



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS POR *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 A PARTIR
DE HIDROLISADO DE CASCAS DE SOJA**

KESLEI ROSENDO DA ROCHA

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert

RIO GRANDE - RS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS POR *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 A PARTIR
DE HIDROLISADO DE CASCAS DE SOJA**

KESLEI ROSENDO DA ROCHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert

RIO GRANDE-RS

2019

Ficha catalográfica

R672b Rocha, Keslei Rosendo da.

Biossíntese de lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 a partir de hidrolisado de cascas de soja / Keslei Rosendo da Rocha. – 2019.

132 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Rio Grande/RS, 2019.

Orientador: Dr. Carlos André Veiga Burkert.

1. Leveduras oleaginosas 2. Pentoses 3. Resíduos agroindustriais
I. Burkert, Carlos André Veiga II. Título.

CDU 664:54

APROVAÇÃO

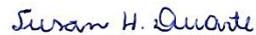
Dissertação defendida por Keslei Rosendo da Rocha e aprovada em 25 de fevereiro de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burken – FURG



Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto – FURG



Profa. Dra. Susan Hartwig Duarte – FURG



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva – UFPB

DEDICATÓRIA

A Deus, autor e consumidor de todas as coisas, e à minha família que sempre acredita em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo seu agir.

À minha mãe, Marta, e ao meu pai, Vanderli, por serem os melhores pais do mundo.
Ao meu irmão Kelison e à minha cunhada Joice, por serem tão incríveis em minha vida.
Em especial a meu primo Rony Fernandes e meu tio Paulo Paganini por acreditarem em mim e me suportarem financeiramente.

Ao professor Dr. Carlos André Veiga Burkert por seus ensinamentos, paciência e disponibilidade.

Aos professores do Programa pela grande competência e qualidade na arte de ensinar.
À família dos laboratórios de Bioprocessos e Sensorial: Renata Nunes, Renata Trindade, Joice Oliveira, Belkis Roesler, Bruno Ladeira, Carina Borba, Tábita Rodrigues, Carolina González (a Costa Riquenha mais brasileira de todas) e Guilherme Menegazzi.

À minha IC, Juliane Silveira, pela colaboração.

À Dr^a Joana Ores, pelo carisma e por me ajudar sempre sorrindo!

Ao MSc Jean Arias pelo apoio com a cromatografia líquida e análise de superfície; ao Dr. Diego Cabrera pelo apoio com a RMN ¹H; à professora Dr^a Eliana Furlong e à pós-doutoranda Anelise Ribeiro pelo auxílio com a cromatografia gasosa.

À equipe de limpeza, segurança e administrativa pelo apoio constante.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa.

À incrível, fantástica, formidável Universidade Federal do Rio Grande, pela estrutura física e educacional de extrema qualidade, por seu apoio aos estudantes e pela incansável luta por uma educação gratuita e de qualidade.

RESUMO

Lipídios são moléculas orgânicas que fazem parte da constituição dos seres vivos e da sua alimentação, sendo geralmente obtidos através de plantas oleaginosas como a soja, por exemplo, mas também de forma alternativa através do uso de micro-organismos como as leveduras, por exemplo. As leveduras são muito estudadas devido à sua rápida taxa de crescimento, possibilidade de ampliação da escala de produção, pouco espaço industrial requerido e não estarem sujeitas às intempéries climáticas. Como forma de minimizar os custos de produção de lipídios por leveduras, resíduos industriais podem ser utilizados nos cultivos por oferecerem uma fonte de carbono alternativa e também minerais essenciais ao crescimento. Desta forma, este trabalho teve como objetivo a produção de lipídios através do uso da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 em meio de cultivo composto por hidrolisado obtido a partir de cascas de soja. Após caracterização das cascas de soja utilizadas neste estudo, determinou-se que estas eram compostas majoritariamente por celulose (39,11 %), hemicelulose (27,22 %) e lignina (14,73 %). Dentre os metais analisados, aqueles com maior concentração foram alumínio ($502,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), zinco ($42,20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e manganês ($40,12 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Para determinar as melhores condições de hidrólise das cascas visando maior liberação de carboidratos fermentáveis, foram feitos testes avaliando a influência da granulometria das cascas (sem moer ou moídas com granulometria média $\leq 1 \text{ mm}$), pressão e temperatura na autoclave ($0,5 \text{ atm}$ e $111 \text{ }^\circ\text{C}$, $1,1 \text{ atm}$ e $122 \text{ }^\circ\text{C}$, $1,5 \text{ atm}$ e $127 \text{ }^\circ\text{C}$) e concentração de H_2SO_4 ($1,2 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ e $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) fixando-se a razão sólido-líquido em 1:8,8 e o tempo total de reação em 60 min. As melhores condições determinadas para a hidrólise foram: $1,1 \text{ atm}$, $122 \text{ }^\circ\text{C}$, H_2SO_4 $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ e cascas com granulometria $\leq 1 \text{ mm}$. Nestas condições foram produzidos $18,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares redutores. Nos testes preliminares usando o hidrolisado obtido a partir das melhores condições estudadas, foram produzidos $9,11 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por $5,30 \pm 0,68 \%$ de lipídios, alcançando assim $0,48 \pm 0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais após 240 h de cultivo. Foram feitos cultivos em um meio que simulou as concentrações dos carboidratos presentes no hidrolisado de cascas de soja, onde foram produzidos $6,93 \pm 0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por $11,49 \pm 0,17 \%$ de lipídios, alcançando assim $0,79 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais após 240 h de cultivo. Com o objetivo de maximizar a produção de lipídios totais, foram propostos planejamentos experimentais do tipo DCC 2³ onde a razão C/N, a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ e pH inicial foram os fatores estudados utilizando como fontes de carbono xilose, arabinose, glicose e o hidrolisado concentrado. Para este último, sob razão C/N 80, concentração $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH inicial 3,5 foram obtidos os melhores resultados: $7,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por $19,41 \%$ de lipídios, produzindo assim $1,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais após 240 h de cultivo. Estes valores representaram um aumento de 66 % em relação aos primeiros testes com o hidrolisado e 44 % em relação à mistura que simulou a concentração dos carboidratos no hidrolisado. Foram avaliadas ainda diferentes estratégias de cultivo buscando aumentar a produção de lipídios, sendo a batelada alimentada com hidrolisado ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e glicose ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ alimentada após 72 h de cultivo) a estratégia com melhores resultados, onde foram produzidos $11,92 \pm 0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por $29,28 \pm 0,13 \%$ de lipídios, alcançando assim $3,49 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais após 144 h de cultivo. Os lipídios produzidos nesta estratégia foram caracterizados por RMN ¹H e CG/MS, onde determinou-se majoritária composição por ácido oleico (66,92 %) e palmítico (24,62 %), dentre outros em menores frações. Esses resultados mostraram potencialidade no uso do hidrolisado de cascas de soja como fonte de carbono e nutrientes para a biossíntese de lipídios por *R. mucilaginosa* CCT 7688.

Palavras-chave: Leveduras oleaginosas; Pentoses; Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

Lipids are organic molecules that are part of the constitution of living things and their food, being generally obtained through oil plants such as soybeans, for example, but also through the use of microorganisms such as yeasts. These have been studied extensively because of their rapid growth rate, possibility of expansion of the production scale and not being subject to typical crop pests. As a way of minimizing the costs of producing yeast lipids industrial coproducts can be used in the process by offering an alternative source of carbon and also minerals essential for growth. Thus, this work had as objective the production of lipids through the use of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 in culture medium composed of hydrolysate obtained from soybean hulls. The soybean hulls used in this study were composed mainly of cellulose (39.11 %), hemicellulose (27.22 %) and lignin (14.73 %). Among the analyzed metals, the highest concentrations were aluminum (502.01 mg·kg⁻¹), zinc (42.20 mg·kg⁻¹) and manganese (40.12 mg·kg⁻¹). In order to determine the best hydrolysis conditions for the hulls aiming at a higher release of fermentable carbohydrates, tests were carried out evaluating the influence of hulls granulometry (without grinding or grinded with a mean particle size ≤ 1 mm), pressure and temperature inside the autoclave (0.5 atm e 111 °C, 1.1 atm e 122 °C, 1.5 atm e 127 °C) and de H₂SO₄ concentration (1,2 mmol·g⁻¹, 1,5 mmol·g⁻¹ and 1,8 mmol·g⁻¹). The solid-liquid ratio (1:8.8) and total reaction time (60 min) were fixed. The best determined conditions were: 1.1 atm, 122 °C, H₂SO₄ 1.8 mmol·g⁻¹ and hulls with particle size ≤ 1 mm. Under these conditions 18.10 g·L⁻¹ of total reducing sugars were produced. In the first tests using the hydrolysate obtained from the best studied conditions, 9.11 \pm 0.01 g·L⁻¹ of biomass were produced with 5.30 \pm 0.68 % of lipids content, reaching 0.48 \pm 0.06 g·L⁻¹ of total lipids after 240 h of cultivation. Cultures were carried out in a medium that simulated the carbohydrate concentrations present in the hydrolysate of soybean hulls (sugars mix), where 6.93 \pm 0.02 g·L⁻¹ of biomass were produced with 11.49 \pm 0.17 % of lipids content, reaching 0.79 \pm 0.01 g·L⁻¹ of total lipids after 240 h of cultivation. In order to maximize the production of total lipids experimental designs (CCD 2³) were proposed, where the C/N ratio, MgSO₄ · 7 H₂O concentration and initial pH were the factors studied using as carbon sources xylose, arabinose, glucose and the concentrated hydrolysate. For the latter, C/N 80, MgSO₄ · 7 H₂O 1.5 g·L⁻¹ and initial pH 3.5 were the conditions that guaranteed best results: 7.26 g·L⁻¹ of biomass with 19.41 % of lipid content and 1.41 g·L⁻¹ of total lipids after 240 h of cultivation, which represented an increase of 66 % in relation to the first tests with the hydrolysate and 44 % in relation to the mix that simulated the concentration of the carbohydrates in the hydrolysate. Different cultivation strategies were also evaluated in order to increase lipid production. The “hydrolysate (20 g·L⁻¹) and addition of glucose (10 g·L⁻¹) after 72 h” fed-batch strategy was the one with better results: 11.92 \pm 0.02 g·L⁻¹ of biomass composed by 29.28 \pm 0.13 % of lipids, reaching 3.49 \pm 0.01 g·L⁻¹ of total lipids after 144 h of cultivation. The lipids produced in this strategy were characterized by ¹H NMR and GC/MS, where the composition of oleic acid (66.92 %) and palmitic acid (24.62 %) was determined, among others, in smaller fractions. These results showed the potential when soybean hulls hydrolysate was used as a source of carbon and nutrients for lipid biosynthesis by *R. mucilaginosa* CCT 7688.

