares\ totais]_{inicial} - [açúcares\ totais])$$

(Equação 8)

2.6.6 Rendimento de biomassa em função do substrato

Por último, o rendimento de biomassa produzida (x) em função do substrato consumido (S), ou seja o rendimento $Y_{X/S}$, é expresso em $g_{\text{biomassa produzida}} / g_{\text{substrato consumido}}$ e é calculado com a Equação 9.

$$Y_{X/S} (g/g) = ([biomassa]_{\text{máx}} - [biomassa]_{\text{inicial}}) / ([açúcares totais]_{\text{inicial}} - [açúcares totais])$$

(Equação 9)

2.7 Tratamento estatístico

Foi feito o tratamento estatístico a todos os dados obtidos. Todas as regressões lineares foram efetuadas através do *software Microsoft Office Excel 2013* e as análises de variância realizadas através do teste *Student-Newman-Keuls* ($P < 0,05$) com o *software SigmaPlot versão 11*.

3 Resultados e discussão

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA) e teve como principal objetivo a otimização das condições de crescimento e de acumulação de lípidos da levedura *R. toruloides* CECT 1499. Com este intuito, determinou-se inicialmente a melhor concentração de fonte de carbono para a produção de biomassa no inóculo, e de seguida, selecionou-se o melhor rácio C/N para a produção de lípidos, usando o extrato aquoso rico em açúcares do resíduo de alfarroba, como fonte de carbono. Após escolhido o melhor rácios C/N, passou-se para a segunda fase deste trabalho, na qual foram desenvolvidas estratégias de modo a otimizar a produção de biomassa e de lípidos em reator biológico STR, com diferentes condições de arejamento e diferentes modos de operação, *batch* e *fed-batch*. Por fim, foi avaliado o perfil de ácidos gordos produzidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, de modo a avaliar se o óleo obtido é adequado para a produção de biodiesel de segunda geração.

3.1 Efeito da concentração de fonte de carbono na produção de biomassa

O primeiro ensaio foi realizado em balão erlenmeyer com o objetivo de determinar a concentração de extrato de alfarroba com maior capacidade de potenciar a produção de biomassa de levedura *R. toruloides* CECT 1499, usada na preparação do inóculo dos estudos de acumulação lipídica. Para além disso, este ensaio também possibilitou avaliar os perfis de crescimento e o estado fisiológico da cultura em que viabilidade celular é máxima.

É comum, a preparação dos inóculos da levedura *R. toruloides* serem feitos em meio líquido YPD^{35,94-97}. Deste modo, em meio YPD foram testados três concentrações diferentes de açúcares de alfarroba com as concentrações iniciais de 15 g/L, 70 g/L e 200 g/L. Para além do extrato de alfarroba, foi também usado peptona e extrato de levedura, como descrito na secção 2.3.2, com a concentração inicial de ião amónio de $1,71 \pm 0,054$ g/L. As concentrações de peptona e extrato de levedura usadas permitiram que as células crescessem sem nenhuma limitação nutricional de azoto, garantido que os açúcares consumidos fossem utilizados para a proliferação celular e não para a produção de lípidos neutros^{9,28,31,35,98}.

Os crescimentos decorreram com uma agitação de 200 rpm e a 30 ± 1 °C, durante 104 h, tal como descrito na secção 2.4.2.

Os perfis de crescimentos, bem como os parâmetros cinéticos associados, estão apresentados na Figura 10 e Tabela 3, respetivamente.

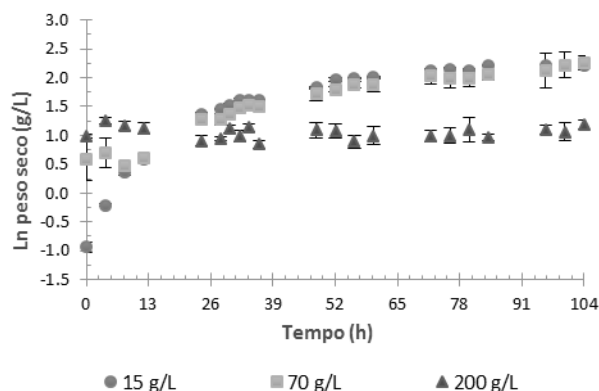


Figura 10. Perfil de crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com concentração inicial de açúcares totais de alfarroba de 15 g/L, 70 g/L e 200 g/L. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 104 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos de crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes concentrações iniciais de açúcares totais de alfarroba. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 104 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C.

[Aç. tot. alf.] _i (g/L)	15	70	200
μ (h ⁻¹)	0,067 ± 0,008 ^a	0,042 ± 0,003 ^b	-
X _{máx} (g/L)	9,22 ± 0,13 ^a	9,62 ± 0,13 ^a	-
Y _{X/S} (g/g)	0,418 ± 0,036 ^a	0,511 ± 0,085 ^a	-
Conversão açúcares total (%)	100,00 ± 0,00 ^a	22,83 ± 4,58 ^b	0,00 ± 0,00 ^c

Concentração inicial de açúcares de alfarroba ([Aç. tot. alf.]_i), taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa (X_{máx}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/S}) e percentagem de conversão de açúcares totais (Conversão açúcares total). Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Analisando a Figura 10 e a Tabela 3, verifica-se que existe uma inibição do crescimento com o aumento da concentração inicial de açúcares totais de alfarroba, sendo que com o meio de 200g/L não houve qualquer crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499, obtendo-se uma taxa específica de crescimento nula. Pode-se observar que o meio com 70 g/L apresenta uma diminuição da taxa específica de crescimento em relação à taxa específica de crescimento do meio com 15 g/L, com os respetivos valores de $0,042 \pm 0,003$ h⁻¹ e $0,067 \pm 0,008$ h⁻¹. No entanto, ambos atingem uma concentração celular final muito semelhante. Estes resultados sugerem que a levedura

R. toruloides CECT 1499 pode estar a sofrer um choque osmótico devido à elevada concentração de açúcar presente no meio ^{35,48}. Para além disso, o próprio extrato de alfarroba pode apresentar efeitos inibitórios no crescimento de microrganismos, porque para além de importantes minerais e aminoácidos, também contém na sua composição compostos fenólicos, como flavonoides, ácido sinápico, ácido siringico e mais abundantemente, o ácido gálico ^{99,100}. Estes compostos fenólicos são metabolitos secundários encontrados em plantas e vegetais, que parecem estar envolvidos na defesa das plantas contra agentes patogénicos como insetos, bactérias e fungos ¹⁰¹. Assim, este efeito inibitório pode ser mais significativo pelo facto de se passar de um meio PDA líquido, com apenas 20 g/L de glucose, para meios com maiores concentrações de açúcares totais de alfarroba. Este facto também é verificado através da análise dos perfis de consumo dos açúcares ao longo dos crescimentos, representado na Figura 11.

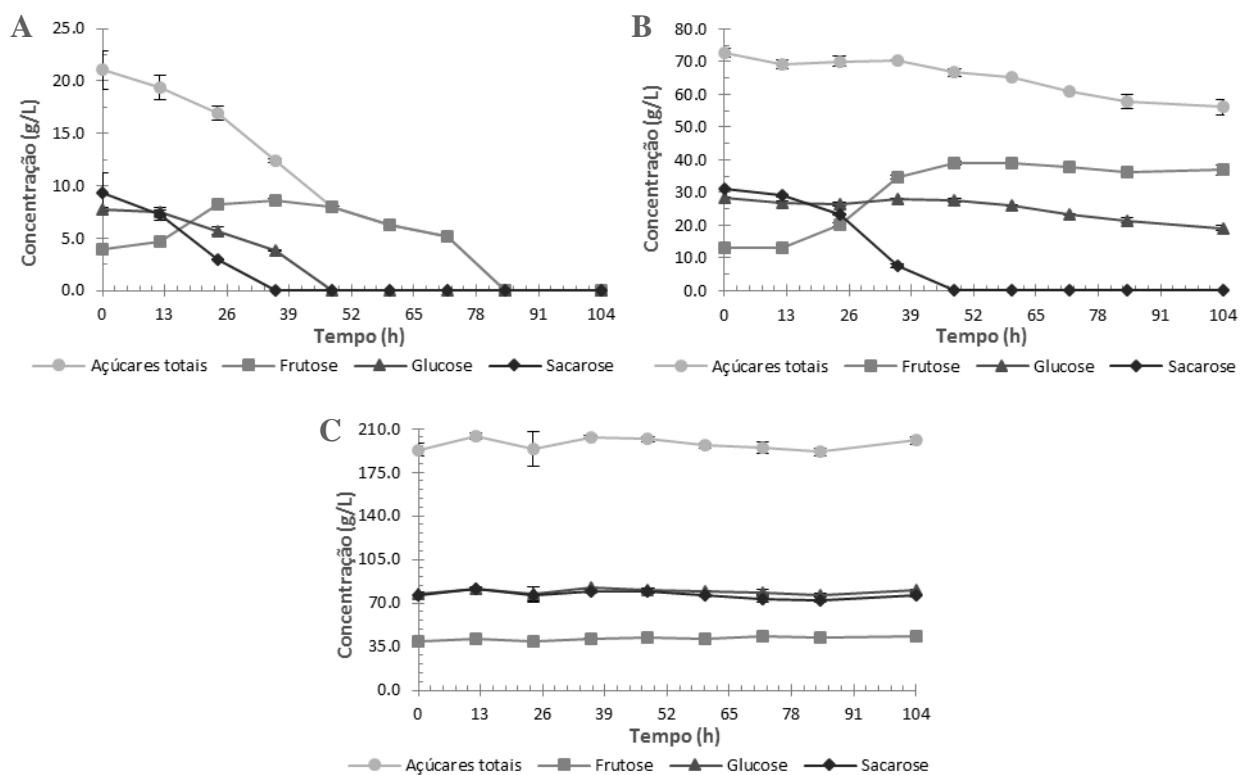


Figura 11. Perfil de consumo dos açúcares presentes no extrato de alfarroba, pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com as concentrações iniciais de açúcares totais de (A) 15 g/L, (B) 70g/L e (C) 200 g/L. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 104 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C.

É possível observar que com o meio de 15 g/L, no qual a levedura apresentou maior taxa específica de crescimento, houve um maior consumo de açúcares totais de alfarroba, sendo a sua conversão de 100 %, com o esgotamento total dos açúcares às 84 h de cultura. Tanto na Figura 11.A como na Figura 11.B, verifica-se claramente que a levedura *R. toruloides* CECT 1499 tem ativo o enzima invertase, que mesmo na presença de glucose de frutose, hidrolisa extracelularmente toda a sacarose existente¹⁰². O facto de esta levedura apresentar este enzima oferece mais uma vantagem na utilização dos açúcares de alfarroba, rentabilizando o processo. Observa-se também que à medida que o enzima invertase hidrolisa a sacarose, o açúcar mais abundante da alfarroba, há um aumento da concentração de frutose, em que os perfis destes açúcares são praticamente simétricos. Visto que a concentração da glucose não aumenta com a hidrólise da sacarose, tal como o perfil da frutose, pode-se concluir que a taxa de consumo da glucose é maior do que a sua taxa de formação. Observa-se a levedura *R. toruloides* CECT 1499 tem preferência pelo consumo de glucose, havendo diminuição da concentração deste açúcar ao longo do tempo de cultura. Por sua vez, a frutose só começa a ser consumida quando a concentração de glucose se torna limitativa. De notar também que, como a taxa específica de crescimento da cultura com 70 g/L de alfarroba é mais baixa em relação à cultura com 15 g/L, a ação do enzima invertase é mais lenta, em que a sacarose apenas se esgota às 48 h (Figura 11.B), enquanto que no meio com 15 g/L esgota-se às 36 h (Figura 11.A). A cultura no meio com 200 g/L de açúcares totais de alfarroba (Figura 11.C) não apresentou crescimento e, conseqüentemente, a ação do enzima invertase não foi visível, pois a concentração dos três açúcares mantém-se constante ao longo de todo o ensaio.

No entanto, o rendimento $Y_{X/S}$ foi ligeiramente superior com o meio de 70 g/L, $0,511 \pm 0,085$ g/g (Tabela 3), visto que neste meio, a levedura conseguiu atingir a mesma concentração de biomassa com uma menor quantidade de açúcares consumidos. Contudo, os rendimentos $Y_{X/S}$ de ambos os meios são semelhantes. Assim, é preferível optar pelo meio com 15 g/L para a produção de biomassa do inóculo, porque para além de ter uma maior taxa específica de crescimento, não apresenta nenhum desperdício de extrato de alfarroba, tornando-se numa opção mais rentável em relação ao meio com 70 g/L.

Adicionalmente, através dos dados obtidos com a determinação do número de células viáveis ou seja, do número de UFC (Figura 12), também é possível concluir que o meio com 15 g/L é o mais favorável ao crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499.

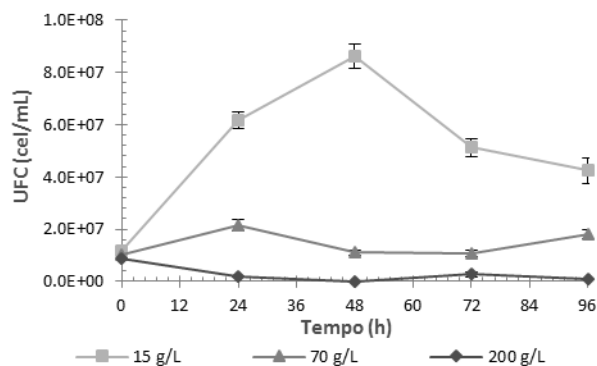


Figura 12. Perfil da quantidade de células viáveis ao longo do crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com concentração inicial de açúcares totais de alfarroba de 15 g/L, 70 g/L e 200 g/L. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 104 h, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Observa-se na Figura 12 que claramente com o meio de 15 g/L atinge-se uma concentração de células viáveis por mL de meio muito superior do que com o meio de 70 g/L, chegando às $8.63\text{E}+07 \pm 4.82\text{E}+06$ cel/mL em 48 h. Com a utilização do meio com 70 g/L apenas se consegue atingir $2.15\text{E}+07 \pm 2.06\text{E}+06$ cel/mL, enquanto que com o meio de 200 g/L, em que a taxa específica de crescimento foi nula, há um decréscimo do número de células viáveis ao longo do ensaio, sugerindo que existiu morte celular.

Com base nos resultados apresentados, foi escolhido o meio com 15 g/L iniciais de açúcares totais de alfarroba para ser usado como meio para fazer os inóculos nos seguintes ensaios. Assim, o meio de inóculo da levedura *R. toruloides* CECT 1499 passou a ser composto por 15 g/L de extrato de alfarroba, 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona. O inóculo foi mantido numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 200 rpm, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo a passagem para o meio de acumulação lipídica sempre feita às 48 h de crescimento, altura em que o número de células viáveis é mais elevado, como observado na Figura 12.

3.2 Determinação do melhor rácio C/N para produção de lípidos

A limitação de certos nutrientes, como o azoto, é uma das maneiras mais simples de induzir a acumulação lipídica por parte dos microrganismos oleaginosos. Deste modo, o rácio C/N torna-se um fator crucial no metabolismo de acumulação de lípidos. Segundo a literatura, os rácios C/N

mais usados com a levedura *R. toruloides* são entre 50 e 140^{15,27,28,31,66,68,69}. No entanto, em todos estes estudos foi usada a glucose como fonte de carbono.

Neste ensaio pretendeu-se avaliar o rácio C/N que promove maior acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, usando o extrato de resíduos de alfarroba com fonte de carbono.

Assim, numa primeira parte deste estudo, testou-se o meio de cultura descrito por Li *et al.* (2006)⁶⁶, indicado para induzir a acumulação lipídica em que se variou a concentração inicial de açúcares totais de alfarroba. A composição deste meio encontra-se descrita na secção 2.3.3. As concentrações de açúcar usadas foram 15, 50, 70, 150 e 200 g/L, com os rácios C/N correspondentes de 70, 240, 330, 700 e 930, respetivamente. Todos os crescimentos foram efetuados tal como descrito na secção 2.3.4.

Na Figura 13, estão representados os perfis de crescimento e produção de lípidos obtidos com os diferentes meios utilizados. Verifica-se claramente que usando a levedura *R. toruloides* CECT 1499, em meios com extrato de alfarroba como fonte de carbono, o início da síntese de lípidos está fortemente relacionado com a concentração de ião amónio presente no meio, ocorrendo na fase estacionária de crescimento. Pode-se observar que quando o ião amónio se esgota, a glucose que é consumida é utilizada maioritariamente para a síntese de lípidos neutros.

Verifica-se também que com o aumento do rácio C/N há um aumento da produção de lípidos (Figura 13 e Tabela 4), sendo atingido o máximo com o rácio de 330, após o qual a acumulação de lípidos diminuí.