Keywords: Oleaginous yeasts; Pentoses; Agroindustrial byproducts.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre o perfil de ácidos graxos de fontes tradicionais e leveduras oleaginosas	29
Tabela 2 – Níveis e variáveis utilizadas no DCC para a maximização da biossíntese de biomassa e lipídios utilizando diferentes carboidratos como fonte de carbono.	55
Tabela 3 - Caracterização das cascas de soja	63
Tabela 4 - AR produzidos sob as respectivas condições de hidrólise	65
Tabela 5 – Interpretação do cromatograma do produto da hidrólise ácida das cascas de soja moídas realizada sob as condições de 1,1 atm, 122 °C e H ₂ SO ₄ 1,8 mmol·g ⁻¹	67
Tabela 6 - Parâmetros de crescimento e produção lipídica para as diferentes fontes de carbono utilizadas.....	70
Tabela 7 - Parâmetros de crescimento e produção lipídica para o cultivo utilizando o HCS concentrado como fonte de carbono, assim como para o meio sintético.	73
Tabela 8 - DCC 2 ³ (valores reais e codificados) para maximização da produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais utilizando glicose como principal fonte de carbono	76
Tabela 9 - Efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais obtidos no cultivo com glicose como principal fonte de carbono.....	77
Tabela 10 - Análise de variância para o DCC 2 ³ do cultivo utilizando glicose como principal fonte de carbono.	78
Tabela 11 - DCC 2 ³ (valores reais e codificados) para maximização da produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais utilizando xilose como principal fonte de carbono.....	81
Tabela 12 - Efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais obtidos no cultivo com xilose como principal fonte de carbono.	82
Tabela 13 - Análise de variância para o DCC 2 ³ do cultivo utilizando xilose como principal fonte de carbono.	83
Tabela 14 - DCC 2 ³ (valores reais e codificados) para maximização da produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais utilizando arabinose como principal fonte de carbono	87
Tabela 15 - Efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais obtidos no cultivo com arabinose como principal fonte de carbono.	88
Tabela 16 - Análise de variância para o DCC 2 ³ do cultivo utilizando arabinose como principal fonte de carbono	89

Tabela 17 – Comparação dos resultados dos planejamentos experimentais para os fatores razão C/N (X_1), concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (X_2) e pH inicial (X_3) estudados com diferentes carboidratos	93
Tabela 18 - DCC 2^3 (valores reais e codificados) para maximização da produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais utilizando HCS concentrado como principal fonte de carbono. 95	95
Tabela 19 - Efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais obtidos no cultivo com HCS concentrado como principal fonte de carbono.....	96
Tabela 20 – Análise de variância para o DCC 2^3 do cultivo utilizando HCS concentrado como principal fonte de carbono.....	98
Tabela 21 – Triplicata onde foram reproduzidas as condições do ensaio de melhor resultado no planejamento para o HCS concentrado como principal fonte de carbono.	101
Tabela 22 – Estratégias de cultivo e respectivos resultados para a produção de lipídios a partir do HCS.....	103
Tabela 23 - Parâmetros de crescimento e produção lipídica para o cultivo utilizando a estratégia BA 4.....	105
Tabela 24 – Atribuição dos sinais de RMN 1H aos hidrogênios correspondentes.....	108
Tabela 25 – Perfil de ácidos graxos dos lipídios produzidos por <i>R. mucilaginosa</i> CCT 7688 para a estratégia BA 4 comparado a outros perfis presentes na literatura	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura lignocelulósica das cascas de soja e do processo de hidrólise para quebra dos polímeros visando liberação de carboidratos fermentáveis.....	33
Figura 2 – Representação das fases durante o cultivo com leveduras visando acumulação de lipídios	36
Figura 3 – Metabolismo intermediário relacionado à síntese lipídica a partir da utilização de carboidratos como substratos.....	40
Figura 4 - Esquema experimental de hidrólise em diferentes condições	51
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 3000 vezes realizada nas cascas de soja moídas antes (a) e após (b) a hidrólise ácida.....	66
Figura 6 - Cromatograma para o produto da hidrólise ácida das cascas de soja moídas realizada sob as condições de 1,1 atm, 122 °C e H ₂ SO ₄ 1,8 mmol·g ⁻¹	67
Figura 7 – Cinética de acompanhamento da concentração de biomassa (a) e do pH (b) nos cultivos com <i>R. mucilaginosa</i> CCT 7688 no meio de cultivo proposto por Evans e Ratledge (1983) utilizando (■) glicose, (▣) arabinose e (■) xilose como fontes de carbono.	68
Figura 8 - Acompanhamento de pH, biomassa, lipídios totais (a) e concentração dos carboidratos (b) ao longo de 240 h de cultivo usando a mistura de carboidratos.....	69
Figura 9 – Cinética de acompanhamento da concentração de biomassa para o HCS concentrado (■) e mistura de carboidratos (●), assim como do pH para o HCS concentrado (□) e mistura de carboidratos (○) nos cultivos com <i>R. mucilaginosa</i> CCT 7688 no meio de cultivo proposto por Evans e Ratledge (1983).	72
Figura 10 – Curvas de contorno para biomassa produzida a partir da glicose em função da razão C/N e da concentração de MgSO ₄ · 7 H ₂ O (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e do pH inicial e da concentração de MgSO ₄ · 7 H ₂ O (c).	79
Figura 11 - Curvas de contorno para o teor lipídico obtido a partir da glicose em função da razão C/N e da concentração de MgSO ₄ · 7 H ₂ O (a), da razão C/N e do pH inicial (b).	80
Figura 12 – Curvas de contorno para biomassa produzida a partir da xilose em função da razão C/N e da concentração de MgSO ₄ · 7 H ₂ O (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e do pH inicial e da concentração de MgSO ₄ · 7 H ₂ O (c).	84
Figura 13 – Curvas de contorno para o teor lipídico obtido a partir da xilose em função da razão C/N e do pH inicial (a) e da concentração de MgSO ₄ · 7 H ₂ O e do pH inicial (b).....	85

Figura 14 – Curvas de contorno para os lipídios totais obtidos a partir da xilose em função da razão C/N e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ e do pH inicial (c).....	86
Figura 15 – Curvas de contorno para biomassa produzida a partir da arabinose em função da razão C/N e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ e do pH inicial (c).....	90
Figura 16 – Curvas de contorno para o teor lipídico obtido a partir da arabinose em função da razão C/N e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (a), da razão C/N e pH inicial (b) e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ e do pH inicial (c).....	91
Figura 17 – Curvas de contorno para os lipídios totais obtidos a partir da arabinose em função da razão C/N e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ e do pH inicial (c).....	92
Figura 18 – Curvas de contorno para biomassa produzida a partir do HCS concentrado em função da razão C/N e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ e do pH inicial (c).	99
Figura 19 – Curvas de contorno para o teor lipídico obtido a partir do HCS concentrado em função da razão C/N e pH inicial (a) e da razão C/N e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (b).	100
Figura 20 - Curvas de contorno para lipídios totais obtidos a partir do HCS concentrado em função da razão C/N e da concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (a) e da razão C/N e do pH inicial (b).....	101
Figura 21 – Acompanhamento de pH, biomassa, lipídios totais e concentração dos açúcares redutores ao longo de 144 h de cultivo para a estratégia BA 4.....	104
Figura 22 – Espectro de RMN 1H com ampliações dos picos de 0,88 a 0,92 ppm, 1,28 a 1,33 ppm, 1,63 a 2,37 ppm, 4,17 a 4,34 ppm e 5,37 ppm, obtido do extrato lipídico da estratégia com maior produção de lipídios totais por <i>R. mucilaginosa</i> CCT 7688.....	107
Figura 23 – Molécula de triacilglicerol composta pelos ácidos graxos palmítico (ligado ao carbono 1 $^\circ$), oleico (ligado ao carbono 2 $^\circ$) e linoleico (ligado ao carbono 3 $^\circ$), com marcações numéricas para identificação dos hidrogênios.	109
Figura 24 – Cromatograma para identificação dos ácidos graxos que compõem os lipídios produzidos por <i>R. mucilaginosa</i> CCT 7688 na estratégia de cultivo BA 4.	109

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 LIPÍDIOS MICROBIANOS	27
3.1.2 Lipídios a partir de leveduras	28
3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	29
3.2.1 Hidrólise de materiais lignocelulósicos	31
3.2.2 Cascas de soja	32
3.3 MEIO DE CULTIVO	34
3.3.1 Magnésio	35
3.3.2 pH inicial	35
3.3.3 Razão C/N	36
3.4 ESTRATÉGIAS DE CULTIVO	38
3.5 METABOLISMO DAS LEVEDURAS NO PROCESSO DE ACUMULAÇÃO LIPÍDICA	39
3.5.1 Metabolismo na presença de misturas de hexoses e pentoses	41
3.6 POSSÍVEIS APLICAÇÕES DOS LIPÍDIOS PRODUZIDOS ATRAVÉS DAS LEVEDURAS	42
3.6.1 Biodiesel	42
3.6.2 Alimentação	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 CASCAS DE SOJA	45
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CASCAS DE SOJA	45
4.2.1 Ligninas insolúvel e solúvel, cinzas, celulose e hemicelulose	46
4.2.2 Umidade, lipídios e proteína bruta	48
4.2.3 Metais	49
4.3 TESTES DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ÁCIDA DAS CASCAS DE SOJA	50
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO DE CASCAS DE SOJA (HCS)	51
4.5 MICRO-ORGANISMO	52
4.6 PRÉ CULTIVO	52
4.6.1 Reativação, pré-inóculo e inóculo	52

4.7 CULTIVOS PRELIMINARES EM FRASCOS AGITADOS	53
4.7.1 Arabinose, glicose e xilose como principais fontes de carbono	53
4.7.2 HCS como fonte de carbono	53
4.7.3 Mistura Xilose:Arabinose:Glicose:Celobiose como fonte de carbono	54
4.8 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS	55
4.8.1 Principais carboidratos presentes no HCS	55
4.8.2 HCS	56
4.9 ESTRATÉGIAS PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS.....	56
4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DOS CULTIVOS	58
4.10.1 Biomassa e pH	58
4.10.2 Consumo dos carboidratos	58
4.10.3 Lipídios	59
4.11 CÁLCULO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR.....	59
4.12 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	61
4.12.1 Análise por RMN ¹H	61
4.12.2 Derivatização e Análise em CG/MS	61
4.13 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CASCAS DE SOJA	63
5.2 ESTUDO DAS CONDIÇÕES PARA HIDRÓLISE ÁCIDA DAS CASCAS DE SOJA	65
5.3 CULTIVOS PRELIMINARES EM FRASCOS AGITADOS.....	68
5.3.1 Arabinose, glicose, xilose e mistura de carboidratos como fontes de carbono .	68
5.3.2 HCS como fonte de carbono	72
5.4 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS	74
5.4.1 Glicose	75
5.4.2 Xilose	80
5.4.3 Arabinose	86
5.4.4 Comparação de resultados	93
5.4.5 HCS concentrado	95
5.4.5.1 Validação	101
5.5 TESTES DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS	102
5.6 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	106
5.6.1 RMN ¹H	106
5.6.2 CG/MS	109

6 CONCLUSÕES	111
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	113
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
APÊNDICE 1	126
APÊNDICE 2	127
APÊNDICE 3	128
APÊNDICE 4	129
APÊNDICE 5	130
APÊNDICE 6	131
APÊNDICE 7	132

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca mundialmente como produtor de soja, sendo o segundo maior produtor do grão com uma produção estimada em aproximadamente 114 milhões de toneladas por ano (EMBRAPA, 2018). Para cada tonelada de soja colhida obtém-se aproximadamente 50 kg de cascas após o processamento, o que representa aproximadamente 5 % da massa inicial (BLASI et al., 2000). As cascas de soja constituem um resíduo agroindustrial de grande relevância quando considerada a quantidade total de soja colhida no mundo todo, pois após o processamento dos grãos são geradas aproximadamente 17 milhões de toneladas desse resíduo (EMBRAPA, 2018).

As cascas dos grãos de soja têm sido utilizadas principalmente como forma de alimento para os bovinos, tanto produtores de carne como de leite, por serem fontes de fibras e energia com baixo custo (MOTA, 2011). Mas existem outras possibilidades sendo estudadas visando o uso dessa grande quantidade de cascas, como na adsorção de metais pesados (FURLAN, 2017) ou na produção biotecnológica de bioetanol e xilitol (CASSALES, 2010), por exemplo.

As leveduras são fungos encontrados em vários lugares como solo, ar e vegetação. Para seu metabolismo as leveduras necessitam de uma fonte de carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, além de alguns metais que garantam o crescimento das células (LEHNINGER, 2014). Pode-se variar a fonte de carbono como forma de avaliar o comportamento de diferentes tipos de leveduras frente a estas fontes, visando à obtenção de bioprodutos de interesse comercial. Vários estudos têm sido realizados utilizando com sucesso diferentes matérias-primas na produção de lipídios por leveduras, como glicerol bruto (DUARTE, 2013; SPIER, 2014; AZAMBUJA, 2016), soro de queijo (CASTANHA, 2012), manipueira (SILVA et al., 2018) e hidrolisado obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar (ARISTIZÁBAL, 2013; XAVIER, 2016), por exemplo. Isso demonstra que o uso de resíduos industriais como as cascas de soja como matéria-prima para produção de materiais de valor agregado a partir de cultura microbiana não é um caso isolado.

Segundo Ageitos et al. (2011), leveduras capazes de produzir lipídios são chamadas de oleaginosas se acumularem no mínimo 20 % de lipídios na sua biomassa seca. Os ácidos graxos produzidos pelas leveduras têm se mostrado com características semelhantes às aquelas encontradas nos ácidos graxos obtidos de outras fontes naturais como a própria soja, por exemplo (ZHAO et al., 2008), o que possibilita a aplicação do lipídio microbiano na alimentação humana (ROSA, 2014). Outra finalidade, talvez a mais importante

economicamente na atualidade, é para a produção de biocombustíveis, em especial o biodiesel. Atualmente as matérias-primas para a produção deste biocombustível são majoritariamente os óleos vegetais e gorduras animais. Em geral, quanto menor for o custo na produção dos óleos ou gorduras, mais econômica se torna a produção do biodiesel, uma vez que o principal custo é com a matéria-prima (SPIER, 2014). Os lipídios produzidos por leveduras podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de biocombustíveis como o biodiesel, pois apresentam características físico-químicas semelhantes às encontradas nos óleos já tradicionalmente usados, além de serem produzidos sem sofrer problemas com sazonalidade, disponibilidade, dentro outros problemas típicos da agropecuária moderna (ZHAO et al., 2008).

As cascas de soja são constituídas basicamente por materiais lignocelulósicos, que são os materiais mais abundantes no mundo. Estes materiais são fontes de carboidratos que podem ser utilizados no cultivo de leveduras (AGUIAR, 2010). Como são compostos principalmente por alfacelulose, hemicelulose e lignina, os materiais lignocelulósicos são resistentes à bioconversão direta pelas leveduras e, portanto, precisam passar por um tratamento prévio: a hidrólise. Este tratamento visa quebrar as ligações poliméricas liberando os carboidratos. Cassales (2010) investigou a composição química das cascas de soja e observou uma ampla presença de glicose (39,7 %) e xilose (19,6 %). Ambos são carboidratos fontes de carbono que podem ser utilizados pelas leveduras visando a síntese lipídica.

Para a síntese de lipídios por leveduras, é essencial o estudo de parâmetros como a razão C/N, pH inicial e também os nutrientes que irão compor o meio de cultivo. Para a razão C/N, por exemplo, é comum que quando elevada se note maior tendência no acúmulo de lipídios na biomassa, principalmente em situações de limitação de nitrogênio (ROSSI et al., 2011; FABRICIO, 2018). Alguns metais, como o magnésio, por exemplo, podem desempenhar papel fundamental no acúmulo de lipídios, pois atuam na divisão celular e na atividade enzimática das leveduras (ESSLINGER, 2009; PEREIRA, 2018). Já o pH pode influenciar na produção lipídica a partir do fato de que cada levedura tem um intervalo de pH no qual apresenta melhor atividade (ENSHAEIEH et al., 2015).