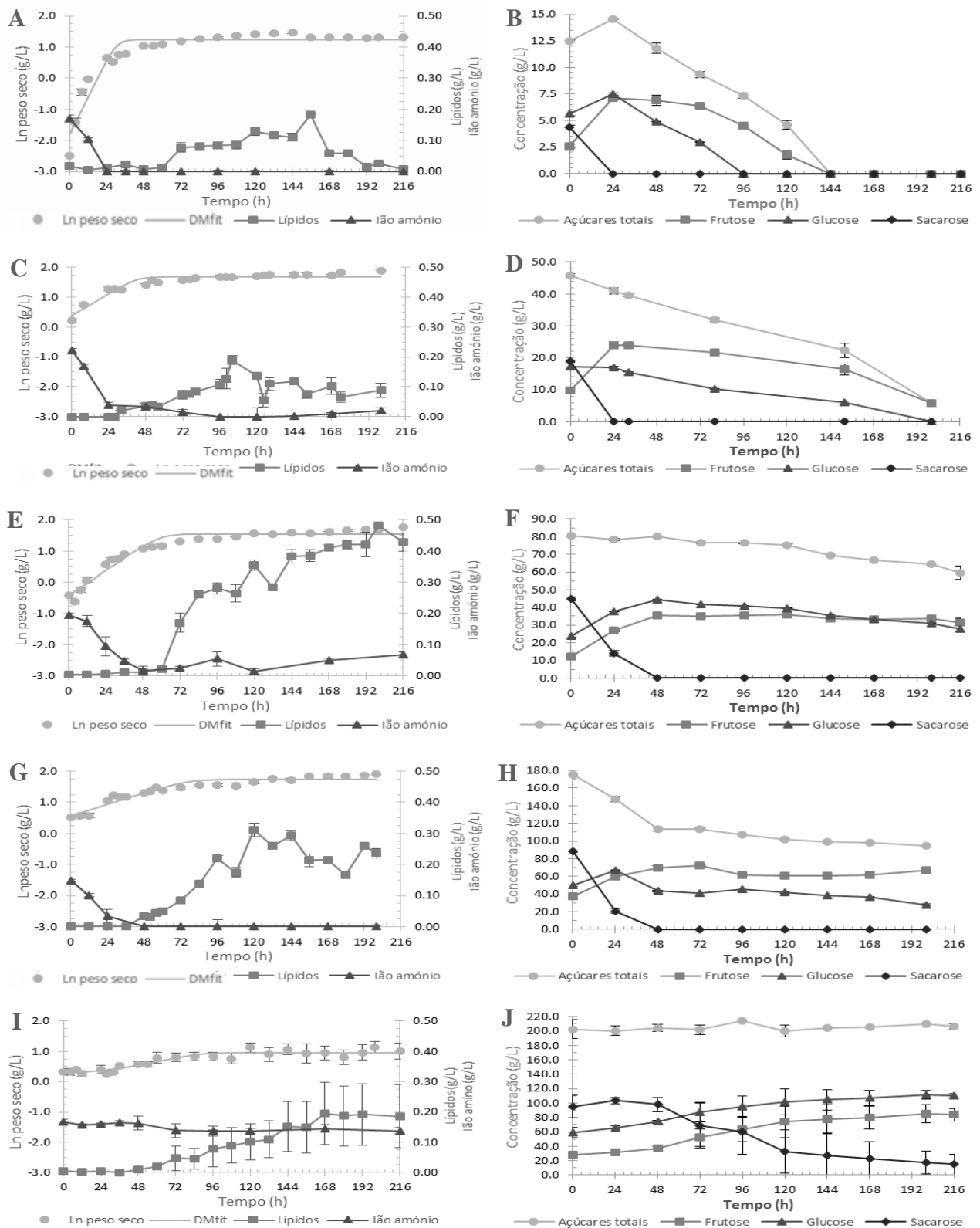


Figura 13. Perfis de crescimento, acumulação lipídica e consumo de açúcares totais de alfarroba pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com concentração inicial de açúcares totais de alfarroba de (A e B) 15 g/L (rácio C/N 70), (C e D) 50 g/L (rácio C/N 240), (E e F) 70 g/L (rácio C/N 330), (G e H) 150 g/L (rácio C/N 700) e (I e J) 200 g/L (rácio C/N 930). Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos de crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes concentrações iniciais de açúcares totais de alfarroba, correspondentes a diferentes rácios C/N. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer, a 200 rpm e 30 ± 1°C.

	Rácio C/N				
	70	240	330	700	930
[Aç. tot. alf.] _i (g/L)	15	50	70	150	200
μ (h ⁻¹)	0,100 ± 0,013 ^a	0,031 ± 0,005 ^b	0,034 ± 0,003 ^b	0,015 ± 0,002 ^b	0,010 ± 0,003 ^b
X _{máx} (g/L)	4,19 ± 0,10 ^b	6,22 ± 0,19 ^a	5,71 ± 0,06 ^a	6,57 ± 0,13 ^a	3,39 ± 0,55 ^b
[Líp] _{máx} (g/L)	0,18 ± 0,00 ^b	0,19 ± 0,01 ^b	0,48 ± 0,01 ^a	0,31 ± 0,02 ^b	0,20 ± 0,10 ^b
t [Líp] _{máx} (h)	156	104	200	120	168
Prod Vol _L (mg/L.h)	1,07 ± 0,03 ^b	1,83 ± 0,14 ^{a,b}	2,41 ± 0,04 ^a	2,59 ± 0,19 ^a	1,16 ± 0,61 [*]
Prod Esp _{L/x} (mg/g.h)	0,29 ± 0,01 ^b	0,41 ± 0,04 ^b	0,48 ± 0,04 ^b	0,70 ± 0,07 ^a	0,70 ± 0,42 [*]
Y _{L/x} (g/g)	0,045 ± 0,001 ^b	0,043 ± 0,004 ^b	0,097 ± 0,002 ^a	0,084 ± 0,008 ^a	0,117 ± 0,071 [*]
Y _{L/S} (g/g)	0,013 ± 0,000 ^b	0,014 ± 0,001 ^b	0,030 ± 0,001 ^a	0,004 ± 0,000 ^c	-
Y _{X/S} (g/g)	0,327 ± 0,009 ^a	0,127 ± 0,006 ^b	0,325 ± 0,013 ^a	0,063 ± 0,002 ^c	-
Conversão açúcares total (%)	100,00 ± 0,00 ^a	68,98 ± 0,63 ^b	26,21 ± 4,70 ^d	45,97 ± 0,12 ^c	0,00 ± 0,00 ^e

Concentração inicial de açúcares de alfarroba ([Aç. tot. alf.]_i), taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa (X_{máx}), concentração máxima de lípidos acumulados ([Líp]_{máx}), tempo de obtenção da concentração máxima de lípidos acumulados (t [Líp]_{máx}), produtividade volumétrica de lípidos (Prod Vol_L), produtividade específica de lípidos (Prod Esp_{L/x}), rendimento de lípidos obtido em função da biomassa formada (Y_{L/x}), rendimento de lípidos obtido em função dos açúcares consumidos (Y_{L/S}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/S}) e percentagem de açúcares totais consumidos (Conversão açúcares total). Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05). * Valor não usado para o tratamento estatístico.

Observa-se que há uma diminuição da taxa específica de crescimento com o aumento da concentração de açúcares no meio, possivelmente devido à elevada osmolaridade que o meio apresenta. O rácio com a menor concentração inicial de açúcares totais de alfarroba (15 g/L) é aquele que apresenta a maior taxa específica de crescimento, pelo facto de a cultura não sofrer choque osmótico e a eventual inibição por parte dos ácidos fenólicos presentes no extrato de alfarroba estar minimizada. Os rácios C/N 240 e 330 apresentaram uma taxa específica de crescimento bastante semelhante, cerca de 0,03 h⁻¹, e com o rácio C/N 700 este valor diminuiu para metade. O rácio com maior taxa específica de crescimento, C/N 70, é aquele em que o esgotamento do ião amónio ocorre mais cedo, às 24 h de cultura. Por sua vez, o rácio C/N 930 tem uma taxa específica de crescimento bastante baixa, apresentando uma fase de latência de cerca de 25 h (fase essa que nenhum dos outros rácios testados apresenta). Note-se que, neste caso, o ião amónio não se esgotou observando-se um pequeno consumo, sugerindo-se que a levedura não se conseguiu adaptar bem ao meio. Estes resultados são semelhantes aos do ensaio anterior com o

inóculo, em que o não houve qualquer crescimento com 200 g/L de açúcares totais de alfarroba iniciais (Figura 10 e 11.C). No entanto, com este meio de acumulação lipídica houve um ligeiro crescimento, provavelmente explicado com o facto de a levedura *R. toruloides* CECT 1499 já estar mais adaptada aos açúcares de alfarroba, por previamente ter crescido no meio de inoculo já com 15 g/L de açúcares totais de alfarroba. Estes resultados estão de acordo com Li *et al.* (2007)²⁹, que usando glucose como fonte de carbono, verificou que a levedura *R. toruloides* sofre um aumento de efeitos inibitórios com o aumento da concentração de açúcares no meio, a partir de 150 g/L. Mais especificamente, a partir das 200 g/L ocorre uma diminuição drástica na produção de lípidos e biomassa. Adicionalmente, este autor obteve melhores resultados utilizando meios com 90 g/L de glucose.

Relativamente à produção de lípidos, o rácio C/N 330 foi o que induziu a maior produção de lípidos, com uma $[Líp]_{máx}$ de $0,48 \pm 0,01$ g/L, sendo este valor estatisticamente diferente dos restantes. Em 2006, Li *et al.*⁶⁶ também concluíram que o meio mais indicado para a acumulação lipídica contém 70 g/L de glucose, 0,1 g/L de sulfato de amónio e os restantes nutrientes em quantidades iguais às descritas na secção 2.3.3. Do mesmo modo como aconteceu com o crescimento, a $[Líp]_{máx}$ atinge o seu máximo com o rácio C/N 330, diminuindo para rácios superiores. Similarmente, a produtividade lipídica também aumenta com o aumento do rácio C/N, apresentando um decréscimo no rácio mais elevado. Neste caso a produtividade volumétrica atinge o valor $2,59 \pm 0,19$ mg/L.h com o rácio C/N 700. Apesar do rácio C/N 330 ter atingido uma maior $[Líp]_{máx}$, demorou 200 h para tal, diminuindo ligeiramente a produtividade em relação ao rácio C/N 700, em que o máximo de lípidos, $0,31 \pm 0,02$ g/L, foi às 120 h (Figura 13.G).

O rendimento $Y_{L/X}$, o parâmetro mais significativo na avaliação da acumulação lipídica, foi superior com o rácio C/N de 930, obtendo-se $0,117 \pm 0,071$ de gramas de lípidos por grama de biomassa, relativamente aos restantes rácios testados. No entanto, este valor não foi considerado por apresentar um erro padrão demasiado elevado, não sendo um valor fiável. Assim, o rácio com o $Y_{L/X}$ mais elevado, com $0,097 \pm 0,002$ g/g, foi o rácio C/N 330, em que se obteve uma maior concentração de lípidos. Com o aumento do rácio C/N para 700, o rendimento baixa ligeiramente, e com a utilização dos rácios C/N 70 e 240, o $Y_{L/X}$ baixa para metade. Comparando estes dois últimos, o rácio C/N 70 tem um $Y_{L/X}$ ligeiramente superior, no entanto é a opção mais eficiente por atingir uma concentração de lípidos mais elevada e 52 h antes do rácio C/N 237. Todavia, os rendimentos $Y_{L/X}$ obtidos estão longe do que a levedura *R. toruloides* consegue acumular,

normalmente entre 50 a 76 % (p/p) ^{27,37,97,103,104}. Isto pode ser explicado pelo facto de a levedura *R. toruloides* CECT 1499 ser estritamente aeróbia e não estar a receber a quantidade de oxigénio suficiente para induzir a acumulação lipídica, estando apenas a produzir uma pequena quantidade. Embora haja trocas gasosas nos balões erlenmeyer, e sendo esta suficiente na maioria das leveduras estritamente aeróbias, neste caso a acumulação de lípidos é um processo estritamente aeróbio, em que a necessidade de oxigénio é extremamente elevada ¹⁰⁵. O problema poderá ser resolvido com a utilização do reator biológico STR com sistema de arejamento.

Quanto aos perfis de consumo de açúcares totais de alfarroba (Figura 13), novamente voltam a mostrar claramente a ação do enzima invertase. Pode-se observar que, excluindo o rácio C/N 930 no qual não houve consumo de açúcares, todos os rácios têm maior percentagem de conversão de açúcares totais do que o rácio C/N 330 que apenas apresentou $26,21 \pm 4,70$ %. No entanto, analisando os rendimentos $Y_{L/S}$, verifica-se que o rácio C/N 330 foi o que canalizou os açúcares para a produção de lípidos mais eficientemente. Por sua vez, o rácio C/N 700, atingiu apenas um rendimento $Y_{L/S}$ de $0,004 \pm 0,000$ g/g, indicando que neste rácio C/N a levedura *R. toruloides* CECT 1499 precisou de consumir uma maior quantidade de açúcares para conseguir ter uma produção lipídica próxima do rácio C/N 330. Relativamente ao rendimento $Y_{X/S}$, os rácios C/N de 70 e 330 foram os que atingiram os melhores valores. Com o rácio com 200 g/L de açúcares totais de alfarroba aparenta que não houve qualquer consumo de açúcares (Figura 12.J), havendo contudo um ligeiro crescimento celular. Tal como referido anteriormente, para esta elevada concentração de açúcar, as células poderão ter sofrido inibição devido ao choque osmótico e presença de ácidos fenólicos. Verifica-se também que a taxa específica de crescimento foi muito baixa, a ação do enzima invertase também foi muito lenta, em que a sacarose não chegou a ser completamente hidrolisada.

Neste estudo, conclui-se que o rácio C/N 330 é o mais adequado para induzir a acumulação lipídica.

3.2.1 Efeito do aumento do ião amónio no rácio C/N

Um novo ensaio foi realizado, também com variações de rácio C/N, mas em que concentração inicial de sulfato de amónio foi de 0,5 g/L. O objetivo deste ensaio foi avaliar o efeito

do ião amónio na produção de biomassa e acumulação de lípidos. Com o intuito de se puder comparar com os resultados anteriores, foram testadas as concentrações iniciais de açúcares totais de alfarroba de 70, 150 e 200 g/L, com os rácios C/N 180, 390 e 520, respetivamente. Todos os crescimentos foram feitos tal como descrito na secção 2.3.4.

Na Figura 14, estão representados os perfis de crescimento e produção de lípidos obtidos com os diferentes meios utilizados.

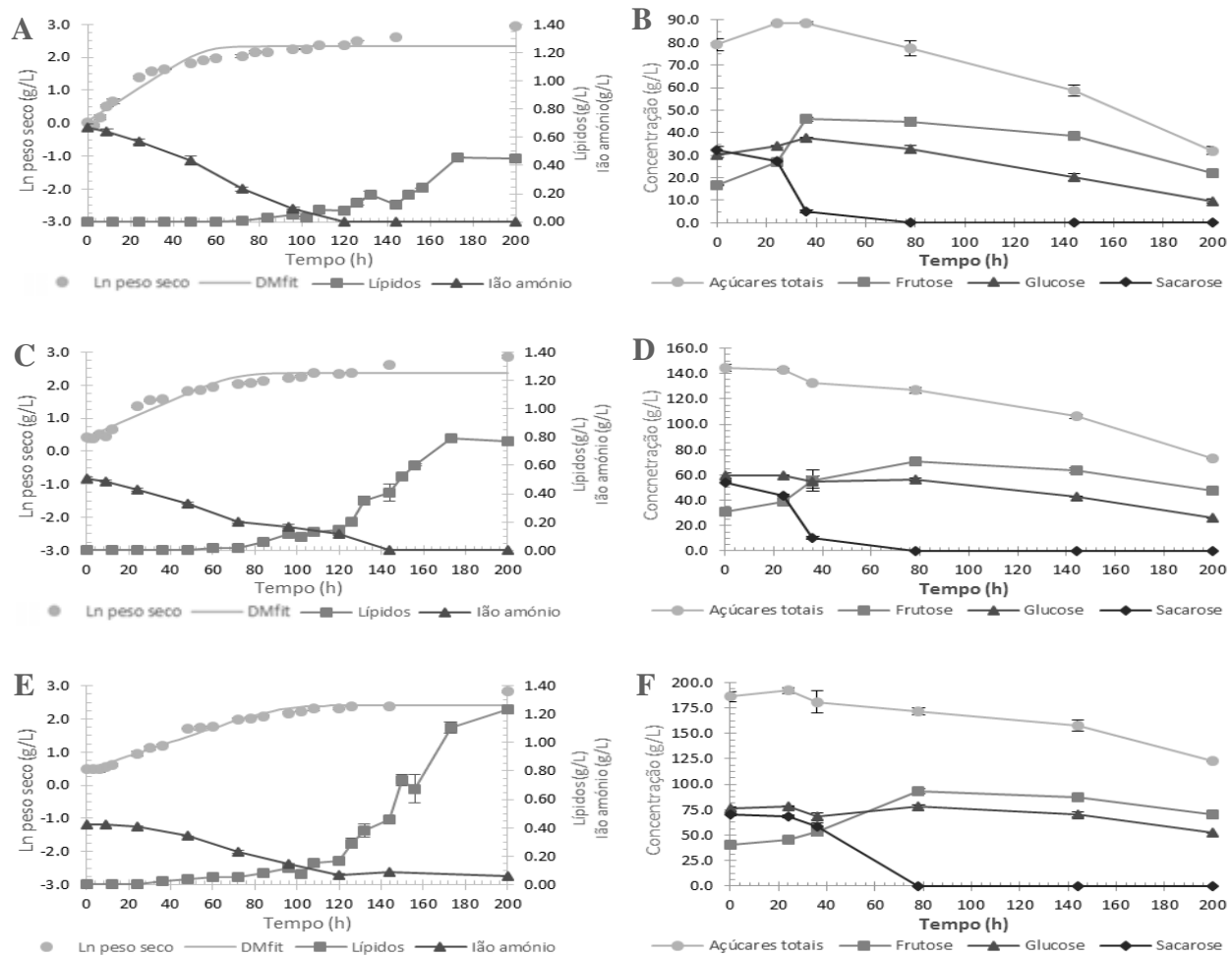


Figura 14. Perfis de crescimento, acumulação lipídica e consumo de açúcares totais de alfarroba pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com concentração inicial de ião amónio de 0,5 g/L e de açúcares totais de alfarroba de (A e B) 70 g/L (rácio C/N 180), (C e D) 150 g/L (rácio C/N 390) e (E e F) 200 g/L (rácio C/N 520). Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 200 h, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Em análise aos perfis representados na Figura 14, volta-se a verificar que a levedura *R. toruloides* CECT 1499 apenas inicia a síntese de lípidos quando o ião amónio já se encontra em concentrações limitativas ou esgotado. No entanto, por se iniciar o crescimento com uma maior

concentração de ião amónio, a levedura demora mais tempo a consumi-lo, obtendo-se no geral fases exponenciais mais longas, comparativamente ao ensaio anterior (Figura 13).