Desta forma, o presente trabalho propõe o uso de um resíduo agroindustrial conhecido e abundante, as cascas de soja, no cultivo de *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7688 inovando ao propor o uso de um hidrolisado obtido a partir deste material lignocelulósico como fonte de carbono para esta levedura, visando à produção de lipídios.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir lipídios microbianos a partir da levedura *R. mucilaginosa* CCT 7688 cultivada em meio contendo cascas de soja hidrolisadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as cascas de soja;
- Estabelecer as melhores condições para hidrólise ácida das cascas de soja visando maior liberação de carboidratos, bem como determinar a composição do hidrolisado obtido;
- Determinar os efeitos da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH inicial e razão C/N na produção de biomassa e acúmulo de lipídios através de planejamento experimental com carboidratos em grau analítico (xilose, arabinose e glicose) e com hidrolisado de cascas de soja como fonte de carbono;
- Propor e avaliar estratégias de cultivo em batelada alimentada utilizando o hidrolisado de cascas de soja, visando maior obtenção de lipídios totais;
- Caracterizar em termos de ácidos graxos os lipídios produzidos na estratégia que resulte na maior produção de lipídios.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LIPÍDIOS MICROBIANOS

Lipídios são compostos orgânicos com baixíssima solubilidade em água, mas alta solubilidade em solventes orgânicos. Dependendo de como são constituídas as ligações da cadeia carbônica, podem ser classificados como óleos, caso haja duplas ligações (insaturações), ou gorduras, caso haja somente ligações simples (LEHNINGER, 2014). A maior fonte de obtenção de óleos são as plantas oleaginosas como soja, algodão e milho, por exemplo. Já a principal fonte de gorduras são animais como os suínos, por exemplo. No entanto, lipídios podem ser obtidos a partir de outras fontes, como é o caso dos lipídios microbianos.

Lipídios microbianos são assim denominados quando são produzidos por cultivo usando micro-organismos como algas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras (GARZÓN, 2009). Os lipídios produzidos por estes micro-organismos são principalmente triacilgliceróis compostos por ácidos graxos com cadeia de tamanho entre 14 a 20 carbonos (com predominância de 16 a 18 carbonos) (ZHAO et al., 2008). Os triacilgliceróis são lipídios formados pela ligação entre 3 moléculas de ácidos graxos com uma molécula de glicerol por meio da função orgânica éster, tipicamente encontrada em óleos e gorduras (LEHNINGER, 2014). O termo *single-cell oil* (SCO) foi adotado pela comunidade científica para identificar os triacilgliceróis produzidos através de micro-organismos, com o objetivo de diferenciá-los das formas mais complexas de lipídios como os fosfolipídios e os glicolipídios, por exemplo (GARZÓN, 2009).

Para manutenção da própria vida os micro-organismos produzem lipídios, mas apenas alguns desses micro-organismos são capazes de acumular um valor acima de 20 % de sua própria biomassa seca em lipídios. Aqueles que assim o fazem são classificados como oleaginosos (AGEITOS et al., 2011). Dentre os micro-organismos oleaginosos mais estudados estão as bactérias, fungos (incluindo as leveduras) e microalgas. Paul et al. (2019) estudaram um processo combinando o tratamento de água pela redução do carbono orgânico total através do uso da bactéria *Rhodococcus opacus* PD630, produzindo simultaneamente lipídios. Após 16 h de retenção de efluente de uma indústria petroquímica na presença de *R. opacus*, reduziu-se 99 % do carbono orgânico total inicialmente presente, além da produção de 86 % de lipídios (m/m). Trivedi et al. (2019) cultivaram a microalga *Chlorella vulgaris*

NIOCCV em efluente de uma planta de processamento de peixes suplementado com meio F/2-Guillard (15 % v/v), e observaram a produção de $257,87 \pm 1,27 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de biomassa composta por 48 % de lipídios.

Dentre os micro-organismos oleaginosos, as leveduras vêm se destacando por serem relativamente fáceis de manipular, de estocar, de cultivar e geralmente por apresentarem alto teor de lipídios na biomassa produzida (ESSLINGER, 2009).

3.1.2 Lipídios a partir de leveduras

Quando comparadas com as espécies vegetais produtoras de grãos oleaginosos, as leveduras oleaginosas vêm se destacando por apresentarem vantagens sobre essas espécies, como o fato de não sofrerem influências climáticas, crescerem em uma larga variedade de substratos, não estarem sujeitas às pragas que acometem as lavouras, além do fato de possuírem alta taxa de crescimento (BELLOU et al., 2016). Enquanto a soja leva de 100 e 160 dias entre o plantio e colheita, as leveduras demandam bem menos tempo já que a produção lipídica acontece em biorreatores controlados (NUNES, 2016).

Dentre as diversas leveduras existentes, aquelas consideradas oleaginosas são das espécies *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Yarrowia* (THEVENIEAU; NICAUD, 2013). Spier (2014), utilizando a levedura *R. mucilaginosa* CCT 7688 em um meio composto por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): (30) glicerol, (5) KH_2PO_4 , (1) Na_2HPO_4 , (3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, (1,2) de extrato de levedura, pH inicial igual a 4,5 e sob as condições de 25 °C e 180 rpm, obteve um conteúdo lipídico de 59,96 % e lipídios totais produzidos iguais a $5,51 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Já Teixeira (2013), usando a levedura *Yarrowia Lipolytica* UFLA 9.4 em meio composto por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): (30) glicerol, (7) KH_2PO_4 , (2,5) Na_2HPO_4 , (1,5) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, (0,15) $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, (0,02) $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, (0,06) $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, (0,5) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (0,5) de extrato de levedura, pH inicial igual a 6,0 e sob as condições de 30 °C e 150 rpm, obteve 63,4 % de conteúdo lipídico.

Os SCO produzidos a partir das leveduras atendem aos interesses comerciais pela semelhança de seu perfil de ácidos graxos quando comparados às fontes já tradicionais de produção de lipídios como a soja e o algodão, por exemplo. Na Tabela 1, adaptada de Garzón (2009), estão apresentadas comparações entre o perfil de ácidos graxos de plantas e leveduras oleaginosas.

Tabela 1 - Comparação entre o perfil de ácidos graxos de fontes tradicionais e leveduras oleaginosas

	Composição (%)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Oleaginosas						
Palma	44	-	5	39	11	-
Algodão	27	-	2	18	51	-
Soja	11	-	4	22	53	8
Leveduras						
<i>Lipomyces starkeyi</i>	34	6	5	51	3	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ¹	21	2	9	54	11	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	12	1	3	73	12	-

¹ Dados de Zhao et al. (2010).

A partir da Tabela 1 é possível notar as semelhanças entre os perfis dos ácidos graxos que compõem os lipídios das fontes tradicionais e daqueles produzidos a partir das leveduras. Essas semelhanças possibilitam o uso dos SCO tanto na indústria alimentícia como na de combustíveis, por exemplo. Mas a viabilidade da produção dos SCO se detém nos altos custos com a matéria-prima, que chega a ser responsável por aproximadamente 80 % do custo total de todo o meio de cultivo (TSIGIE et al., 2011). Desta forma, fontes alternativas precisam ser estudadas com o objetivo de reduzir esse custo.

3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Uma das alternativas mais promissoras para diminuir os custos de produção de lipídios microbianos tem sido o uso de materiais considerados como coprodutos, subprodutos ou mesmo resíduos industriais. O glicerol, por exemplo, é um resíduo industrial que representa até 10 % de todo o biodiesel gerado. Com essa grande quantidade ociosa de glicerol gerada, pesquisas usando-o como fonte de carbono no cultivo de micro-organismos visando à obtenção de lipídios têm se intensificado dos últimos anos (DUARTE, 2013; SPIER, 2014; PEREIRA, 2018). Resíduos agroindustriais como o bagaço da cana-de-açúcar (ARISTIZÁBAL, 2013; XAVIER, 2016), manipueira (SILVA et al., 2018) e cascas de soja (CASSALES, 2010) também vêm sendo estudados para obtenção de lipídios microbianos, graças ao fato de serem materiais lignocelulósicos de grande disponibilidade no agronegócio brasileiro.

Os materiais lignocelulósicos são assim chamados por serem formados por celulose, hemicelulose, lignina e uma pequena porção de outros componentes com porcentagens de cada um variando conforme a espécie do material de origem e das condições de crescimento (RABELO, 2007). A casca de soja, por exemplo, é composta por cerca de 29,7 % de celulose, 25,5 % de hemicelulose e 9,1 % de lignina total, o que representa mais de 64 % de sua composição (CASSALES, 2010). Já o bagaço de cana-de-açúcar e as cascas de arroz são compostos por cerca de 25 a 40 % de celulose, 20 a 35 % de hemicelulose e 15 a 35 % de lignina total, podendo estes alcançar mais de 90 % da composição total (MENEZES; BARRETO, 2015).

A celulose é considerada a fonte mais abundante em carbono, chegando a 40 % de todo o carbono disponível nas plantas (RABELO, 2007). É também considerada um polímero que ocorre de forma natural, com fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, tendo a celobiose como unidade repetitiva, garantindo assim uma estrutura rígida e de elevada massa molar. Ao realizar-se a hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores e oligossacarídeos, que pela continuação da hidrólise se quebram formando majoritariamente glicose (HEINZE et al., 2018).

A hemicelulose, quando comparada com a celulose, é um polímero menor e mais heterogêneo, pois possui ramificações mais diversificadas contendo carboidratos como arabinose, glicose e xilose. Estes carboidratos são classificados como pentoses (cinco carbonos) ou hexoses (seis carbonos), que são unidos por ligações glicosídicas responsáveis pelas características fracas e hidrofílicas da hemicelulose, sendo a ponte de ligação entre a celulose e a lignina (HEINZE et al., 2018).

A lignina, por sua vez, é considerada a segunda macromolécula mais abundante, perdendo apenas para a celulose. A lignina é uma macromolécula de formato tridimensional e basicamente amorfa, formada por unidades de fenilpropano que envolvem a parede celular, funcionando como uma “cola” que é responsável por proteger contra micro-organismos e ainda garantir resistência mecânica ao material lignocelulósico (HEINZE et al., 2018). Ao mesmo tempo que essas características são muito importantes para as plantas, são também as características que dificultam o processo de bioconversão para uma ampla gama de micro-organismos incapazes de assimilar celulose, hemicelulose e lignina diretamente, como as leveduras, por exemplo.

Fungos basidiomicetos são capazes de usar cascas de arroz e bagaço de cana-de-açúcar sem nenhum tipo de tratamento prévio como substrato, assim como outros tipos de materiais lignocelulósicos. Isso ocorre devido à existência de enzimas lignocelulolíticas que convertem

os polímeros lignocelulósicos em moléculas menores, que posteriormente são assimiladas e utilizadas como nutrientes (MENEZES; BARRETO, 2015). Ao contrário desses fungos, a maioria dos micro-organismos, incluindo as leveduras, são incapazes de assimilar celulose, hemicelulose e lignina, amplamente presentes nos materiais lignocelulósicos. Isso ocorre pela ausência das enzimas lignocelulolíticas nesses micro-organismos. Desta forma, é necessário um pré-tratamento de quebra dos polímeros presentes nos materiais lignocelulósicos como forma de liberar os carboidratos que compõem essas ligações. Um dos processos estudados para realizar a quebra desses polímeros é a hidrólise (CHRISTOFOLETTI, 2010).

3.2.1 Hidrólise de materiais lignocelulósicos

A hidrólise pode quimicamente ser definida como uma reação que ocorre obrigatoriamente em meio aquoso onde a água é decomposta em íons $H^+_{(aq)}$ e $OH^-_{(aq)}$, sendo o cátion e ânion transferidos para produtos diferentes (HIJAZIN et al., 2010). A hidrólise se apresenta como uma das maneiras mais eficientes de se quebrar os polímeros da celulose e hemicelulose, além de separá-los do revestimento da lignina. Dois processos de hidrólise são mais comuns: a ácida e a enzimática.

Na hidrólise ácida há a formação do complexo hidrônio ($H_3O^+_{(aq)}$) com a reação de ionização do ácido em água, sendo o ácido sulfúrico o ácido inorgânico mais utilizado para esse fim, podendo atuar de forma concentrada ou mesmo diluída. Na hidrólise ácida o ácido atua como catalisador, acelerando o processo de quebra da água ao diminuir a energia necessária para se iniciar a reação (energia de ativação). Christofolletti (2010) afirma que atuar com o ácido diluído pode oferecer vantagens reacionais, principalmente ao se levar em conta a economia com o reagente.

A hidrólise enzimática, por sua vez, possui as enzimas como catalisadoras da quebra dos polímeros dos materiais lignocelulósicos. As enzimas são substâncias orgânicas com atividade intra ou extracelular com funções catalisadoras, o que explica seu papel na hidrólise de materiais poliméricos (HIJAZIN et al., 2010). Uma das principais vantagens desta hidrólise frente à ácida é que as condições operacionais da hidrólise enzimática são brandas, enquanto que na ácida as condições podem ser consideradas extremas e, conseqüentemente, de maior custo, além de apresentar os problemas típicos de corrosão (RABELO, 2007).

Geralmente, a hemicelulose tende a ser hidrolisada mais facilmente que a celulose, fazendo com que os carboidratos liberados pela hemicelulose fiquem expostos às condições

reacionais por um tempo maior do que os carboidratos que serão posteriormente liberados pela celulose. Esse excesso de exposição às condições de hidrólise pode degradar os carboidratos liberados, fato este que torna fundamental o estudo do tempo total de hidrólise (CHRISTOFOLETTI, 2010). Corredor et al. (2008) avaliaram a hidrólise ácida e enzimática para liberação de carboidratos a partir das cascas de soja. Quando as cascas foram submetidas à hidrólise ácida com HCl 1 % sob vapor a 140 °C por 30 min, foram produzidos 10,65 mg de pentoses por mL de hidrolisado. Já para a hidrólise ácida usando H₂SO₄ 2 % sob vapor a 140 °C por 30 min, foram produzidos 13,79 mg de pentoses por mL de hidrolisado. Para a hidrólise enzimática usando celulase 15 FPU por g de celulose (FPU = *filter paper unit* – unidade para medida de atividade enzimática) combinada com β-glicosidade 50 CBU por g de celulose (CBU = *cellobiase unit* – mol de celobiose convertida em glicose) foram liberados apenas 12,3 % das hexoses esperadas. No entanto, após combinar o pré-tratamento com H₂SO₄ 2 % sob vapor a 140 °C por 30 min com a hidrólise enzimática por mais 36 min, foram liberados 72,82 % das hexoses esperadas, chegando a uma produção de 29,45 mg de hexose para cada mL de hidrolisado, além de pentoses que levaram a uma liberação total de carboidratos na ordem de 79,1 %.

Como visto, se faz necessária uma avaliação completa de todos os fatores do processo para definição de qual é o modelo de hidrólise mais favorável, além da possibilidade de combinações entre os tipos e condições de hidrólise.

3.2.2 Cascas de soja

A produção brasileira de soja é estimada em aproximadamente 114 milhões de toneladas por ano (EMBRAPA, 2018). Para cada tonelada de soja colhida, obtém-se aproximadamente 50 kg de cascas, o que representa aproximadamente 5 % da massa inicial (BLASI et al., 2000). Se for considerada a soma de toda a produção mundial de soja e a porcentagem de cascas nela contida, são aproximadamente 17 milhões de toneladas de cascas de soja geradas anualmente, tornando-se assim uma abundante fonte de materiais lignocelulósicos disponíveis para uso.

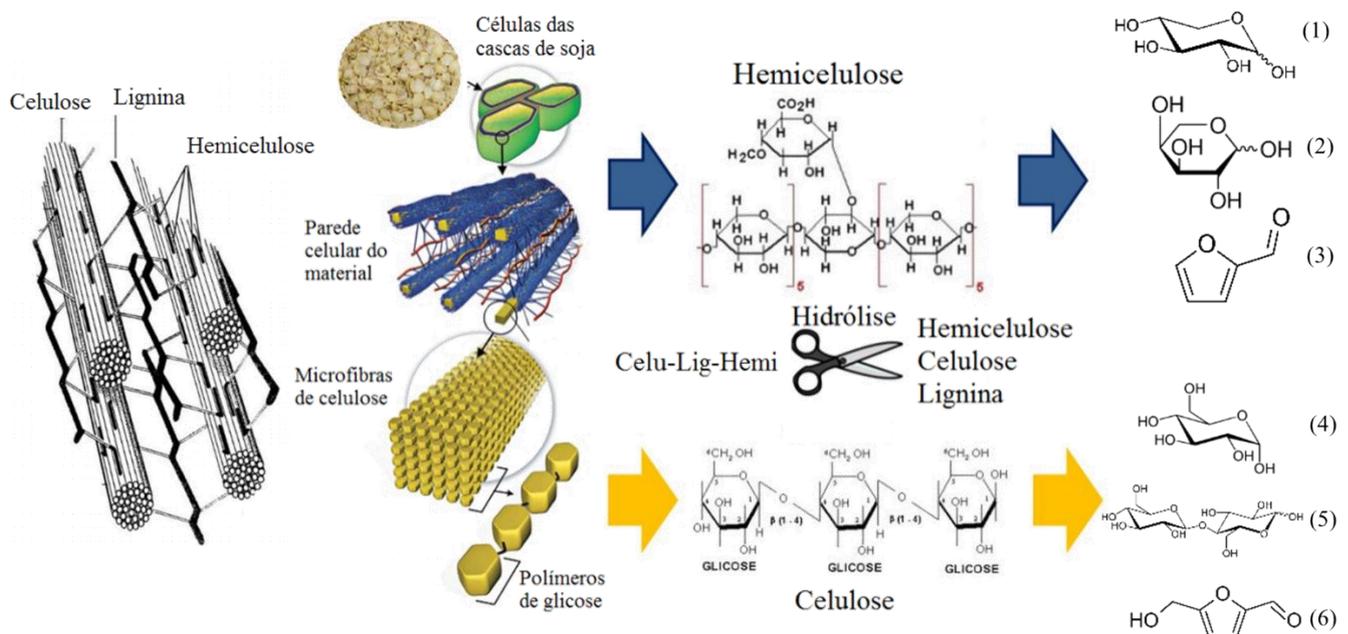
Mielenz et al. (2009) determinaram a composição da casca de soja como: 29 a 51 % celulose, 10 a 20 % hemicelulose e 2 a 8 % lignina, além de outros compostos em menores quantidades. Tais valores foram próximos daqueles determinados por Cassales (2010) também para casca de soja: celulose 39,7 %, hemicelulose 25,5 % e lignina total 9,1 %. Esses