Através da Figura 14 e Tabela 5, observa-se também que a produção de lípidos aumenta com o aumento do rácio e, novamente, com o aumento da concentração de açúcares iniciais observa-se uma maior inibição no crescimento.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos de crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes concentrações iniciais de açúcares totais de alfarroba e de ião amónio de 0,5 g/L, correspondentes a diferentes rácios C/N. Os crescimentos foram realizados em balão erlenmeyer durante 200 h, a 200 rpm e 30±1°C.

	Rácio C/N		
	180	390	520
[Aç. tot. alf.] _i (g/L)	70	150	200
μ (h ⁻¹)	0,042 ± 0,005 ^a	0,028 ± 0,002 ^b	0,022 ± 0,002 ^b
X _{máx} (g/L)	19,14 ± 0,54 ^a	18,50 ± 0,44 ^a	16,79 ± 0,37 ^a
[Líp] _{máx} (g/L)	0,46 ± 0,00 ^c	0,79 ± 0,01 ^b	1,24 ± 0,00 ^a
t [Líp] _{máx} (h)	173	173	200
Prod Vol _L (mg/L.h)	2,64 ± 0,01 ^c	4,59 ± 0,05 ^b	6,18 ± 0,01 ^a
Prod Esp _{L/x} (mg/g.h)	0,145 ± 0,004 ^c	0,276 ± 0,008 ^b	0,408 ± 0,010 ^a
Y _{L/x} (g/g)	0,025 ± 0,001 ^c	0,048 ± 0,001 ^b	0,082 ± 0,002 ^a
Y _{L/s} (g/g)	0,010 ± 0,001 ^b	0,011 ± 0,000 ^b	0,019 ± 0,002 ^a
Y _{X/s} (g/g)	0,385 ± 0,029 ^a	0,223 ± 0,011 ^b	0,238 ± 0,020 ^b
Conversão açúcares total (%)	59.54 ± 0.99 ^a	49.36 ± 0.78 ^b	34.10 ± 1.76 ^c

Concentração inicial de açúcares de alfarroba ([Aç. tot. alf.]_i), taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa (X_{máx}), concentração máxima de lípidos acumulados ([Líp]_{máx}), tempo de obtenção da concentração máxima de lípidos acumulados (t [Líp]_{máx}), produtividade volumétrica de lípidos (Prod Vol_L), produtividade específica de lípidos (Prod Esp_{L/x}), rendimento de lípidos obtido em função da biomassa formada (Y_{L/x}), rendimento de lípidos obtido em função dos açúcares consumidos (Y_{L/s}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/s}) e percentagem de açúcares totais consumidos (Conversão açúcares total). Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Observa-se que com uma concentração de sulfato de amónio mais elevada, relativamente ao ensaio anterior, as taxas específicas de crescimento obtidas são todas mais elevadas, assim como a biomassa produzida. (Tabela 4 e 5). No entanto, apesar dos rácios C/N testados neste ensaio terem uma taxa específica de crescimento mais baixa que o rácio C/N 70 (com 0,1 g/L de amónio), 0,100 ± 0,013 h⁻¹ (Tabela 4), atingiram uma concentração máxima de biomassa superior, tendo também uma fase exponencial com uma maior duração. Em termos de biomassa, relativamente ao meio mais limitado em amónio, observou-se praticamente a triplicação da biomassa máxima. Novamente, verifica-se alguma inibição na proliferação celular quando a concentração inicial de açúcares é demasiado elevada. Contudo, com este rácio C/N 520 houve um melhor crescimento,

com uma taxa específica de crescimento duas vezes superior ao rácio C/N 930 e em que a biomassa foi 5 vezes superior, mostrando que apesar da concentração elevada de açúcares, a levedura *R. toruloides* CECT 1499 conseguiu-se adaptar melhor, muito provavelmente devido ao facto de existir mais ião amónio disponível no meio. Isto porque a presença de ião amónio é essencial para a produção de proteínas e ácidos nucleicos, e como vários autores concluíram, com uma maior concentração de fonte de azoto (baixo rácio C/N), os microrganismos oleaginosos produzem mais biomassa, pois o *stress* metabólico derivado da limitação de azoto é menor^{69,103,106,107}.

Quanto aos lípidos, a levedura demorou o dobro do tempo para começar a sintetizá-los, todavia chegou a uma concentração máxima de lípidos superior com os rácios C/N 390 e 520, em relação ao rácio C/N 330 (meio com 0,1 g/L sulfato de amónio) que obteve apenas $0,48 \pm 0,01$ g/g (Tabela 4 e 5). Embora, neste estudo a concentração de lípidos acumulados seja superior ao ensaio com meio mais limitado em azoto, o rendimento de acumulação, relativamente à biomassa, é inferior, devido à elevada quantidade de biomassa produzida. O rácio C/N 520, com 200 g/L de açúcares totais e 0,5 g/L de sulfato de amónio, foi o que produziu a maior quantidade de lípidos, $1,24 \pm 0,00$ g/L, mas não o suficiente para que fosse considerado acumulação lipídica, pois por ter uma concentração de biomassa de $16,79 \pm 0,37$ g/L, o rendimento $Y_{L/X}$ foi mais baixo do que o do rácio C/N 330, com apenas 8 % (p/p) de acumulação. Estes resultados estão de acordo com Li *et al.* (2006), que quando aumentaram a concentração de sulfato de amónio de 0,1 para 0,5 g/L, a percentagem de lípidos produzidos diminuiu em cerca de 10 pontos percentuais (p/p), e ao aumentarem concentração de sulfato de amónio ainda mais, até 3,5 g/L, a produção de lípidos baixou significativamente¹⁰³.

Assim, as produtividades volumétricas lipídicas, que estão diretamente relacionada com a concentração máxima de lípidos, logicamente foram mais elevada neste ensaio, em que com o rácio C/N 520 conseguiu-se aumentar bastante este valor, chegando-se às $6,18 \pm 0,01$ mg/L.h. Contudo, a elevada produção de biomassa refletiu-se na produtividade específica, que em todos estes rácios foi mais baixa do que com o rácio C/N 330 do ensaio anterior, que chegou às $0,48 \pm 0,04$ mg/g.h.

Com a análise aos perfis de consumo de açúcares de alfarroba, representados pela Figura 14, é possível observar novamente que o enzima invertase está ativo, sendo a glucose o monossacarídeo preferencialmente consumido. A percentagem de açúcares de alfarroba

consumidos diminuí com o aumento do rácio C/N, devido à inibição no crescimento com o aumento da concentração de açúcares iniciais (Tabela 5). É possível observar também que com o aumento da concentração de ião amónio inicial, mantendo a concentração de açúcares iniciais iguais, a percentagem de conversão de açúcares totais aumenta. Isto porque a proliferação celular foi superior, e conseqüentemente o consumo de açúcares foi mais acentuado para acompanhar esse crescimento. Logo, neste ensaio os rendimentos $Y_{X/S}$ foram mais elevados. No entanto os rendimentos $Y_{L/S}$, não foram superiores ao rendimento do rácio C/N 330 do ensaio anterior.

Com base nos resultados todos apresentados, conclui-se que o rácio com maior capacidade de induzir a acumulação lipídica é o rácio C/N 330, com 70 g/L de açúcares totais de alfarroba e 0,1 g/L de sulfato de amónio. Este rácio C/N apresentou o melhor rendimento $Y_{L/X}$, $0,098 \pm 0,004$ g/g, que é parâmetro mais usado para avaliar a capacidade de acumulação de lípidos por uma levedura, e também o melhor rendimento $Y_{L/S}$, com $0,030 \pm 0,001$ g/g, demonstrando ser o rácio mais eficiente a nível económico. Para além disso, atingiu uma das melhores produtividades específicas e $Y_{X/S}$, com $0,48 \pm 0,04$ mg/g.h e $0,325 \pm 0,013$ g/g, respetivamente.

Assim, este foi o meio utilizado em todos os ensaios seguintes em reator biológico STR.

3.3 Estratégias para aumentar a acumulação lipídica

3.3.1 Influência do n-dodecano como vetor de oxigénio no K_{La}

Antes de se iniciar os crescimentos em reator biológico foram feitos estudos sobre a influência que o uso de um vetor de oxigénio tem na transferência de massa de oxigénio no meio. Segundo vários autores, a utilização de vetores de oxigénio, nos quais a solubilidade do oxigénio é 10 a 20 vezes mais elevada do que na água, facilita a transferência de oxigénio das bolhas de ar até às células, aumentando o K_{La} do meio. O vetor de oxigénio mais usado é o hidrocarboneto n-dodecano^{71,72,78,79,83,84}.

Para isso foram feitos ensaios em reator biológico STR de 2 L, com dois caudais de arejamento, 0,3 vvm e 0,75 vvm, com ou sem a adição de 1 % de n-dodecano, utilizando-se água como meio líquido. Visto que os meios utilizados nos crescimentos são aquosos, é possível depois

fazer-se a comparação de resultados entre os vários ensaios. As medições foram feitas tal como descrito nas secções 2.4.1 e 2.6.3, sendo as condições operacionais idênticas às definidas para as culturas em reator biológico STR da levedura *R. toruloides* CECT 1499.

Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de K_{La} obtidos com os caudais de arejamento 0,3 e 0,75 vvm em reator biológico STR 2 L, com ou sem a adição de 1% (v/v) n-dodecano. Os ensaios foram realizados a uma temperatura de 30 ± 1 °C e agitação de 200 rpm.

	K_{La} (h^{-1})	
	0,3 vvm	0,75 vvm
0 % (v/v) n-dodecano	48,96 \pm 4,15	54,72 \pm 4,72
1 % (v/v) n-dodecano	59,04 \pm 5,82	66,33 \pm 3,06

Em análise à Tabela 6 é possível verificar que ao se aumentar o caudal de arejamento de 0,3 vvm para 0,75 vvm, sem a adição de n-dodecano, o valor de K_{La} também aumenta chegando-se a um valor de $54,72 \pm 4,72 h^{-1}$.

Verifica-se que tanto o aumento do caudal de arejamento como a adição do vetor de oxigénio, n-dodecano, têm um efeito preponderante no aumento do K_{La} do meio. A adição de n-dodecano aumenta, aproximadamente 20 % o valor de K_{La} do meio, o mesmo se verificando com o aumento do arejamento que promove um incremento também de 10 a 20 %.

O K_{La} mais elevado foi obtido com a adição de 1% (v/v) de n-dodecano usando o caudal de 0,75 vvm, tendo este o valor de $66,33 \pm 3,06 h^{-1}$. Trabalhos anteriores realizados no LEBA já demonstraram que a adição de 2 % (v/v) de n-dodecano com um caudal de 0,75 vvm não apresenta diferenças no valor de K_{La} em relação ao uso de apenas 1% de n-dodecano ¹⁰⁸.

Cascaval *et al.* (2006) ⁷² também provaram que a adição de n-dodecano aumenta a taxa de transferência de oxigénio, sem ser necessário aumentar a velocidade de agitação. Verificaram que num reator biológico STR 5 L, em idênticas condições, o K_{La} aumentava de $43 h^{-1}$ para $64 h^{-1}$, aproximadamente, com a adição de 5 % (v/v) de n-dodecano.

Um dos problemas dos ensaios em balão erlenmeyer, foi que a acumulação de lípidos era baixa, bastante inferior à referenciada na literatura ^{27,37,97,103,104}. Um dos fatores que poderá condicionar e limitar esta acumulação é a quantidade de oxigénio disponível na cultura ser baixa

e insuficiente para a síntese e acumulação de lípidos. Sabe-se que a síntese de lípidos é um processo aeróbio, e que o oxigénio dissolvido é um fator crucial¹⁰⁵.

Segundo a literatura, em balões erlenmeyer com 100 mL de meio e uma agitação de 100 rpm, obtém-se um K_{La} de cerca de 5 h^{-1} . Logo, mesmo com o arejamento mais baixo de 0,3 vvm sem a adição de n-dodecano, no qual se obteve um K_{La} de $48,96 \pm 4,15 \text{ h}^{-1}$, possivelmente consegue-se atingir melhores resultados de produção de biomassa e lípidos do que em relação aos ensaios em balão erlenmeyer realizados anteriormente. No entanto, o vetor de oxigénio n-dodecano tem a capacidade de aumentar ainda mais a transferência de massa de oxigénio no meio.

Assim, nos próximos ensaios serão testadas diferentes estratégias para aumento da biomassa e acumulação de lípidos. Serão testados diferentes arejamentos, conjugados com a adição do vetor de oxigénio, n-dodecano, no crescimento em reator biológico STR da levedura *R. toruloides* CECT 1499.

3.3.2 Efeito do arejamento na produção de lípidos

A levedura *R. toruloides* é um microrganismo estritamente aeróbio, e por isso a otimização das condições de arejamento durante o seu crescimento é crucial para induzir a acumulação lipídica.

Assim, inicialmente foram testados em reator biológico STR os dois caudais de arejamento anteriormente usados nos estudos de transferência de massa de oxigénio, 0,3 e 0,75 vvm. Estes dois ensaios foram realizados a 200 rpm, $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e durante 200 h, tal como descrito na secção 2.3.5.

Na Figura 15, estão representados os perfis de crescimento e produção de lípidos obtidos utilizando os dois caudais de arejamento, os seus respetivos perfis de consumo de açúcares e a variação de pH e percentagem de oxigénio dissolvido no meio.

Observa-se que o perfil de crescimento é semelhante nas duas culturas crescidas com condições de baixo (0,3 vvm) e elevado (0,75 vvm) arejamento, apresentando idênticos valores de taxa específica de crescimento e de biomassa produzida (Tabela 7).

Mais uma vez, se observa que só se inicia a produção lipídica quando o ião amónio presente no meio se esgota. A cultura que decorreu em condições de elevado arejamento esgotou os açúcares presentes no meio, tendo a glucose esgotado às 140 h de cultura, altura em que é atingido

o máximo de lípidos. Tal como nos ensaios anteriores, o enzima invertase encontra-se ativo, hidrolisando a sacarose em frutose e glucose.

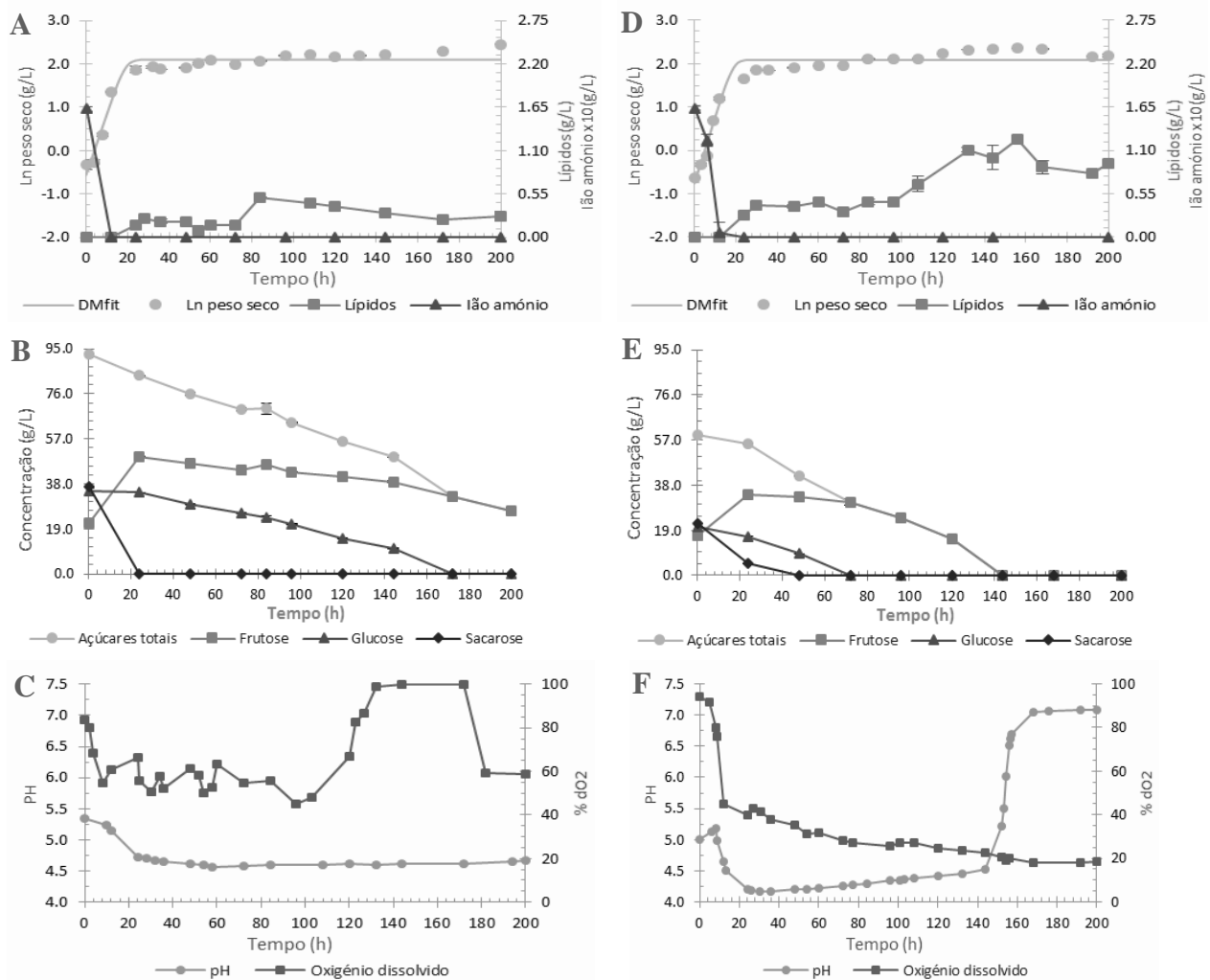


Figura 15. Perfis de crescimento e acumulação lipídica, de consumo de açúcares totais de alfarroba, e de variação de pH e % dO₂, pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com os caudais de arejamento de (A, B e C) 0,3 vvm e (D, E e F) 0,75 vvm. Os crescimentos foram realizados em reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1°C.

Na tabela 7, são apresentados os parâmetros de crescimento e produção de lípidos relativos a estes dois ensaios em STR com diferentes caudais de arejamento, e os valores obtidos no ensaio em balão erlenmeyer, com o mesmo rácio C/N de 330. Os crescimentos em STR apresentaram um aumento na produção de biomassa significativo, praticamente o dobro, com uma taxa específica de crescimento de $0,140 \pm 0,022 \text{ h}^{-1}$, relativamente ao crescimento em balão erlenmeyer, em que apenas se obteve $0,034 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 7, Figura 13.E e Figura 13.F).

Tabela 7. Parâmetros cinéticos de crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em reator biológico STR de 2 L com diferentes caudais de arejamento, 0,3 e 0,75 vvm, e em balão erlenmeyer, com o mesmo rácio C/N 330. Os crescimentos foram realizados durante 200 h, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

	Balão erlenmeyer	0,3 vvm	0,75 vvm
μ (h^{-1})	$0,034 \pm 0,003$ ^b	$0,140 \pm 0,022$ ^a	$0,153 \pm 0,022$ ^a
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	$5,71 \pm 0,06$ ^b	$11,65 \pm 0,08$ ^a	$10,58 \pm 0,02$ ^a
[Líp] _{máx} (g/L)	$0,48 \pm 0,01$ ^b	$0,50 \pm 0,01$ ^b	$1,25 \pm 0,05$ ^a
t [Líp] _{máx} (h)	200	84	156
Prod Vol _L (mg/L.h)	$2,41 \pm 0,04$ ^c	$5,97 \pm 0,08$ ^b	$7,99 \pm 0,31$ ^a
Prod Esp _{L/x} (mg/g.h)	$0,48 \pm 0,04$ ^b	$0,82 \pm 0,02$ ^a	$0,79 \pm 0,03$ ^a
$Y_{L/x}$ (g/g)	$0,097 \pm 0,002$ ^b	$0,069 \pm 0,002$ ^c	$0,124 \pm 0,005$ ^a
$Y_{L/S}$ (g/g)	$0,030 \pm 0,001$ ^a	$0,022 \pm 0,002$ ^b	$0,021 \pm 0,001$ ^b
$Y_{X/S}$ (g/g)	$0,325 \pm 0,013$ ^a	$0,166 \pm 0,003$ ^b	$0,171 \pm 0,001$ ^b
Conversão açúcares total (%)	$26,21 \pm 4,70$ ^c	$71,0 \pm 0,1$ ^b	$100,0 \pm 0,0$ ^a

Taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), concentração máxima de lípidos acumulados ([Líp]_{máx}), tempo de obtenção da concentração máxima de lípidos acumulados (t [Líp]_{máx}), produtividade volumétrica de lípidos (Prod Vol_L), produtividade específica de lípidos (Prod Esp_{L/x}), rendimento de lípidos obtido em função da biomassa formada ($Y_{L/x}$), rendimento de lípidos obtido em função dos açúcares consumidos ($Y_{L/S}$), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos ($Y_{X/S}$) e percentagem de açúcares totais consumidos (Conversão açúcares total). Valores médios (n=3) \pm erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Na determinação da concentração de açúcares totais presentes no extrato de alfarroba usado, o ensaio com o caudal de arejamento de 0,3 vvm começou com um concentração mais elevada do que era suposto. No entanto não houve qualquer inibição no crescimento, sendo que ambos os ensaios com diferentes caudais de arejamento obtiveram taxas específicas de crescimento e produções de biomassa estatisticamente iguais. Contudo, a produção de lípidos utilizando o caudal de 0,3 vvm foi similar à concentração obtida em balão erlenmeyer, chegando-se apenas às $0,50 \pm 0,01$ g/L. Assim obteve-se um rendimento $Y_{L/x}$ mais baixo, apesar de ambas as produtividades serem mais elevadas do que em balão erlenmeyer por se ter atingido o máximo de concentração de lípidos apenas às 84 h. No entanto, com o crescimento em reator biológico STR com o caudal de 0,3 vvm obteve-se uma maior percentagem de conversão de açúcares.

Comparativamente com o ensaio em balão erlenmeyer, o aumento de escala em reator biológico STR melhorou a produção de biomassa, tendo esta praticamente duplicado. A concentração máxima de lípidos foi semelhante em balão erlenmeyer e em STR a 0,3 vvm, no entanto, embora com o aumento do caudal de arejamento para 0,75 vvm, a produção de biomassa se tenha mantido igual, a produção de lípidos aumentou significativamente, chegando-se a $1,25 \pm$

0,05 g/L. Deste modo, tanto o rendimento $Y_{L/X}$ como a produtividade volumétrica aumentaram, para $0,124 \pm 0,005$ g/L e $7,99 \pm 0,31$ mg/L.h, respetivamente. Por sua vez, a conversão de açúcares total foi de 100%, em que os açúcares de esgotaram completamente às 144 h.

O caudal de arejamento de 0,75 vvm proporcionou uma maior quantidade de oxigénio disponível para a cultura, sendo as necessidades das células elevadas, uma vez que durante a fase exponencial os valores de oxigénio dissolvido baixaram para valores praticamente limitativos (40-30 %), mantendo-se estes valores baixos de % dO_2 ao longo de toda a cultura, chegando mesmo a valores limitativos menores que 30% (Figura 13.F). Por sua vez, com o caudal de 0,3 vvm os valores de % dO_2 nunca foram limitativos, chegando mesmo a valores de 100 % no final do crescimento, provavelmente devido a uma perda de viabilidade. Embora a quantidade de biomassa produzida tenha sido idêntica à obtida com alto arejamento (0,75 vvm), esta cultura não acumulou lípidos, sendo este um processo estritamente aeróbio¹⁰⁷. Logo, a quantidade disponível de oxigénio embora tenha sido suficiente para o metabolismo de produção de biomassa, para o metabolismo lipídico poderá ter sido insuficiente, refletindo-se na produção de lípidos. Os valores de $K_L a$ iniciais destes ensaios com o meio de cultura de acumulação lipídica, foram $30,8 \text{ h}^{-1}$ e $45,7 \text{ h}^{-1}$, respetivamente, para os caudais de arejamento de 0,3 e 0,75 vvm. Estes resultados são indicativos de que as condições de elevado arejamento foram mais favoráveis para a levedura *R. toruloides* CECT 1499 crescer e produzir lípidos neutros.

Analisando o perfil de variação do pH nas duas condições ensaiadas (Figura 15.C e 15.F), verifica-se que o pH nunca baixou mais do que 4,1. O mesmo não acontece quando o crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 ocorre utilizando-se a glucose como fonte de carbono, em que o pH baixa sempre até valores da ordem de 3¹⁰⁸. A alfarroba aparenta exercer um efeito de tampão durante o crescimento, ou seja, o uso do extrato de resíduos alfarroba como substrato, poderá ser bastante vantajoso devido ao seu efeito de tamponamento da cultura, sendo este aspeto bastante benéfico para a acumulação de lípidos. O pH sofre esta diminuição no início do crescimento devido à produção de ácidos orgânicos, nomeadamente o citrato, um composto essencial no metabolismo lipídico. No crescimento de microrganismos oleaginosos, quando o citrato atinge elevadas concentrações celulares é excretado para o meio, baixando o pH, normalmente para valores entre 3 e 3,5^{31,109-111}, sendo necessário manter e retificar o pH da cultura, para valores próximos do 5-6^{31,35,66,67}. Analisando a Figura 15.F, em que é possível observar que

quando há o esgotamento dos açúcares presentes no meio, o pH sobe abruptamente, indicando que possivelmente o citrato presente no meio volta a ser consumido.

Deste estudo pode-se concluir que as condições operacionais, de arejamento e controlo de pH, são extremamente importantes para a acumulação de lípidos. A disponibilidade de oxigénio para que a cultura possa desenvolver eficientemente os seus processos metabólicos tem um papel preponderante na acumulação lipídica. Assim, a definição das condições operacionais, 0,75 vvm e 200 rpm, proporcionam um K_{La} de $45,7 \text{ h}^{-1}$, permitindo uma acumulação de $1,25 \pm 0,05 \text{ g/L}$. Contudo, em termos de rendimento lipídico este ainda se encontra abaixo do referenciado na bibliografia, normalmente entre 50 a 76 % (p/p)^{27,37,97,103,104}. Nesse sentido foram desenvolvidos novas estratégias com o intuito de maximizar o rendimento lipídico.

3.3.3 Influência do vetor de oxigénio, n-dodecano, na produção de lípidos

Uma das estratégias testadas foi a adição de um composto orgânico, o n-dodecano, que funciona como vetor de oxigénio, permitindo o aumento da solubilidade do oxigénio em fase aquosa, ou seja, no meio de cultura^{72,112,113}.

Assim, de modo a aumentar a produção de lípidos, o ensaio seguinte foi realizado com o caudal de arejamento de 0,75 vvm, utilizando o n-dodecano como vetor de oxigénio a uma concentração de 1 % (v/v), decorrendo tal como descrito na secção 2.3.5. O uso deste vetor permite o aumento do K_{La} do meio de cultivo, como já demonstrado nos ensaios realizados com água, apresentados na secção 3.3.1.

Os resultados obtidos do crescimento em reator biológico STR com o caudal de arejamento de 0,75 vvm e a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano estão apresentados na Figura 16 e Tabela 8, onde são comparados com os resultados dos ensaios anteriores.

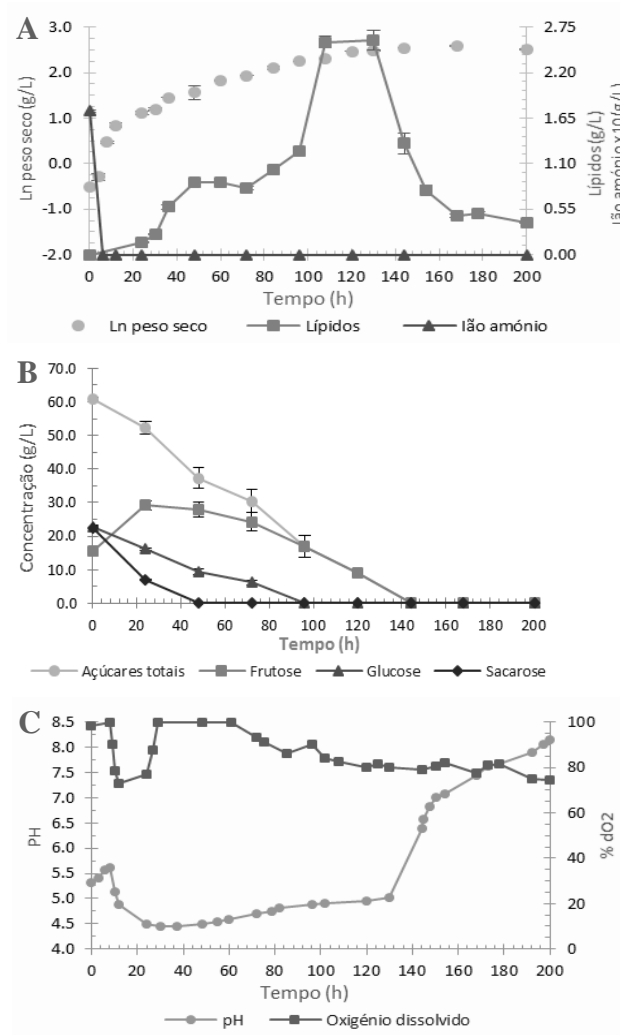


Figura 16. Perfis de crescimento e acumulação lipídica (A), de consumo de açúcares totais de alfarroba (B), e de variação de pH e % dO₂ (C), pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com o caudal de arejamento de 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano. O crescimento foi realizado em reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1°C.

Tal como se pode observar na Figura 16.A, com o arejamento de 0,75 vvm e o uso de 1% (v/v) n-dodecano como vetor de oxigénio, foi possível aumentar substancialmente a produção de lípidos em relação aos ensaios sem n-dodecano (Figura 15.D), tanto com baixo como com elevado arejamento. Com idêntico caudal de arejamento (0,75 vvm) atingiu-se uma concentração de lípidos de $2,57 \pm 0,06$ g/L, o dobro do ensaio sem o vetor, em que apenas se chegou às $1,25 \pm 0,05$ g/L. Não só por se atingir uma maior concentração de lípidos mas também por o conseguir em menor tempo de cultura, apenas 108 h, foi possível obterem-se valores de produtividades bastantes mais elevadas, relativamente aos restantes ensaios, com produtividades volumétrica e específica de

23,79 ± 0,60 mg/L.h e 2,51 ± 0,07 mg/g.h, respetivamente. Ainda relativamente aos ensaios anteriores, observou-se um ligeiro aumento na produção de biomassa, em que apesar de se obter uma taxa específica máxima de crescimento estatisticamente igual à do ensaio anterior, neste ensaio a fase estacionária iniciou-se apenas às 144 h de crescimento, após o esgotamento dos açúcares. Assistiu-se a uma nítida fase exponencial entre as 0 e 12 h de cultura, seguindo-se um abrandamento no crescimento celular, com uma taxa específica de 0.0105 ± 0.0007 h⁻¹, resultando num aumento da concentração máxima de biomassa para 13,30 ± 0,14 g/L, às 168 h de cultura.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos de crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes caudais de arejamento, 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1°C.