elevados valores de celulose e hemicelulose são indícios de uma possível elevada liberação de carboidratos assimiláveis após o processo de hidrólise.

No processo de hidrólise ácida das cascas de soja (Figura 1), assim como outros materiais lignocelulósicos, além da liberação dos carboidratos de interesse para uso como fonte de carbono nos cultivos microbianos, há também uma preocupação com a formação dos chamados inibidores, que são substâncias com capacidade de diminuir ou até impossibilitar o desenvolvimento de micro-organismos. Dois compostos orgânicos considerados inibidores se destacam como subprodutos da hidrólise de materiais lignocelulósicos: o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). O primeiro é formado a partir da degradação das pentoses e o segundo a partir da desidratação das hexoses (FURLAN, 2009; CHRISTOFOLETTI, 2010).

Na Figura 1, adaptada de Sannigrahi et al. (2010), está representada a estrutura típica dos materiais lignocelulósicos, além do esquema representativo da função da hidrólise durante o processo de quebra da estrutura celulose-lignina-hemicelulose e posterior quebra dos polímeros constituintes da hemicelulose e celulose, resultando na liberação dos principais carboidratos fermentáveis (1, 2, 4 e 5) e dos produtos de degradação (3 e 6).

Figura 1 – Representação da estrutura lignocelulósica das cascas de soja e do processo de hidrólise para quebra dos polímeros visando liberação de carboidratos fermentáveis



Legenda: (1) xilose; (2) arabinose; (3) furfural; (4) glicose; (5) celobiose e (6) hidroximetilfurfural.

O maior desafio na utilização das cascas de soja se baseia na realização da hidrólise de forma a serem obtidos carboidratos fermentáveis por micro-organismos, mas ao mesmo

tempo com a menor liberação possível de inibidores, como o furfural e o 5-HMF. Estudos devem ser elaborados visando à determinação da condição ótima da hidrólise das cascas em busca de viabilizar seu uso como meio de cultivo para a indústria biotecnológica. Além do uso do hidrolisado como fonte de carbono, outros componentes do meio podem influenciar na obtenção do produto final desejado dependendo da estratégia utilizada para cada micro-organismo específico.

3.3 MEIO DE CULTIVO

Um meio de cultivo muito usado como referência para o cultivo de leveduras visando o acúmulo de lipídios é apresentado por Evans e Ratledge (1983). Nesse meio foram utilizadas fontes de nitrogênio (NH_4Cl e extrato de levedura), diferentes fontes de carbono (glicose, xilose, sacarose e lactose), sais minerais (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , FeCl_3 e ZnSO_4) e vitaminas do complexo B (principalmente tiamina, riboflavina e niacina) provenientes do extrato de levedura (VANNUCCHI; CUNHA, 2009), alcançando consistentes quantidades de biomassa e conteúdo lipídico no cultivo da levedura *Candida curvata* D 107 (60 g de biomassa e 18,6 g de lipídios para cada 100 g de lactose utilizada). No entanto, cada levedura tem características metabólicas individuais, o que torna necessário o estudo individual de forma a determinar os melhores componentes de meio e condições de cultivo. Para *R. mucilaginosa* CCT 7688, por exemplo, partindo do mesmo meio de cultivo proposto por Evans e Ratledge (1983), Spier (2014), após otimização utilizando o glicerol residual como fonte de carbono, determinou que as fontes de sais minerais CaCl_2 , FeCl_3 e ZnSO_4 não foram significativas para a acumulação lipídica, tendo obtido na melhor condição teor de lipídios de 59,96 % e lipídios totais produzidos de $5,51 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Meios de cultivo constituídos de hidrolisado de materiais lignocelulósicos são denominados meios complexos, exatamente devido à complexidade de se determinar a influência de cada componente e de suas interações sobre o comportamento das leveduras. Zhao et al. (2010) cultivaram *R. mucilaginosa* TJY15A utilizando meio de cultivo composto por: 0,7 % KH_2PO_4 ; 0,25 % Na_2HPO_4 ; 0,15 % $\text{MgSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0,015 % CaCl_2 ; 0,015 % $\text{FeCl}_3\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0,002 % $\text{ZnSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,33 % extrato de levedura; 2,0 % de hidrolisado de inulina, ou frutose, ou glicose, ou ainda uma mistura glicose (1 %) e frutose (1 %); pH 6,0. O hidrolisado continha inicialmente 1,46 g de açúcares redutores (AR) para cada 100 g de material hidrolisado. Todos os cultivos duraram 72 h. Mesmo sendo o meio complexo, o hidrolisado se mostrou aquele com maior acúmulo lipídico (48 %) quando

comparado aos meios de cultivo com todos os componentes conhecidos, como a frutose (38 %) glicose (36 %) e a mistura glicose-frutose (36 %). O porquê do melhor resultado ser atingido para o meio complexo é de difícil explicação graças aos vários componentes desconhecidos liberados no processo de hidrólise, assim como justificam os próprios pesquisadores.

A multiplicação celular das leveduras é influenciada pelos vários componentes presentes no meio de cultivo, mas também pelas condições as quais as células estão submetidas, como pH, temperatura e agitação/aeração, por exemplo.

3.3.1 Magnésio

Pereira (2018) cultivando *R. mucilaginosa* CCT 7688 em diferentes meios baseados no caldo YM com modificações, observou que o acréscimo da concentração de Mg^{2+} favoreceu a acumulação de lipídios. Spier (2014), após otimização do meio proposto por Evans e Ratledge (1983) usando glicerol residual como fonte de carbono, observou que ao incrementar a concentração de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ de $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ houve aumento de 10,94 % no teor de lipídios. Esslinger (2009) afirma que o magnésio é absolutamente essencial para o crescimento das leveduras, atuando no crescimento, divisão celular e atividades enzimáticas do micro-organismo (atua como um cofator essencial para mais de 300 enzimas), além de influenciar diretamente no desempenho das leveduras, sendo primariamente responsável pelo declínio da atividade fermentativa quando ausente, pois células deficientes em magnésio tendem a não completar a divisão celular. Além disso, também atua como protetor contra estresse, tal como aquele causado pela elevação da temperatura.

3.3.2 pH inicial

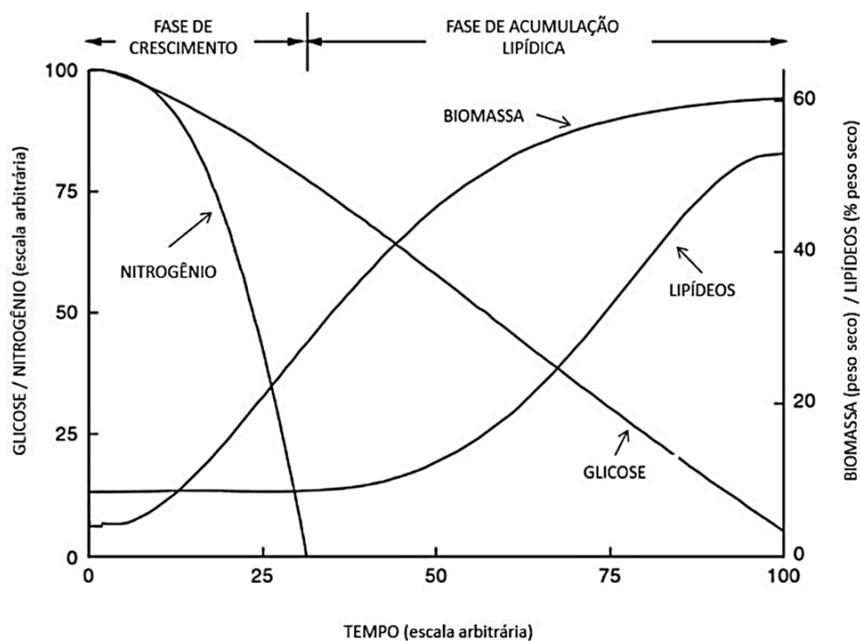
Células microbianas respondem de formas diferentes às alterações externas dos parâmetros do cultivo como o pH inicial, por exemplo. A diferença entre o pH do inóculo a qual a célula já está adaptada e o pH do meio de cultivo a qual as células serão transferidas, pode causar *stress*. Esse por sua vez pode causar alterações na expressão de genes e afetar diretamente o metabolismo celular, inviabilizando células assim como possibilitando a produção de metabólitos primários e secundários (RODRIGUES, 2015).

Após testarem através de planejamento experimental a influência de alguns fatores no crescimento da *R. mucilaginosa* (cepa sem identificação), dentre eles o pH inicial, Enshaeieh et al. (2015) determinaram que a variação de pH em um intervalo de 5,0 a 6,5 foi capaz de influenciar em até 16 % a produção de lipídios, sendo o pH inicial 6,5 aquele de melhor resultado quando comparado ao pH inicial 5,0.

3.3.3 Razão C/N

Os componentes do meio de cultivo exercem papel fundamental na acumulação de lipídios. Uma estratégia comumente utilizada na acumulação lipídica por leveduras é a limitação da fonte de nitrogênio e o excesso da fonte de carbono, onde este excesso será convertido em armazenamento de triacilgliceróis (ROSSI et al., 2011). Sitepu et al. (2014) testaram 37 espécies de leveduras oleaginosas e concluíram que 35 delas produziram um maior teor lipídico quando cultivadas em meios com deficiência de nitrogênio em um meio de cultivo variando o teor de nitrogênio até praticamente seu esgotamento. Na Figura 2 estão resumidas as principais etapas pelas quais as leveduras oleaginosas passam ao longo do cultivo.

Figura 2 – Representação das fases durante o cultivo com leveduras visando acumulação de lipídios



Fonte: Fabricio (2018)

Com a quantidade de nitrogênio limitada, o micro-organismo se multiplica usando todo nitrogênio disponível, esgotando-o rapidamente. Por isso, dentre os componentes do meio de cultura, o nitrogênio é o primeiro a se esgotar. Sem este componente a fonte de carbono, como a glicose, por exemplo, continua sendo assimilada, mas agora dando início à fase de acumulação lipídica (Figura 2), onde o carbono é assimilado e convertido em lipídios intracelulares (FABRICIO, 2018). É ainda fundamental compreender que para haver interesse comercial não basta apenas um alto acúmulo de lipídios, é ainda necessário que haja uma satisfatória produção de biomassa, afinal é nela que os lipídios são acumulados.

Caso a mesma condição de limitação de nitrogênio seja aplicada para um micro-organismo não-oleaginoso, após a multiplicação celular esgotar todo o nitrogênio a assimilação de carbono pode cessar dependendo do micro-organismo, assim como pode continuar. Mas, em vez de acumulação de lipídios, o micro-organismo converterá o carbono apenas em biomassa (RATLEDGE, 2004).

A relação entre a quantidade de carbono e quantidade de nitrogênio no meio é denominada razão C/N. Esse cálculo é importante no controle da disponibilidade de nitrogênio no meio para garantir a multiplicação das células, além de garantir ainda a presença elevada de fonte de carbono para a fase de acumulação lipídica. Outros fatores importantes para o crescimento das leveduras são a presença de vitaminas e sais minerais no meio de cultivo, assim como parâmetros ambientais como temperatura, agitação e pH (SANTOS, 2009).

A disponibilidade de carbono e nitrogênio pode ser alterada em um processo conhecido como modulação metabólica, ou seja, um processo que varia a amplitude da relação entre carbono e nitrogênio, direcionando assim o fluxo de carbono através das vias de biossíntese nas células das leveduras (RAU, 2015). Quando a *R. mucilaginosa*, por exemplo, é cultivada em um meio amplamente composto por carbono e nitrogênio, a fonte de carbono é assimilada distribuindo-se de forma equilibrada na produção de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, sendo que essa assimilação somente é limitada pelo sistema de transporte dos substratos para o interior das células. Para essa condição o acúmulo lipídico é baixo e as células das leveduras são classificadas como “*slim yeast*” (levedura magra, em tradução literal). Já quando há uma modulação onde existe carbono em quantidade abundante e nitrogênio limitado, o que eleva a razão C/N, há baixa produção de proteínas e ácidos nucleicos, permitindo assim uma elevada produção de lipídios graças à redução na

multiplicação celular. As células produzidas a partir dessa condição são classificadas como “*obese yeast*” (levedura obesa, em tradução literal), conforme Rau (2015).

Compreender o complexo metabolismo das leveduras possibilita a adequada escolha dos componentes e suas proporções na composição do meio de cultivo, além das condições operacionais que juntas garantirão as melhores respostas para a obtenção dos produtos de interesse.

3.4 ESTRATÉGIAS DE CULTIVO

Além da importância dos componentes do meio de cultivo e das condições de operação, a forma como cada um desses fatores se apresenta também é de suma importância na produção de lipídios. Dentre esses fatores está o tempo e a frequência de alimentação dos nutrientes e/ou fonte de carbono. Duas estratégias de alimentação são frequentemente estudadas: a batelada simples e a batelada alimentada.

Na batelada simples, no início do cultivo a principal fonte de carbono e os demais nutrientes do meio em solução aquosa são adicionados conjuntamente. Após inoculação, os cultivos são acompanhados até que não haja mais produção de biomassa, caracterizando assim o fim do cultivo. Ou seja, nesse modo de operação a alimentação das fontes de carbono, demais nutrientes e inóculo são adicionados uma única vez (PEREIRA, 2018). Uma das principais vantagens da batelada como estratégia de cultivo está no fato de possuir menor risco de contaminação, uma vez que o cultivo ocorre sem interferências externas. Mas essa estratégia tem como principal desvantagem a baixa produtividade devido a fatores inibitórios, como excesso de substrato, por exemplo (VIEIRA, 2016).

Na batelada alimentada, após a inoculação tanto nutrientes como fonte de carbono podem ser adicionados ao longo do cultivo, evitando assim os problemas inibitórios. Uma das principais desvantagens dessa estratégia está no controle do crescimento da levedura, causada pela oscilação da concentração de nutrientes, dificultando assim a compreensão do processo (VIEIRA, 2016).

Pereira (2018) cultivando com *R. mucilaginosa* CCT 7688 sob a estratégia batelada alimentada (366,2 g·L⁻¹ glicerol, 50,0 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 10,0 g·L⁻¹ Na₂HPO₄, 30,0 g·L⁻¹ MgSO₄ · 7 H₂O, 12 g·L⁻¹ extrato de levedura, pH inicial 4,5 e temperatura de 25 °C, mais alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 48 h, 10 mL em 72 h, 10 mL em 96 h) obteve 17,38 g·L⁻¹ de biomassa com 42 % de teor lipídico, produzindo assim 7,30 g·L⁻¹ de lipídios totais. Sob a estratégia batelada simples (366,2 g·L⁻¹ glicerol, 50,0 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 10,0 g·L⁻¹

Na_2HPO_4 , $30,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ extrato de levedura, pH inicial 4,5 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$) foram produzidos biomassa, conteúdo lipídico e lipídios totais iguais a $8,16 \pm 0,36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $42,9 \pm 0,8 \%$ e $3,50 \pm 0,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Desta forma, a batelada alimentada possibilitou um aumento de 112 % na biomassa e 108 % nos lipídios totais quando comparado com a batelada simples, evidenciando assim a influência que as estratégias de cultivo exercem nos resultados.

3.5 METABOLISMO DAS LEVEDURAS NO PROCESSO DE ACUMULAÇÃO LIPÍDICA

Enquanto a fermentação da glicose (hexose) pode ser realizada por praticamente todas as leveduras sem nenhuma dificuldade, o mesmo não ocorre para a xilose e arabinose (pentoses), por exemplo. No entanto, após a hidrólise dos materiais lignocelulósicos há uma ampla liberação de pentoses, tornando necessário identificar as leveduras, as condições de meio e operação para assimilação dessas pentoses de modo a viabilizar o processo que visa o aproveitamento de resíduos agroindustriais.

O início do acúmulo de lipídios nas leveduras se dá a partir da exaustão do nitrogênio do meio de cultivo rico em fonte de carbono, que passa a ser transformado em SCO pelas células da levedura. Para que isso ocorra uma série de reações de beta oxidação transformam acetil-CoA produzida pelos metabólitos intermediários em ácidos graxos. Dentro das células da levedura esses ácidos se ligam ao glicerol produzindo majoritariamente os triacilgliceróis (SCO), embora também haja a produção de fosfolipídios e esfingolipídios em menor quantidade (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

Evans e Ratledge (1985) acreditam que a necessidade de esgotar a fonte de nitrogênio para dar início à acumulação de lipídios por parte das leveduras se dá quando a enzima adenosina monofosfato (AMP) deaminase, que é a responsável por converter a AMP em monofosfato de inosina (IMP) + NH_4 , é ativada pelo esgotamento da fonte de nitrogênio atuando de forma seletiva no uso da fonte de carbono disponível para a síntese de lipídios.