	0,3 vvm	0,75 vvm	0,75 vvm + 1% (v/v) n-dodecano
μ (h ⁻¹)	0,140 ± 0,022 ^a	0,153 ± 0,022 ^a	0,130 ± 0,022 ^a
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	11,65 ± 0,08 ^b	10,58 ± 0,02 ^c	13,30 ± 0,14 ^a
[Líp] _{máx} (g/L)	0,50 ± 0,01 ^c	1,25 ± 0,05 ^b	2,57 ± 0,06 ^a
t [Líp] _{máx} (h)	84	156	108
Prod Vol _L (mg/L.h)	5,97 ± 0,08 ^c	7,99 ± 0,31 ^b	23,79 ± 0,60 ^a
Prod Esp _{L/x} (mg/g.h)	0,82 ± 0,02 ^b	0,79 ± 0,03 ^b	2,51 ± 0,07 ^a
Y _{L/x} (g/g)	0,069 ± 0,002 ^c	0,124 ± 0,005 ^b	0,271 ± 0,008 ^a
Y _{L/S} (g/g)	0,022 ± 0,002 ^b	0,021 ± 0,001 ^b	0,042 ± 0,001 ^a
Y _{X/S} (g/g)	0,166 ± 0,003 ^b	0,171 ± 0,001 ^b	0,210 ± 0,003 ^a
Conversão açúcares total (%)	71,0 ± 0,1 ^b	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a

Concentração inicial de açúcares de alfarroba ([Aç. tot. alf.]), taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), concentração máxima de lípidos acumulados ([Líp]_{máx}), tempo de obtenção da concentração máxima de lípidos acumulados (t [Líp]_{máx}), produtividade volumétrica de lípidos (Prod Vol_L), produtividade específica de lípidos (Prod Esp_{L/x}), rendimento de lípidos obtido em função da biomassa formada (Y_{L/x}), rendimento de lípidos obtido em função dos açúcares consumidos (Y_{L/S}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/S}) e percentagem de açúcares totais consumidos (Conversão açúcares total). Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Deste modo, o uso de n-dodecano possibilitou um claro aumento do rendimento Y_{L/x} para 27 % (p/p), sendo que no ensaio sem este vetor de oxigénio apenas se tinha conseguido obter 12 % (p/p), com idêntico caudal de arejamento. Além disso, o rendimento lipídico obtido por gravimetria também aumentou, com 32,5 % (p/p), em que no ensaio anterior só se obteve 16,8 % (p/p). Estes resultados são indicativos do potencial que a levedura *R. toruloides* CECT 1499 tem para acumular lípidos neutros. O perfil de consumo de açúcares foi muito semelhante (existindo novamente a

ação do enzima invertase, tal como se pode ver na Figura 16.B), sendo que o rendimento $Y_{L/S}$ passou para o dobro, com $0,042 \pm 0,001$ g/g, e o rendimento $Y_{x/S}$ aumentou para $0,210 \pm 0,003$ g/g.

O pH (Figura 16.C) apresentou um perfil muito semelhante ao ensaio com o caudal de arejamento de 0,75 vvm sem a adição de n-dodecano. No início o pH desceu até valores da ordem dos 4 - 4,5, devido à elevada produção de citrato que depois é excretado para o meio de cultura, e quando os açúcares são totalmente consumidos o pH sobe repentinamente até valores de 7 no espaço de poucas horas, provavelmente porque o citrato presente no meio volta a ser consumido.

Neste ensaio, tal como no ensaio a 0,75 vvm sem a adição de n-dodecano, também se pode verificar que quando os açúcares totais de alfarroba se esgotaram, altura em que é atingida a concentração máxima de lípidos, estes diminuem. O facto de os açúcares totais de alfarroba se encontrarem já em concentrações muito baixas, pode ter limitado a produção de lípidos, às 140 h de cultura. Analisando a Figura 16, observa-se que o máximo de lípidos foi atingido entre as 120 e 140 h de cultura, após a qual houve o esgotamento dos açúcares da alfarroba.

Analisando os perfis de O_2 dissolvido dos ensaios com o arejamento de 0,75 vvm, sem vetor de oxigénio (Figura 15.F) e com a adição do vetor de oxigénio, n-dodecano (Figura 16.C) a principal diferença entre estes dois ensaios foi a % dO_2 disponível no meio. No ensaio com 1% (v/v) de n-dodecano, os valores de % dO_2 estiveram sempre acima dos 70%, nunca entrando em valores limitativos, enquanto que no ensaio sem vetor, após as primeiras 10 h de cultura, os valores de O_2 dissolvido variaram entre os 40-20 %, sendo estes limitativos, condicionando a produção de lípidos^{105,114,115}.

Tal como se pode observar na Figura 17, bem como com os resultados obtidos com os ensaios da secção 3.3.1, o uso de 1% (v/v) de n-dodecano aumenta o K_{LA} do meio de cultura, não só no início do crescimento, como ao longo do crescimento.

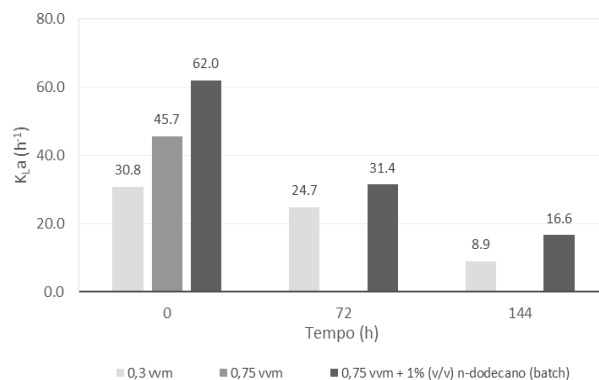


Figura 17. Valores de K_{LA} obtidos durante o crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes caudais de arejamento, 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Para o caudal de arejamento de 0,75 vvm não foi possível determinar o K_{LA} às 72 e 144 h, por os valores de % dO_2 se apresentarem muito baixos.

Com já foi referido, o K_{LA} passa de $30,8 \text{ h}^{-1}$ para $45,7 \text{ h}^{-1}$, usando os caudais de arejamento de 0,3 e 0,75 vvm, respetivamente. Ainda assim, quando se adiciona 1% (v/v) de n-dodecano ao meio de cultura com um caudal de 0,75 vvm, o K_{LA} aumenta ainda mais, chegando a valores de $62,0 \text{ h}^{-1}$. Ao longo do crescimento o K_{LA} vai diminuindo, devido ao aumento da concentração de biomassa, que aumenta a viscosidade do meio e dificulta assim a transferência de oxigénio, tal como demonstrado por outros autores^{71,72,112}. Além disso este aumento de biomassa leva principalmente a uma diminuição do oxigénio disponível no meio, sendo que o arejamento utilizado torna-se insuficiente para as elevadas densidades celulares da levedura estritamente aeróbia *R. toruloides* CECT 1499. Xu *et al.* (2015)¹¹⁶ também verificaram que ao longo do crescimento da levedura *R. toruloides* o K_{LA} do meio diminui, tendo inicialmente valores entre $43,5$ e $57,2 \text{ h}^{-1}$, e baixando para aproximadamente $25,5 \text{ h}^{-1}$ no final do crescimento.

Visto que com o uso de n-dodecano houve uma maior produção de biomassa, a diminuição do K_{LA} ao longo do crescimento foi mais acentuada do que no ensaio em que se usou o caudal de 0,3 vvm. Contudo, é possível verificar que utilizando o vetor de oxigénio, os valores de K_{LA} são sempre maiores durante todo o crescimento, comparativamente aos outros ensaios. De notar que não foi possível determinar restantes os valores de K_{LA} do ensaio com o caudal de 0,75 vvm sem n-dodecano, visto que a percentagem de oxigénio dissolvido no meio se encontrava bastante baixa, não sendo possível parar o arejamento para fazer as respetivas medições.

Na Figura 18 estão representados os valores de taxa respiratória (TR) e taxa respiratória específica (TR_{esp}) obtidos ao longo dos crescimentos com os caudais de arejamento de 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1% (v/v) n-dodecano.

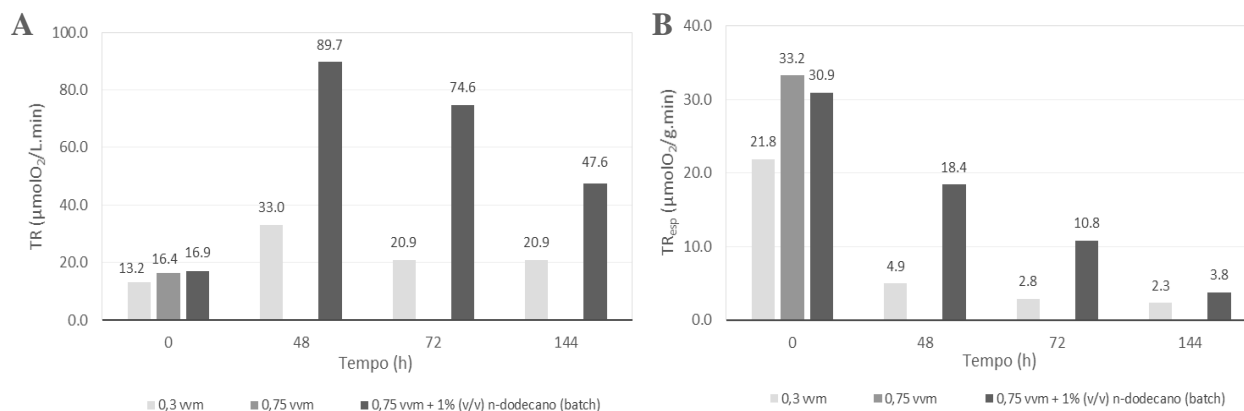


Figura 18. Valores de TR (A) e TR_{esp} (B) obtidos durante o crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes caudais de arejamento, 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1% (v/v) de n-dodecano. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Para o caudal de arejamento de 0,75 vvm não foi possível determinar a TR e TR_{esp} às 72 e 144 h, por os valores de % dO_2 se apresentarem muito baixos.

Também neste caso, não foi possível determinar os valores de TR e TR_{esp} ao longo do crescimento com o caudal de 0,75 vvm sem n-dodecano, visto que a percentagem de oxigénio dissolvido no meio se encontrava em valores limitativos. No entanto, é possível verificar que ambas as taxas respiratórias foram bastante mais elevadas no ensaio com n-dodecano do que no ensaio com o caudal de apenas 0,3 vvm. No crescimento com o caudal de arejamento de 0,75 vvm sem n-dodecano as taxas respiratórias foram ligeiramente inferiores do que no crescimento com n-dodecano, provavelmente pela disponibilidade de oxigénio também ter sido inferior, uma vez que o vetor de oxigénio, n-dodecano, aumenta a solubilidade deste gás no meio de cultura, possibilitando às células uma maior acessibilidade ao oxigénio. Pode-se observar também que com o aumento das horas de cultivo ambas as taxas respiratórias diminuem, sendo esse decréscimo mais acentuado no ensaio com o uso do n-dodecano. Isto porque a densidade celular aumenta e o caudal de arejamento, que se mantém sempre constante, deixa de ser suficiente, havendo cada vez menos oxigénio disponível para cada célula. Xu *et al.* (2015)¹¹⁶ também observaram que com o aumento de biomassa ao longo do crescimento da levedura *R. toruloides* a taxa respiratória

diminuía, tendo valores iniciais de 41,3 $\mu\text{molO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$ que após 160 h de cultura diminuíram para 16,9 $\mu\text{molO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$, aproximadamente.

Deste modo, pode-se concluir que o oxigénio disponível no meio de cultura é um fator crucial no crescimento e produção de lípidos por parte da levedura *R. toruloides* CECT 1499, sendo que com o caudal de arejamento mais elevado, 0,75 vvm, e com a adição de 1% (v/v) de n-dodecano obteve-se a maior concentração de lípidos, com $2,57 \pm 0,06$ g/L às 108 h de crescimento e um rendimento lipídico de 32,5 %, obtido por gravimetria.

3.3.4 Crescimento e produção de lípidos pela levedura *R. toruloides* em modo *fed-batch*

Com a realização dos ensaios anteriores sobre o efeito do oxigénio na produção de lípidos, foi possível concluir que as melhores condições para a produção de biomassa e lípidos eram com a utilização de um caudal de arejamento de 0,75 vvm com a adição de 1% (v/v) de n-dodecano, em reator biológico STR e em modo *batch*, com o rácio molar C/N 330.

Contudo, às 144 h de crescimento os açúcares totais de alfarroba já tinham sido completamente consumidos, altura em que a produção de lípidos cessou, o pH começou a subir e os lípidos existentes diminuíram, pressupondo-se que foram consumidos quase na totalidade pela levedura *R. toruloides* CECT 1499. De modo a evitar o esgotamento dos açúcares totais de alfarroba e a aumentar ainda mais a produção de lípidos, foi feito um novo ensaio com as mesmas condições do anterior, mas em que o modo de operação foi o semi-descontínuo (*fed-batch*). Vários são os autores que indicam que é possível obter melhores rendimentos $Y_{L/X}$ em modo *fed-batch* do que em modo *batch*, usando a glucose como fonte de carbono^{35,97,68}.

Assim, o ensaio foi realizado em reator biológico STR com o rácio C/N inicial de 330, com o caudal de arejamento de 0,75 vvm e a adição de 1% (v/v) de n-dodecano, em que foram feitas duas adições, às 48 e 96 h, de extrato de resíduo de alfarroba contendo aproximadamente 30 g/L de açúcares totais. Os perfis de crescimento, acumulação lipídica, consumo de açúcares totais de alfarroba, e de variação de pH e % dO_2 obtidos estão representados na Figura 19. O crescimento foi realizado com uma agitação de 200 rpm e uma temperatura de 30 ± 1 °C, durante 216 h, decorrendo tal como descrito na secção 2.3.5.

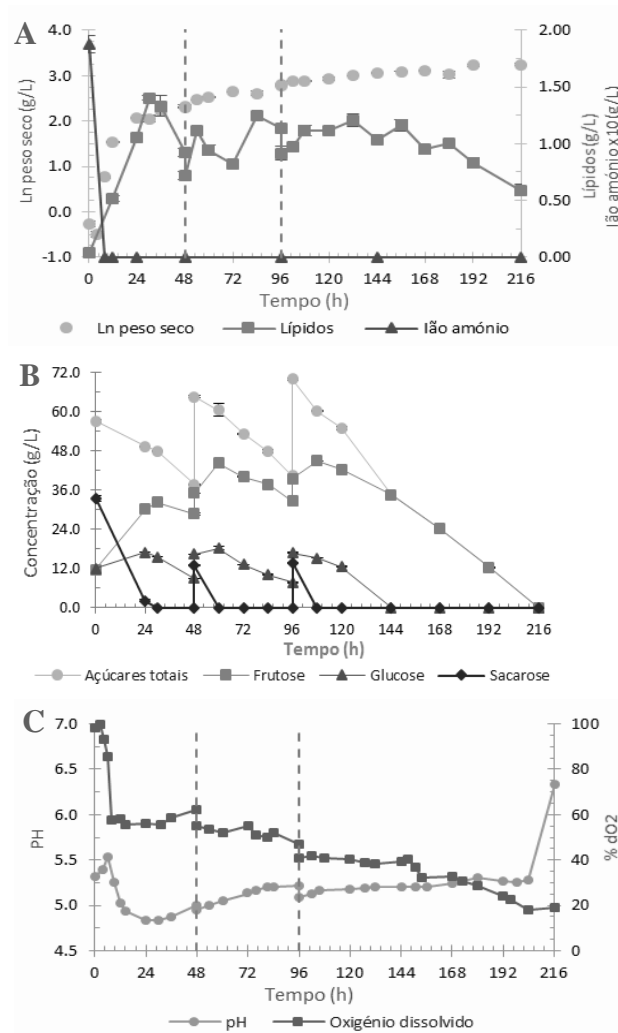


Figura 19. Perfis de crescimento e acumulação lipídica (A), de consumo de açúcares totais de alfarroba (B), e de variação de pH e % dO₂ (C), pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em modo *fed-batch*, com o caudal de arejamento de 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano. Foram feitas adições de aproximadamente 30 g/L de extrato de alfarroba às 48 e 96 h. O crescimento foi realizado em reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1°C.

Em análise à Figura 19 e Tabela 9, é possível concluir que este ensaio em modo *fed-batch* resultou no aumento bastante elevado de produção de biomassa, apesar de a produção de lípidos ser mais baixa, do que na cultura em modo *batch*, em idênticas condições. A taxa específica máxima de crescimento foi semelhante à do ensaio em que decorreu em modo *batch*, $0,147 \pm 0,015 \text{ h}^{-1}$, sendo que houve um ligeiro crescimento ao longo do ensaio, com uma taxa específica de crescimento de $0,0065 \pm 0,0004 \text{ h}^{-1}$. Assim, com os açúcares adicionados foi possível atingir-se uma concentração de biomassa muito mais elevada, $25,23 \pm 0,68 \text{ g/L}$, dentro da mesma gama de valores atingidos por outros autores, usando a glucose como fonte de carbono^{38,103,117}.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos de crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com 0,75 vvm na ausência e na presença de 1 % (v/v) de n-dodecano, em modo de cultivo *batch* e *fed-batch*. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e 30 ± 1 °C.

	0,75 vvm (<i>batch</i>)	0,75 vvm + 1% (v/v) n-dodecano (<i>batch</i>)	0,75 vvm + 1% (v/v) n-dodecano (<i>fed-batch</i>)
μ (h ⁻¹)	0,153 ± 0,022 ^a	0,130 ± 0,022 ^a	0,147 ± 0,015 ^a
X _{máx} (g/L)	10,58 ± 0,02 ^c	13,30 ± 0,14 ^b	25,23 ± 0,68 ^a
[Líp] _{máx} (g/L)	1,25 ± 0,05 ^b	2,57 ± 0,06 ^a	1,40 ± 0,02 ^b
t [Líp] _{máx} (h)	156	108	30
Prod Vol _L (mg/L.h)	7,99 ± 0,31 ^c	23,79 ± 0,60 ^b	45,52 ± 0,68 ^a
Prod Esp _{L/x} (mg/g.h)	0,79 ± 0,03 ^c	2,51 ± 0,07 ^b	6,13 ± 0,46 ^a
Y _{L/X} (g/g)	0,124 ± 0,005 ^c	0,271 ± 0,008 ^a	0,184 ± 0,014 ^b
Y _{L/S} (g/g)	0,021 ± 0,001 ^b	0,042 ± 0,001 ^b	0,148 ± 0,011 ^a
Y _{X/S} (g/g)	0,171 ± 0,001 ^c	0,210 ± 0,003 ^b	0,240 ± 0,007 ^a
Conversão açúcares total (%)	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a	100,0 ± 0,0 ^a

Concentração inicial de açúcares de alfarroba ([Aç. tot. alf.]_i), taxa específica de crescimento (μ), concentração máxima de biomassa (X_{máx}), concentração máxima de lípidos acumulados ([Líp]_{máx}), tempo de obtenção da concentração máxima de lípidos acumulados (t [Líp]_{máx}), produtividade volumétrica de lípidos (Prod Vol_L), produtividade específica de lípidos (Prod Esp_{L/x}), rendimento de lípidos obtido em função da biomassa formada (Y_{L/X}), rendimento de lípidos obtido em função dos açúcares consumidos (Y_{L/S}), rendimento de biomassa formada em função dos açúcares consumidos (Y_{X/S}) e percentagem de açúcares totais consumidos (Conversão açúcares total). Valores médios (n=3) ± erro padrão, numa linha valores com a mesma letra não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste Student-Newman-Keuls (P<0.05).

Quanto à produção de lípidos, chegou-se às $1,40 \pm 0,02$ g/L, ao fim de 30 h de cultura, ainda antes de ser feita a primeira adição de extrato de alfarroba. Analisando a Figura 19.A pode-se observar que apesar de a produção de lípidos aumentar até cerca das 132 h, ao se fazer as adições a concentração de lípidos fica mais diluída, dificultando o objetivo de se atingir maiores concentrações em g/L após as adições. O facto da % dO₂ se encontrar baixa, na ordem dos 60 % e baixando até 20 % no final da cultura, também pode ter inibido a produção de lípidos. Este aspeto será referido e discutido mais à frente neste capítulo.

Ainda assim, por se ter atingido o máximo de concentração de lípidos às 30 h as produtividades foram bem mais elevadas do que no ensaio anterior, com uma produtividade volumétrica de $45,52 \pm 0,68$ mg/L.h e uma produtividade específica de $6,13 \pm 0,46$ mg/g.h. Contudo, devido à elevada produção de biomassa, o rendimento Y_{L/X} foi mais baixo, descendo para $0,184 \pm 0,014$ g/g, em relação ao rendimento de $0,271 \pm 0,008$ g/g do ensaio anterior. No entanto obteve um rendimento lipídico por gravimetria de 29,9 % (p/p), semelhante ao valor do ensaio anterior, 32,5 % (p/p).

Em análise à Figura 19.B pode-se verificar novamente a ação do enzima invertase e a preferência pelo consumo de glicose. Tal como seria de esperar, quando são feitas as adições de extrato de alfarroba a sacarose adicional é também rapidamente hidrolisada em glicose e frutose.

Contudo, em modo *fed-batch* foi possível adiar o esgotamento dos açúcares totais, sendo que estes apenas se esgotaram no final do crescimento, às 216 h. Consequentemente, obteve-se uma produção lipídica mais estável relativamente ao ensaio anterior, em que durante aproximadamente 120 h houve uma produção de lípidos constante, sempre com açúcares de alfarroba disponíveis.

Deste modo, o pH teve um comportamento igual aos ensaios anteriores (Figura 17.C), mas neste caso apenas atingiu valores mais elevados no final do crescimento, quando os açúcares totais foram completamente consumidos. Novamente, o pH desceu no início do crescimento, sugerindo que o citrato é secretado para o meio de cultura. Neste ensaio, devido às adições de extrato de alfarroba, o efeito tampão da alfarroba foi mais notório, estabilizando o pH ao longo do crescimento, não deixando que este baixasse para valores muito baixos, da ordem de 3, como aconteceu com a cultura de *R. toruloides* CECT 1499 crescida em glicose¹⁰⁸.

Neste ensaio, com o objetivo de não limitar a cultura em termos da fonte de carbono e promover o aumento da acumulação de lípidos, a cultura decorreu em modo *fed-batch*, contudo as restantes condições operacionais mantiveram-se, pelo que a principal diferença que possa ter afetado a produção de lípidos foi a percentagem de oxigénio dissolvido no meio, em que a partir das 8 h de crescimento esteve sempre abaixo de 60 % chegando a valores limitativos (20 %) (Figura 19.C). O arejamento manteve-se a 0,75 vvm, e contrariamente ao ensaio que decorreu com idêntico arejamento e adição de 1 % (v/v) n-dodecano, neste caso não foi suficiente para colmatar as necessidades da célula em termos do metabolismo lipídico. Aparentemente, o oxigénio presente na cultura foi utilizado na produção de biomassa, tendo sido insuficiente para a acumulação de lípidos, uma vez que este processo é estritamente aeróbio e tem exigências em termos de oxigenação elevadas^{76,104}.

Na Figura 20 encontram-se representados os valores de K_{La} obtidos para todos os ensaios realizados em reator biológico STR de 2 L com a levedura *R. toruloides* CECT 1499.

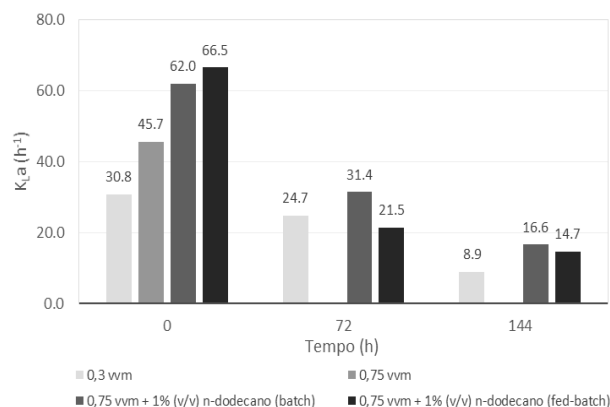


Figura 20. Valores de K_{La} obtidos durante o crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes caudais de arejamento, 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano em modo *batch* e *fed-batch*. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Para o caudal de arejamento de 0,75 vvm não foi possível determinar o K_{La} às 72 e 144 h, por os valores de % dO_2 se apresentarem muito baixos.

Pode-se observar que no início do crescimento o K_{La} do ensaio em modo *fed-batch* se encontrava semelhante ao K_{La} do ensaio em modo *batch*. Todavia, no decorrer do crescimento em modo *fed-batch* o K_{La} decresceu mais do que no ensaio em modo *batch*, por haver uma maior produção de biomassa, tornando a cultura mais densa e com maiores exigências em termos de oxigenação, o que dificulta a transferência de oxigênio.

Estes resultados de K_{La} refletiram-se no consumo de oxigênio por parte da levedura *R. toruloides* CECT 1499, representado pela Figura 21.

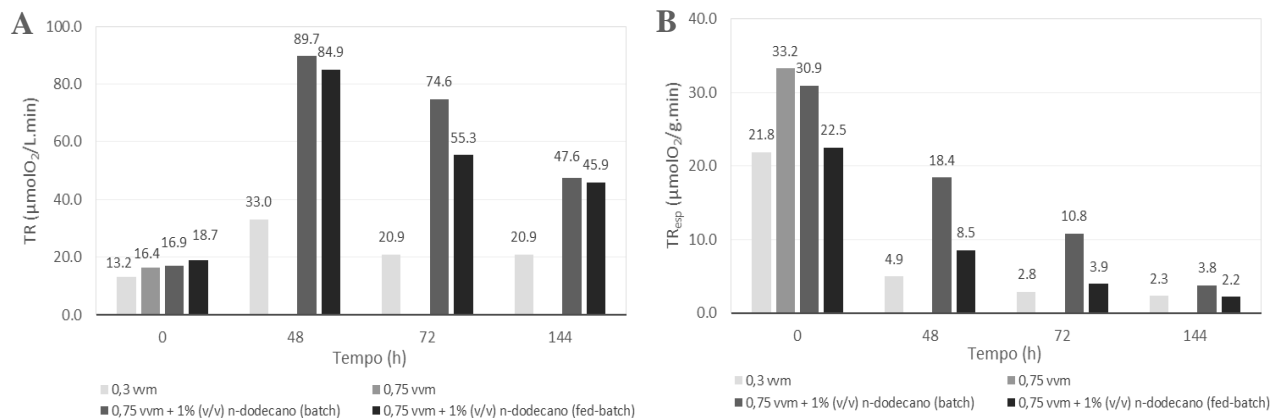


Figura 21. Valores de TR (A) e TR_{esp} (B) obtidos durante o crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes caudais de arejamento, 0,3 vvm, 0,75 vvm e 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano em modo *batch* e *fed-batch*. Os crescimentos foram realizados reator biológico STR de 2 L durante 200 h, a 200 rpm e $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Para o caudal de arejamento de 0,75 vvm não foi possível determinar a TR e TR_{esp} às 72 e 144 h, por os valores de % dO_2 se apresentarem muito baixos.

Na Figura 21 pode-se observar a evolução das taxas respiratórias volumétricas e específicas ao longo do tempo de cultura, obtidas em cada um dos ensaios. Pela análise da figura 21.A, observa-se que no início da cultura, às 0 h, os valores das taxas respiratórias são semelhantes, no entanto, a cultura que decorreu com baixo caudal de arejamento (0,3 vvm) apresentou logo no início um valor ligeiramente inferior, sendo notória a diferença com o evoluir do tempo de cultura. Às 48 e 144 h as taxas respiratórias foram semelhantes em ambos os modos de operação, contudo às 72 h, o *fed-batch* apresentou um valor inferior (55,3 $\mu\text{molO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$) relativamente à cultura em *batch* (74,6 $\mu\text{molO}_2/\text{L}\cdot\text{min}$).

Quando se compara os valores de moles de O_2 consumido por grama de peso seco, pode-se verificar que ao longo do crescimento em modo *fed-batch* este valor é muito menor do que em modo *batch*, sendo este mais próximo do valor de taxa respiratória específica do ensaio em modo *batch* usando apenas um caudal de arejamento de 0,3 vvm. Estes resultados sugerem que a cultura que decorreu em *fed-batch*, com o caudal de arejamento de 0,75 vvm e com a adição de 1% de n-dodecano, se encontrou limitada em termos de oxigenação, em que esta poderá não ter sido suficiente para induzir a produção de lípidos devido à elevada produção de biomassa.

Assim pode-se concluir que o modo de operação em modo *fed-batch* permitiu a produção elevada de biomassa, e tem potencial para induzir a produção de lípidos, se houver maior disponibilidade de oxigénio, com um caudal de arejamento mais elevado e/ou com a adição de mais n-dodecano, que irá aumentar a solubilidade do oxigénio no meio aquoso, durante o crescimento celular, podendo colmatar a limitação de oxigenação existente.

3.4 Análise do perfil de ácidos gordos

Dos diferentes ensaios realizados em reator biológico foi realizada a hidrólise dos lípidos produzidos e determinou-se o respetivo perfil de ácidos gordos, de modo a avaliar o potencial que o óleo produzido pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 tem para substituir o diesel de origem fóssil, bem como o biodiesel de primeira geração.

Sabe-se que a composição de ácidos gordos dos óleos usados tem influência na qualidade do biodiesel produzido. Consoante o tipo de ácidos gordos existentes, ácidos gordos saturados, monoinsaturados ou polinsaturados, algumas propriedades do biodiesel produzido podem variar,

tais como a estabilidade oxidativa, a viscosidade, o índice de iodo e principalmente o número de cetano^{35,118,119}.

Assim, para determinar o perfil de ácidos gordos foi realizada a extração de lípidos existentes nos meios de crescimento no final de cada um dos últimos dois ensaios, em reator biológico STR 2 L, com um caudal de arejamento de 0,75 vvm e com a adição de 1% (v/v) de n-dodecano, em modo *batch* e *fed-batch*. As extrações e hidrólises dos lípidos produzidos foram realizadas tal como descritos nas secções 2.5.7 e 2.5.8.

Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 10, onde são comparados com estudos anteriores realizados no LEBA anteriormente e com os diferentes óleos vegetais mais frequentemente usados para a produção de biodiesel de primeira geração.

Tabela 10. Perfil de ácidos gordos produzidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, comparados com os perfis de ácidos gordos de outras estirpes e óleos usados para a produção de biodiesel^{35,109,118,120-123}.

	Ácidos gordos % (p/p)						Referências
	Palmítico C16:0	Oleico C18:1	Linoleico C18:2	Esteárico C18:0	Linolénico C18:3	Outros	
<i>R. toruloides</i> CECT 1499 (<i>batch</i> ; alfarroba)	56,1 ± 0,2		40,2 ± 0,1	-	-	3,7 ± 0,2	Este trabalho
<i>R. toruloides</i> CECT 1499 (<i>fed-batch</i> ; alfarroba)	61,5 ± 0,5		33,4 ± 0,4	-	-	5,2 ± 0,1	Este trabalho
<i>R. toruloides</i> CECT 1499 (<i>batch</i> ; glucose)	61,5		24,6	2,7	-	11,1	Guerreiro, 2013 ¹⁰⁸
<i>R. toruloides</i> Y4 (<i>fed-batch</i> ; glucose)	20,0	46,9	13,1	14,6	3,5	1,9	Li <i>et al.</i> , 2007 ³⁵
<i>Chlorella sorokiniana</i> (alfarroba)	65,85		28,07	3,91	-	2,17	Nunes, 2013 ¹²³
Óleo de soja	11,4 - 13,9	21,8 - 24,9	53,0 - 56,2	2,1 - 3,6	4,3 - 8,3	0,0 - 7,4	118,120-122
Óleo de colza	3,4 - 3,5	64,1 - 64,4	20,4 - 22,3	0,8 - 0,9	7,9 - 8,2	0,7 - 3,4	118,120-122
Óleo de milho	6,5 - 11,8	24,8 - 25,2	60,6 - 65,6	1,4 - 2,0	0,0 - 0,5	0,2 - 6,7	118,120-122
Óleo de palma	36,7 - 42,8	40,5 - 46,1	8,6 - 10,1	4,4 - 6,6	0,2 - 0,3	1,7 - 9,6	118,120-122

Em análise à tabela 10 pode-se verificar que o perfil de ácidos é semelhante em ambos os ensaios. De notar que devido ao facto dos ácidos palmítico e oleico apresentarem tempos de retenção semelhantes, não foi possível separar estes ácidos por HPLC. Assim a percentagem apresentada relativa ao ácido palmítico e oleico, é a soma da composição percentual destes dois ácidos. Pode-se observar que em modo *fed-batch* houve um ligeiro aumento na produção de ácidos palmítico e oleico, bem como uma ligeira diminuição na produção de ácido linoleico. Em ambos os casos há uma pequena percentagem de um outro ácido gordo que não se pode identificar, devido a não se possuir um padrão. Tendo em conta que este outro ácido detetado tem um tempo de retenção de 5,3 min, e segundo a literatura, é possível que este seja o ácido mirístico ou o ácido laurico, também designados por ácido tetradecanóico e ácido dodecanóico, respetivamente ^{105,118,124}. A possível presença de um destes ácidos poderá estar relacionada com o uso de n-dodecano como vetor de oxigénio ¹²⁵.

Comparando com o crescimento da levedura *R. toruloides* CECT 1499 em modo *batch* nas mesmas condições, mas com a glucose como fonte de carbono, pode-se verificar que a produção de ácidos palmítico e oleico é semelhante, mas a produção de ácido linoleico é bastante mais baixa, para além de existir ácido esteárico e uma maior quantidade de outros ácidos não qualificados. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de o perfil de ácidos gordos variar consoante a fonte de carbono usada, para além da temperatura e pH ^{9,31}. Neste caso, a utilização de extrato de alfarroba pode ter uma grande influência no tipo de ácidos gordos produzidos pela levedura, visto que a própria alfarroba tem na sua composição vários ácidos gordos. Segundo Ayaz *et al.* (2009), a vagem de alfarroba apresenta mais abundantemente o ácido oleico, com 562 ± 32 µg/g, e também os ácidos palmíticos e linoleico, com 270 ± 13 µg/g e 245 ± 16 µg/g, respetivamente ⁹⁹. Este facto pode explicar a maior produção destes três ácidos gordos quando é usada o extrato de alfarroba como fonte de carbono, especialmente a maior produção de ácido linoleico, quando comparada com os casos em que é usada a glucose como fonte de carbono.

Por sua vez, a composição de ácidos gordos de óleos produzidos por microrganismos oleaginosos também pode variar consoante a estirpe ou espécie usadas ⁹. Na Tabela 10 pode-se ver que o perfil de ácidos gordos produzidos pela levedura *R. toruloides* Y4, em modo *fed-batch* e com a glucose como fonte de carbono é diferente daqueles obtidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, mas mais semelhante ao perfil obtido em modo *batch* com o uso de glucose, do que em modo *fed-batch* com o uso de extrato de alfarroba. Por outro lado, também é possível observar

que a microalga *Chlorella sorokiniana* em condições de mixotrofia, usando o extrato de alfarroba como fonte de carbono, produz um perfil de ácidos gordos semelhante ao da levedura *R. toruloides* CECT 1499 crescida com extrato de alfarroba. Isto pode indicar que a fonte de carbono usada exerce maior influência no perfil de ácidos gordos produzidos.

Quando comparados com os perfis de ácidos gordos dos óleos vegetais mais frequentemente usados na produção de biodiesel de primeira geração, verifica-se que os óleos microbianos apresentam uma composição semelhante. Pode-se ver que, tal como óleo produzido pela estirpe *R. toruloides* Y4, todos os óleos vegetais apresentam maior percentagem de ácido oleico do que palmítico (excluindo o óleo de palma, que naturalmente apresenta uma elevada quantidade de ácido palmítico). Logo, apesar de não ser possível distinguir e saber a composição percentual de cada um dos ácidos palmítico e oleico produzidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, pode-se deduzir que muito provavelmente que o ácido oleico é produzido em maiores quantidades.

Como já discutido na introdução, para o biodiesel ser considerado como um biocombustível de qualidade tem de respeitar os limites impostos pela Norma Europeia de Qualidade EN 14214⁵³, apresentados na tabela 2. Uma vez que o perfil de ácidos gordos dos óleos usados influencia principalmente no número de cetano do biodiesel produzido, para garantir uma boa qualidade os óleos devem ser constituídos maioritariamente por ácidos gordos monoinsaturados^{26,29,118,119}.

Visto que o óleo produzido pela *R. toruloides* CECT 1499 provavelmente tem uma maior quantidade percentual de ácido oleico, segundo vários autores pode-se afirmar que este óleo é adequado para a produção de biodiesel, garantindo-se que tem um número de cetano maior que 51, valor imposto pela EN 14214^{26,29,118,119}.

4 Conclusão

A utilização de biodiesel de segunda geração apresenta-se como uma alternativa mais sustentável ao uso de energias fósseis. No entanto, para ser considerado um processo eficiente e rentável, vários são os fatores a ter em conta, principalmente o uso de matérias-primas de baixo custo, de forma a diminuir o custo do processo.

O objetivo principal desta dissertação foi a otimização das condições de crescimento e de acumulação de lípidos da levedura *R. toruloides* CECT 1499, usando resíduos de alfarroba como fonte de carbono. Para tal, foram delineadas diferentes estratégias, tendo como base que a produção de biomassa e lípidos é condicionada principalmente pelo rácio C/N utilizado e pelas condições de transferência de massa de oxigénio.

Testaram-se diferentes meios YPD com as concentrações iniciais de alfarroba de 15, 70 e 200 g/L, que promovesse a produção de biomassa no inóculo, bem como em que a viabilidade celular fosse máxima. Concluiu-se que o melhor meio é o constituído por 15 g/L de açúcares totais de alfarroba, que apresentou a maior taxa específica de crescimento, $0,067 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$, com uma biomassa máxima de $9,22 \pm 0,13 \text{ g/L}$. Para além disso, foi aquele que atingiu a concentração de células viáveis por mL de meio mais elevada, chegando às $8.63\text{E}+07 \pm 4.82\text{E}+06 \text{ cel/mL}$ em 48 h. Assim, este foi o meio usado para a preparação dos pré-inóculos, sendo estes incubados durante 48 h, e usados na passagem para o meio de acumulação lipídica. Igualmente, verificou-se que a levedura *R. toruloides* é sensível a elevadas concentrações de açúcares, ocorrendo inibição de crescimento, possivelmente devido a choque osmótico e à eventual presença de compostos fenólicos no extrato de alfarroba. Tanto neste, como nos ensaios seguintes, observou-se que o enzima invertase estava ativo, hidrolisando a sacarose em glucose e frutose.

Com o objetivo de promover a produção de lípidos, foram testados diferentes rácios C/N, variando a concentração de açúcares totais de alfarroba entre 15 e 200 g/L, com duas concentrações de sulfato de amónio, 0,1 g/L e 0,5 g/L. O rácio C/N 330, com 70 g/L de açúcares totais de alfarroba e 0,1 g/L de sulfato de amónio foi o que apresentou maior produção lipídica, com um rendimento de 10 % (p/p) e uma concentração máxima de lípidos de $0,48 \pm 0,01 \text{ g/L}$.

Diferentes estratégias foram testadas com o objetivo de aumentar a produção lipídica e de biomassa em reator biológico de 2-L. A determinação do K_{La} inicial do meio, em reator biológico STR de 2 L, mostraram que o aumento do caudal de arejamento de 0,3 para 0,75 vvm promoveu um incremento entre 10 a 20 % no valor de K_{La} , e a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano aumentou o K_{La} em aproximadamente 20 %, melhorando as condições de transferência de massa de oxigénio.

Os estudos realizados com a levedura *R. toruloides*, em reator biológico STR de 2 L mostraram que o caudal de arejamento de 0,3 vvm, foi insuficiente para induzir o metabolismo lipídico, havendo apenas produção de biomassa, que atingiu $11,65 \pm 0,08$ g/L. Com alto caudal de arejamento de 0,75 vvm, a biomassa produzida foi semelhante, ao obtido com 0,3 vvm, mas a produção de lípidos aumentou, chegando-se a um rendimento lipídico de 17 % (p/p), com $1,25 \pm 0,05$ g/L de lípidos, sendo os açúcares totalmente consumidos. Por sua vez, com o uso do n-dodecano a 1 % (v/v) e igual caudal de arejamento de 0,75 vvm, a produção de lípidos aumentou consideravelmente, atingindo-se uma concentração máxima de $2,57 \pm 0,06$ g/L e um rendimento em lípidos de 33 % (p/p), em que o oxigénio dissolvido esteve sempre acima de 70 %, não sendo limitativa para o metabolismo da levedura. Destes estudos, ficou patente que o arejamento tem bastante influência na produção de biomassa e lípidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, sendo a produção deste metabolito limitada pela ausência ou baixos valores de oxigénio.

Adicionalmente, nos ensaios em STR de 2 L verificou-se que a alfarroba aparenta exercer um efeito de tampão no pH da cultura durante o crescimento e produção de lípidos, ou seja, o uso do extrato de resíduos alfarroba como substrato, poderá ser bastante vantajoso devido ao seu efeito de tamponamento da cultura, estabilizando o pH de forma que este não baixe demasiado, sendo este aspeto bastante benéfico para a acumulação de lípidos.

Em seguida, testou-se um novo modo de operação em *fed-batch*, mantendo as condições operacionais (1 % (v/v) n-dodecano e 0,75 vvm), de modo a incrementar a produção de lípidos, não limitando a cultura em carbono, uma vez que nos ensaios anteriores, os açúcares foram totalmente consumidos. Nestas condições, conseguiu-se produzir elevadas quantidades de biomassa, $25,23 \pm 0,68$ g/L, contudo a produção lipídica foi de $1,40 \pm 0,02$ g/L, com um rendimento lipídico de 30 % (p/p), ligeiramente inferior ao obtido em *batch*. Isto deveu-se ao facto de as condições de arejamento poderem não ser suficientes face à elevada densidade celular, o que foi possível comprovar pelos baixos valores de K_{La} e de taxas respiratórias específicas, em relação

ao ensaio em *batch*. Contudo, operação cultura a operar em *fed-batch* teve a vantagem de conseguir manter uma produção estável de lípidos, durante aproximadamente 120 h de crescimento, devido a existirem açúcares de alfarroba sempre disponíveis no meio, o que não aconteceu no ensaio em modo *batch*.

Analisando o perfil de ácidos gordos produzidos, verificou-se que o óleo microbiano produzido pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, usando a alfarroba como fonte de carbono, é maioritariamente constituído pelos ácidos gordos oleico, palmítico e esteárico. Este óleo apresenta uma composição muito semelhante à dos óleos vegetais mais usados para a produção de biodiesel de primeira geração. Para o biodiesel ser considerado de qualidade deve de respeitar os limites impostos pela Norma Europeia de Qualidade EN 1421, o que normalmente requer que os óleos usados sejam constituídos maioritariamente por ácidos gordos monoinsaturados. Tendo em conta que o óleo produzido pela *R. toruloides* CECT 1499 tem uma maior quantidade percentual de ácido oleico, pode-se sugerir que este óleo apresenta características adequadas para a produção de biodiesel.

Deste modo, é possível concluir que as estratégias desenvolvidas para produção de biomassa e acumulação de lípidos de origem microbiana, com recurso a resíduos agro-industriais de alfarroba, uma matéria-prima de baixo custo, foram realizadas com sucesso. A levedura *R. toruloides* CECT 1499 demonstrou potencial para produzir biomassa e também induzir a produção de lípidos quando utilizado o rácio C/N adequado, um elevado caudal de arejamento com a adição de n-dodecano como vetor de oxigénio e o modo de operação *fed-batch*. As melhores condições ensaiadas demonstraram que em reator biológico STR é possível chegar a $25,23 \pm 0,68$ g/L de biomassa e a um rendimento lipídico de 30 % (p/p), utilizando-se o rácio C/N de 330, em modo de operação *fed-batch*, com um caudal de arejamento de 0,75 vvm com a adição de 1 % (v/v) de n-dodecano e com uma agitação de 200 rpm, resultando num K_{La} de $66,5$ h⁻¹. Adicionalmente, a qualidade dos lípidos produzidos revelou-se ser adequada, reforçando o potencial que a levedura *R. toruloides* CECT 1499 tem para a produção sustentável de óleos microbianos usados na síntese de biodiesel de segunda geração, utilizando resíduos agro-industriais. Contudo haverá necessidade de aprofundar este estudo na perspetiva de uma maior produção de biomassa e de lípidos para se atingir valores compatíveis com uma unidade de biorrefinaria. Uma avaliação técnico-económica seria necessário ser realizada para perceção dos custos do processo industrial.

5 Perspetivas futuras

Atualmente, a produção de biodiesel de segunda geração a partir de microrganismos ainda não é uma realidade. Nesta fase ainda é necessário proceder-se a mais estudos de investigação no sentido de se otimizar e rentabilizar o processo, para se poder passar ao aumento de escala e análise económica do mesmo.

Com a realização deste trabalho foi possível fazer progressos nesta área, demonstrando-se que a produção de biodiesel de segunda geração pode ser ainda mais sustentável, com a bem sucedida utilização de resíduos agro-industriais de alfarroba como fonte de carbono, em vez de glucose. No entanto, para que este processo seja considerado sustentável, e para que possa competir com o uso de óleos vegetais, ainda é essencial aumentar o rendimento de produção de lípidos. Neste sentido, e de modo a aprofundar o trabalho desenvolvido, seria importante a realizar alguns ensaios experimentais complementares.

Numa fase inicial, poder-se-ia começar por otimizar o último ensaio em modo *fed-batch*. Tendo em conta os resultados obtidos, concluiu-se que neste ensaio a produção de lípidos pode ter sido limitada pela falta de oxigénio disponível devido à elevada densidade celular. Assim, uma forma de contornar esta limitação podia passar pelo aumento do caudal de arejamento da cultura.

Outra possível opção seria fazer um crescimento e induzir a acumulação lipídica em duas fases distintas, utilizando-se diferentes rácios C/N. Visto que nos ensaios em erlenmeyer com os rácios C/N com uma maior concentração inicial de ião amónio, obteve-se uma elevada concentração de biomassa, mas uma produção lipídica muito tardia, poder-se-ia crescer a levedura em reator biológico STR num meio com maior quantidade de ião amónio e após se atingir uma boa concentração de biomassa, passar-se-ia para um meio sem fonte de azoto, de modo a potenciar a produção lipídica.

Adicionalmente, seria importante qualificar e quantificar a possível produção de outros produtos de valor acrescentado, como por exemplo os carotenoides. Isto porque a levedura *R. toruloides* é conhecida por apresentar uma pigmentação cor-de-rosa intensa, devido aos carotenoides que produz, com o β -caroteno, toruleno, γ -caroteno e torularodina¹²⁶.

6 Bibliografia

1. Demirbas A. *Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines*. Springer (2008)
2. Ferreira S, Moreira NA, Monteiro E. *Bioenergy overview for Portugal*. Biomass and Bioenergy. 33, 1567-1576 (2009)
3. Pacini H, Assunção L, van Dam J, Toneto R. *The price for biofuels sustainability*. Energy Policy. 59, 898-903 (2013)
4. European Commission. Report from the commission to the european parliament and council - Progress towards achieving the Kyoto and EU 2020 objectives. (2013)
5. Diretiva 2009/28/CE. Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia. 2, 16-62 (2009)
6. Decreto-lei nº 117/2010 de 25 de Outubro. Diário da República, nº 207, 1ª Série
7. Decreto-lei nº 39/2013 de 18 de Março. Diário da República, nº 54, 1ª Série
8. Demirbas A. *Competitive liquid biofuels from biomass*. Appl Energy. 88(1), 17-28 (2011)
9. Leiva-Candia DE, Pinzi S, Redel-Macías MD, Koutinas A, Webb C, Dorado MP. *The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel*. Fuel. 123, 33-42 (2014)
10. Mohr A, Raman S. *Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels*. Energy Policy. 63(100), 114-122 (2013)
11. Gülşen E, Olivetti E, Freire F, Dias L, Kirchain R. *Impact of feedstock diversification on the cost-effectiveness of biodiesel*. Appl Energy. 126, 281-296 (2014)
12. Demain AL. *Biosolutions to the energy problem*. J Ind Microbiol Biotechnol. 36(3), 319-332 (2009)
13. Minteer SD. *Biochemical production of other bioalcohols: biomethanol, biopropanol, bioglycerol, and bioethylene glycol*. Woodh Publ Energ. 15, 258-265 (2011)
14. Shi S, Valle-Rodríguez JO, Siewers V, Nielsen J. *Prospects for microbial biodiesel production*. Biotechnol J. 6(3), 277-85 (2011)

15. Hu C, Zhao X, Zhao J, Wu S, Zhao ZK. *Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides*. *Bioresour Technol*. 100(20), 4843-7 (2009)
16. Direção Geral de Energia e Geologia. *Energia em Portugal*, 2013 (2015)
17. European Commision. *EU Energy in Figures, Statistical Pocketbook*. (2014)
18. Direção Geral de Energia e Geologia. *Renováveis - estatísticas rápidas*. (2015)
19. Decreto-Lei nº 62/2006 de 21 de Março. *Diário da República*, nº 57, 1ª Série
20. Avinash a., Subramaniam D, Murugesan a. *Bio-diesel - A global scenario*. *Renew Sustain Energy Rev*. 29, 517-527 (2014)
21. Geraldês Castanheira É, Grisoli R, Freire F, Pecora V, Coelho ST. *Environmental sustainability of biodiesel in Brazil*. *Energy Policy*. 65, 680-691 (2014)
22. Demirbas A. *Progress and recent trends in biodiesel fuels*. *Energy Convers Manag*. 50(1), 14-34 (2009)
23. <http://www.precoscombustiveis.dgeg.pt>, Consultado em Junho de 2015.
24. Publishing O. *Can Cars Come Clean ? Strategies for Low- Emission Vehicles*. 208 (2004)
25. Koutinas A a., Chatzifragkou A, Kopsahelis N, Papanikolaou S, Kookos IK. *Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production*. *Fuel*. 116, 566-577 (2014)
26. Freitas C, Parreira TM, Roseiro J, Reis A, da Silva TL. *Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast Rhodosporidium toruloides NCYC 921 using flow cytometry*. *Bioresour Technol*. 158, 355-9 (2014)
27. Li Q, Du W, Liu D. *Perspectives of microbial oils for biodiesel production*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 80(5), 749-56 (2008)
28. Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. *Biodiesel production from oleaginous microorganisms*. *Renew Energy*. 34(1), 1-5 (2009)
29. Li Y, Zhao Z (Kent), Bai F. *High-density cultivation of oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides Y4 in fed-batch culture*. *Enzyme Microb Technol*. 41(3), 312-317 (2007)
30. Liu B, Zhao ZK. *Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass*. *J Chem Technol Biotechnol*. 82, 775-780 (2007)
31. Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. *Oily yeasts as oleaginous cell factories*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90(4), 1219-27 (2011)

32. Beopoulos A, Nicaud J-M, Gaillardin C. *An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes*. Appl Microbiol Biotechnol. 90(4), 1193-206 (2011)
33. Beopoulos A, Haddouche R, Kabran P, Dulermo T, Chardot T, Nicaud J-M. *Identification and characterization of DGA2, an acyltransferase of the DGAT1 acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase family in the oleaginous yeast Yarrowia lipolytica. New insights into the storage lipid metabolism of oleaginous yeasts*. Appl Microbiol Biotechnol. 93(4), 1523-37 (2012)
34. Hui L, Wan C, Hai-Tao D, Xue-Jiao C, Qi-Fa Z, Yu-Hua Z. *Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of Aspergillus oryzae A-4 in solid-state fermentation*. Bioresour Technol. 101(19), 7556-7562 (2010)
35. Li Y, Zhao Z, Bai F. *High-density cultivation of oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides Y4 in fed-batch culture*. Enzyme Microb Technol. 41(3), 312-317 (2007)
36. Liu H, Zhao X, Wang F, Li Y, Jiang X, Ye M. *Comparative proteomic analysis of Rhodosporidium toruloides during lipid accumulation*. Yeast. 26, 553-566 (2009)
37. Shen H, Gong Z, Yang X, Jin G, Bai F, Zhao ZK. *Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides*. J Biotechnol. 168(1), 85-9 (2013)
38. Zhou W, Li Y, Zhang Y, Zhao Z. *Energy efficiency evaluation of lipid production by oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides*. J Therm Anal Calorim. 108(1), 119-126 (2011)
39. Zhu Z, Zhang S, Liu H, et al. *A multi-omic map of the lipid-producing yeast Rhodosporidium toruloides*. Nat Commun. 3, 1112 (2012)
40. Oloke JK. *Teleomorphism in Speciation*. Am-Euras. J. Sci. Res. 1(1), 68-72 (2006)
41. Cletus Kurtzman, J.W. Fell TB. *The Yeasts: A Taxonomic Study, Volume 1*. Elsevier. 1, 2354 (2011)
42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Consultado em Novembro de 2014.
43. Frisvad. *Chemical Fungal Taxonomy*. CRC Press. (1998)
44. <http://www.uv.es/cect> , Consultado em Novembro de 2014.
45. Frengova GI, Beshkova DM. *Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance*. J Ind Microbiol Biotechnol. 36(2), 163-80 (2009)
46. Politino M, Tonzi SM, Burnett W V, Romancik G, Usher JJ. *Purification and Characterization of a Cephalosporin Esterase from Rhodosporidium toruloides*. 63(12), 4807-4811 (1997)

47. Botes AL. *Affinity purification and characterization of a yeast epoxide hydrolase*. Biotechnology Letters. 21, 511-517 (1999)
48. Lima-Costa ME, Tavares C, Raposo S, Rodrigues B, Peinado JM. *Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by Saccharomyces cerevisiae in batch and fed-batch cultures*. J Ind Microbiol Biotechnol. 39(5), 789-97 (2012)
49. Ceratonia L, Batlle I. *Carob tree. Ceratonia siliqua L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (1997)
50. Bernardo-Gil MG, Roque R, Roseiro LB, Duarte LC, Gírio F, Esteves P. *Supercritical extraction of carob kibbles (Ceratonia siliqua L.)*. J Supercrit Fluids. 59, 36-42 (2011)
51. Dakia PA, Wathelet B, Paquot M. *Isolation and chemical evaluation of carob (Ceratonia siliqua L.) seed germ*. Food Chem. 102(4), 1368-1374 (2007)
52. Balat M. *Biodiesel Fuel from Triglycerides via Transesterification—A Review*. Energy Sources. 31(14), 1300-1314 (2009)
53. European Union. EN 14214 - Automotive fuels. Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines. Requirements and Test Methods. (2003)
54. Sorger D, Daum G. *Triacylglycerol biosynthesis in yeast*. Appl Microbiol Biotechnol. 61(4), 289-99 (2003)
55. Lukovi N, Kneževi Z, Bezbradica D. *Biodiesel Fuel Production by Enzymatic Transesterification of Oils : Recent Trends , Challenges and Future Perspectives*. (2009)
56. Mythili R, Venkatachalam P, Subramanian P, Uma D. *Production characterization and efficiency of biodiesel : a review*. Int. J. Energy Res. (2014)
57. Aarthy M, Saravanan P, Gowthaman MK, Rose C, Kamini NR. *Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview*. Chem Eng Res Des. 92(8), 1591-1601 (2014)
58. Bharathiraja B, Chakravarthy M, Kumar RR. *Biodiesel production using chemical and biological methods – A review of process, catalyst, acyl acceptor, source and process variables*. Renew Sustain Energy Rev. 38, 368-382 (2014)
59. Tai M, Stephanopoulos G. *Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast Yarrowia lipolytica for biofuel production*. Metab Eng. 15, 1-9 (2013)
60. Ratledge C. *Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production*. Biochimie. 86(11), 807-15 (2004)

61. Ratledge C. *Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms*. Biochem Soc Trans. 30(Pt 6), 1047-50 (2002)
62. Sorda G, Banse M, Kemfert C. *An overview of biofuel policies across the world*. Energy Policy. 38(11), 6977-6988 (2010)
63. Wakil SJ. *Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme*. Biochemistry. 28(11), 4523 (1989)
64. Raymond KW. *General Organic and Biological Chemistry*. Jonh Wiley Sons. 624 (2009)
65. Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarrea J-L, Molina-Jouve C, Nicaud J-M. *Yarrowia lipolytica as a model for bio-oil production*. Prog Lipid Res. 48(6), 375-87 (2009)
66. Yong-hong LI, Bo LIU, Zong-bao Z, Feng-wu BAI. *Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by Rhodosporidium toruloides*. 22(4) (2006)
67. Wu S, Zhao X, Shen H, Wang Q, Zhao ZK. *Microbial lipid production by Rhodosporidium toruloides under sulfate-limited conditions*. Bioresour Technol. 102(2), 1803-7 (2011)
68. Wiebe MG, Koivuranta K, Penttilä M, Ruohonen L. *Lipid production in batch and fed-batch cultures of Rhodosporidium toruloides from 5 and 6 carbon carbohydrates*. BMC Biotechnol. 12, 26 (2012)
69. Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT, Bourtoom T. *Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast Rhodotorula glutinis cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production*. Biotechnol Bioprocess Eng. 16(1), 23-33 (2011)
70. Liu L, Du G, Chen J, Wang M, Sun J. *Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of Streptococcus zooepidemicus*. Bioprocess Biosyst Eng. 32(6), 755-63 (2009)
71. Amaral PFF, Freire MG, Rocha-lea MHM, Marrucho IM. *Optimization of Oxygen Mass Transfer in a Multiphase Bioreactor With Perfluorodecalin as a Second Liquid Phase*. 99(3), 588-598 (2008)
72. Cascaval D, Galaction a.-I, Folescu E, Turnea M. *Comparative study on the effects of n-dodecane addition on oxygen transfer in stirred bioreactors for simulated, bacterial and yeasts broths*. Biochem Eng J. 31(1), 56-66 (2006)
73. Dan AGÆ, Corneliu CÆ. *Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors. Simulated fermentation broths*. Bioprocess Biosyst Eng. 26, 231-238 (2004)

74. Dragoi E-N, Curteanu S, Leon F, Galaction A-I, Cascaval D. *Modeling of oxygen mass transfer in the presence of oxygen-vectors using neural networks developed by differential evolution algorithm*. Eng Appl Artif Intell. 24(7), 1214-1226 (2011)
75. Zhao X, Hu C, Wu S, Shen H, Zhao ZK. *Lipid production by Rhodosporidium toruloides Y4 using different substrate feeding strategies*. J Ind Microbiol Biotechnol. 38(5), 627-32 (2011)
76. Yen H-W, Liu YX. *Application of airlift bioreactor for the cultivation of aerobic oleaginous yeast Rhodotorula glutinis with different aeration rates*. J Biosci Bioeng. 118(2), 195-8 (2014)
77. Xu J, Zhao X, Wang W, Du W, Liu D. *Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides and the individual effect of some impurities on lipid production*. Biochem Eng J. 65, 30-36 (2012)
78. Mukhopadhyay SN, Das DK. *Oxygen Responses, Reactivities, and Measurements in Biosystems*. CRC Press. (1994)
79. Flickinger MC. *Upstream Industrial Biotechnology*. John Wiley and Sons (2013)
80. Filippou D, Cheng TC-M, Demopoulos GP. *Gas-Liquid Oxygen Mass-transfer; from Fundamentals to Applications in Hydrometallurgical Systems*. Miner Process Extr Metall Rev. 20(1), 447-502 (2000)
81. A. P. Sinha, Parameswar DE. *Mass Transfer: Principles and Operations*. PHI Learning Pvt. (2012)
82. Michael J. Rolf, Henry C. Lim. *Computer Control of Fermentation Processes*. Enzyme and Microbial Technology. 4(6), 370–380 (1982)
83. Galaction A-I, Cascaval D, Oniscu C, Turnea M. *Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors. Simulated fermentation broths*. Bioprocess Biosyst Eng. 26(4), 231-8 (2004)
84. Dumont E, Andrès Y, Le Cloirec P. *Effect of organic solvents on oxygen mass transfer in multiphase systems: Application to bioreactors in environmental protection*. Biochem Eng J. 30(3), 245-252 (2006)
85. Xu F, Yuan Q-P, Zhu Y. *Improved production of lycopene and β -carotene by Blakeslea trispora with oxygen-vectors*. Process Biochem. 42(2), 289-293 (2007)
86. Lowe KC, Davey MR, Power JB. *Perfluorochemicals : their applications and benefits to cell culture*. 16, 272-277 (1998)

87. Manso T, Nunes C, Raposo S, Lima-Costa ME. *Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent P. agglomerans PBC-1*. J Ind Microbiol Biotechnol. 37(11), 1145-1155 (2010)
88. Shigeo K, Fumitake Y. *Biochemical Engineering, A Textbook for Engineers, Chemists and Biologists*. Wiley (2009)
89. Kimura K, Yamaoka M, Kamisaka Y. *Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence*. J Microbiol Methods. 56(3), 331-8 (2004)
90. Ebiura T, Echizen T, Ishikawa A, Murai K, Baba T. *Selective transesterification of triolein with methanol to methyl oleate and glycerol using alumina loaded with alkali metal salt as a solid-base catalyst*. Appl Catal A Gen. 283(1-2), 111-116 (2005)
91. Weatherburn MW. *Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia*. Anal Chem. 39(8), 971-974 (1967)
92. Folch J. *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J Biol Chem. 55(5), 999-1033 (1987)
93. Hein M, Isengard H. *Determination of underivatated fatty acids by HPLC*. Z Lebensm Unters Forsch A. 204, 420-424 (1997)
94. Zhou W, Wang W, Li Y, Zhang Y. *Lipid production by Rhodosporidium toruloides Y2 in bioethanol wastewater and evaluation of biomass energetic yield*. Bioresour Technol. 127, 435-40 (2013)
95. Jin G, Yang F, Hu C, Shen H, Zhao ZK. *Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides*. Bioresour Technol. 111, 378-82 (2012)
96. Zhou W, Li Y, Zhang Y, Zhao Z. *Energy efficiency evaluation of lipid production by oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides*. J Therm Anal Calorim. 108(1), 119-126 (2012)
97. Zhao X, Hu C, Wu S, Shen H, Zhao ZK. *Lipid production by Rhodosporidium toruloides Y4 using different substrate feeding strategies*. J Ind Microbiol Biotechnol. 38(5), 627-632 (2011)
98. Beopoulos A, Nicaud J-M, Gaillardin C. *An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes*. Appl Microbiol Biotechnol. 90(4), 1193-206 (2011)
99. Ayaz F a., Torun H, Glew RH. *Nutrient content of carob pod (Ceratonia siliqua L.) flour prepared commercially and domestically*. Plant Foods Hum Nutr. 64(4), 286-292 (2009)

100. Grúz J, Strnad M. *Anatolian Carob Pod (Ceratonia Siliqua L .): Sugars. J Food Qual.* 30, 1040-1055 (2007)
101. Friedman M, Jürgens HS. *Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. J Agric Food Chem.* 48(6), 2101-2110 (2000)
102. Mormeneo S, Sentandreu R. *Regulation of invertase synthesis by glucose in Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol.* 152(1), 14-18 (1982)
103. Li Y-H, Liu B, Zhao Z-B, Bai F-W. *Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by Rhodosporidium toruloides.* 22(4), 650-656 (2006)
104. Papanikolaou S, Aggelis G. *Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. Eur J Lipid Sci Technol.* 113(8), 1031-1051 (2011)
105. Yang X, Jin G, Gong Z, Shen H, Bai F, Zhao ZK. *Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides Y4 through the two-stage lipid production process. Biochem Eng J.* 91, 86-91 (2014)
106. Hr G, Sk G, Vj B. *Yeast as a Viable and Prolonged Feedstock for Biodiesel Production. International Journal Of Renewable Energy Research.* 3(1), 1-6. (2013)
107. Wild R, Patil S, Popović M, Zappi M, Dufreche S, Bajpai R. *Lipids from Lipomyces starkeyi. Food Technol Biotechnol.* 48(3), 329-335 (2010)
108. Guerreiro F. *Influência da transferência de massa de oxigênio na acumulação de lípidos pela levedura Rhodosporidium toruloides.* (2013)
109. Zhu LY, Zong MH, Wu H. *Efficient lipid production with Trichosporon fermentans and its use for biodiesel preparation. Bioresour Technol.* 99(16), 7881-7885 (2008)
110. Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I. *Yarrowia lipolytica as a potential producer of citric acid from raw glycerol. J Appl Microbiol.* 92(4), 737-744 (2002)
111. Arbor A. *Effect of Nitrogen Source on Lipid Accumulation in Oleaginous Yeasts. Journal of General Microbiology.* 130, 1693-1704 (1984)
112. Galaction A-I, Cascaval D, Turnea M, Folescu E. *Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors. Propionibacterium shermanii broths. Bioprocess Biosyst Eng.* 27(4), 263-71 (2005)
113. Lopes T, Reis A, Roseiro JC, Hewitt CJ. *Physiological effects of the addition of n -dodecane as an oxygen vector during steady-state Bacillus licheniformis thermophilic fermentations perturbed by a starvation period or a glucose pulse. Biochemical Engineering Journal.* 42, 208-216 (2008)

114. Yen HW, Liu YX. *Application of airlift bioreactor for the cultivation of aerobic oleaginous yeast Rhodotorula glutinis with different aeration rates.* J Biosci Bioeng. 118(2), 195-198 (2014)
115. Yen H-W, Zhang Z. *Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of Rhodotorula glutinis.* J Biosci Bioeng. 112(1), 71-4 (2011)
116. Xu J, Du W, Zhao X, Liu D. *Exploration of sodium lignosulphonate's effects on lipid production by Rhodosporidium toruloides.* Process Biochem. 50(3), 424-431 (2015)
117. Xu J, Zhao X, Wang W, Du W, Liu D. *Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides and the individual effect of some impurities on lipid production.* Biochem Eng J. 65, 30-36 (2012)
118. Ramos MJ, Fernández CM, Casas A, Rodríguez L, Pérez Á. *Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties.* Bioresour Technol. 100(1), 261-268 (2009)
119. Knothe G. *Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters.* Fuel Process Technol. 86(10), 1059-1070 (2005)
120. Alcantara R, Amores J, Canoira L, Fidalgo E, Franco MJ, Navarro a. *Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow.* Biomass and Bioenergy. 18(6), 515-527 (2000)
121. Demirbaş A. *Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: A survey.* Energy Convers Manag. 44(13), 2093-2109 (2003)
122. Ma F, Hanna M. *Biodiesel production: a review.* Bioresour Technol. 70(1), 1-15 (1999)
123. Nunes A. *Produção de biodiesel a partir da cultura de microalga Chlorella sp.* (2013)
124. <https://grace.com>, Consultado em Junho de 2015.
125. Aida T, Yamaguchi K. *Studies on the Utilization of Hydrocarbons by Yeasts Part IV.* J Agric Chem Soc Japan. 40(3), 119-126 (1966)
126. Freitas C, Nobre B, Gouveia L, Roseiro J, Reis A, Lopes Da Silva T. *New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during Rhodosporidium toruloides NCYC 921 batch growth.* Process Biochem. 49(4), 554-562 (2014)