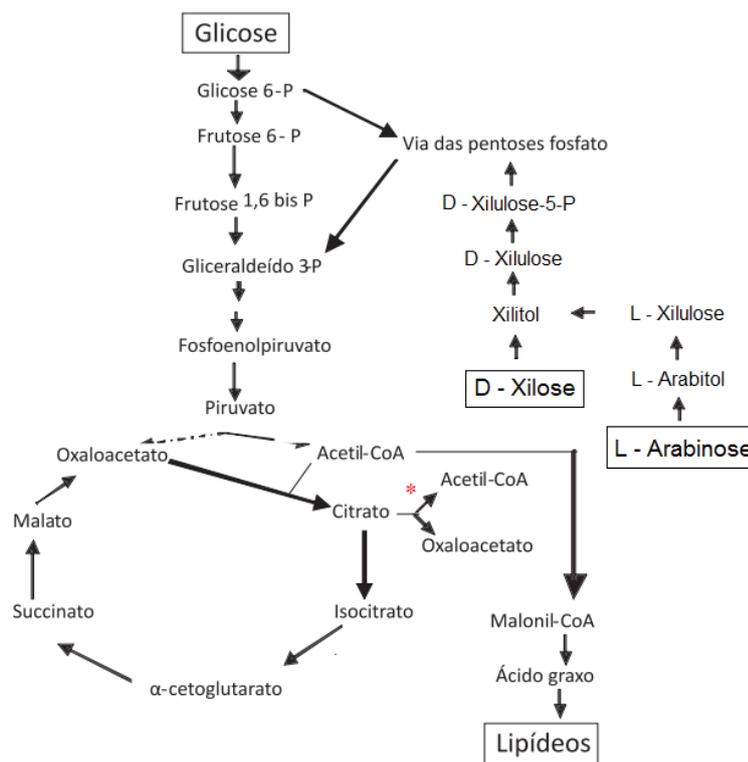
A chave para o acúmulo lipídico não está apenas no esgotamento da fonte de nitrogênio, mas também na elucidação do metabólito intermediário que é capaz de produzir acetil-CoA, uma vez que estudos demonstram que a capacidade de uma levedura em acumular lipídios está ligada à sua capacidade de produzir elevadas quantidades de acetil-CoA (RATLEDGE, 2004).

Existe uma proximidade entre a estequiometria de produção de acetil-CoA quando utilizada glicose ou xilose como fontes de carbono. Para cada 100 g de glicose utilizada são produzidos 1,1 mol de acetil-CoA, enquanto que para cada 100 g de xilose utilizada como fonte de carbono são produzidos 1,0 mol de acetil-CoA (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

Uma vez produzida, a molécula de acetil-CoA participa no processo de síntese dos lipídios intracelulares. Primeiramente, a molécula acetil-CoA é convertida em malonil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC). Por sua vez a molécula de malonil-CoA se transforma em acil-CoA que é utilizado na síntese de diacilglicerol, que posteriormente é transformado em triacilglicerol (SCO) através da via de alfa acetilação do glicerol fosfato (RATLEDGE, 2004).

Na Figura 3, adaptada de Fontes et al. (2008), está apresentado o metabolismo intermediário das leveduras para a assimilação de hexoses (como a glicose) e pentoses (como a xilose e arabinose) no processo de produção de lipídios.

Figura 3 – Metabolismo intermediário relacionado à síntese lipídica a partir da utilização de carboidratos como substratos



* realizado por enzimas citrato liase, presentes apenas nas leveduras consideradas oleaginosas.

As vias metabólicas para a síntese lipídica dependem do tipo de carboidrato utilizado. A glicose, por exemplo, segue a tradicional via glicolítica até a formação do piruvato, enquanto que as pentoses seguem um caminho alternativo: a via das pentoses fosfato. Para as leveduras oleaginosas, a presença das enzimas citrato liase possibilitam que o acetil-CoA seja utilizado para a síntese dos triacilgliceróis, conforme Figura 3.

3.5.1 Metabolismo na presença de misturas de hexoses e pentoses

Independente do carboidrato a ser assimilado, proteínas transportadoras são necessárias para levarem os carboidratos através da membrana celular para o interior das células onde serão assimilados, sendo este um dos fatores limitantes para a fermentação das pentoses. Existem dois importantes mecanismos de transporte do carboidrato para o interior das células. Um deles é realizado por um mecanismo de difusão facilitada, onde a diferença da concentração (gradiente) do carboidrato fora e dentro da célula é a única força direcionadora. O outro se trata de um simporte, que é um sistema de transporte ativo realizado pelo co-transporte H^+ -carboidrato. Esses simportes são considerados de alta afinidade, pois utilizam a força próton motriz (H^+) para transportar o carboidrato para dentro da célula, enquanto que o mecanismo de difusão facilitada é considerado de baixa afinidade por usar apenas a força direcionadora. A concentração dos carboidratos disponíveis no meio de cultivo são os fatores determinantes na regulação desses sistemas de transporte (MOURO, 2012).

Um dos maiores desafios para o aumento do consumo das pentoses e, conseqüente, aumento da produção de lipídios está na capacidade de transporte dos carboidratos para o interior das células, vencendo assim a membrana celular. O problema se encontra nas características individuais de cada levedura, onde algumas possuem permeases que facilitam o transporte majoritário de hexoses, enquanto que outras possuem permeases capazes de transportar tanto hexoses como pentoses. A xilose pode ser transportada pelos transportadores de hexoses de alta e média afinidade. Entretanto, na presença de misturas de hexoses e pentoses esses transportadores criam uma competição entre xilose e glicose, restringindo fortemente a assimilação da xilose, graças ao fato da afinidade desses transportadores pelas hexoses ser duas ordens de grandeza maior do que para a xilose (MOURO, 2012).

Bura et al. (2012), usando uma mistura $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose:xilose como fonte de carbono para o crescimento de *R. mucilaginosa* PTD3I, observaram que houve um padrão de preferência na assimilação dos açúcares pela levedura. Enquanto a glicose começou a ser

assimilada imediatamente, a xilose só começou a ser assimilada após 12 h de cultivo, indicando uma repressão causada pela afinidade pela glicose por parte dos permeadores da membrana celular. Após 96 h de cultivo usando a mistura foram produzidos $18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa.

3.6 POSSÍVEIS APLICAÇÕES DOS LIPÍDIOS PRODUZIDOS ATRAVÉS DAS LEVEDURAS

3.6.1 Biodiesel

Desde o início da revolução industrial a humanidade deu início à utilização dos combustíveis fósseis como forma de obtenção de energia. Com o passar das décadas e com o aumento da demanda por energia, o carvão e o petróleo se tornaram os combustíveis fósseis mais eficientes e atrativos às indústrias, dentre elas a automobilística. Henbest et al. (2018) produziram um relatório intitulado “nova perspectiva de energia” (em tradução literal), onde foi estimado que 2025 será o ano em que o petróleo entrará em declínio, tendo 2040 como a década do “fim do petróleo”. Ainda faltam muitas pesquisas para garantir que fontes renováveis de energia estejam prontas para substituir a dependência do petróleo em 2040.

Dentre as diversas formas de energias renováveis, os biocombustíveis têm se destacado nas pesquisas mundiais como possível substituição da dependência do petróleo. O biodiesel, por exemplo, se mostra um importante biocombustível que pode diminuir ou até mesmo substituir o uso do diesel do petróleo. Segundo a ANP (2018), em julho de 2018 o Brasil possuía 51 fábricas de biodiesel com capacidade total industrial de 8,1 bilhões de litros. No Brasil há o consumo anual de 55 bilhões de litros de diesel com apenas 10 % desse valor composto por biodiesel. Desta forma, atualmente as fábricas são capazes de atender a demanda de biodiesel, mas na medida em que o teor de biodiesel misturado ao diesel comum for gradativamente sendo aumentado, a capacidade produtiva das indústrias de biodiesel também deverá ser aumentada.

Atualmente a matéria-prima para a produção do biodiesel é composta por 75 % de óleo de soja, 20 % de gordura animal e aproximadamente 5 % de óleos residuais de fritura, além de pequenas frações de óleos de algodão, canola e palma (ANP, 2018). A mistura de biodiesel no diesel começou em 2008 com meros 2 % (B2), alcançando 10 % (B10) em 2018. Já existem estudos e testes com motores (LACERDA; BRITO, 2017; COSTA, 2017) buscando viabilizar o uso do biodiesel puro (B100) sem que sejam necessárias alterações

mecânicas naqueles motores que já funcionam com diesel destilado do petróleo, possibilitando a substituição completa do diesel comum pelo biodiesel, diminuindo assim a dependência do petróleo.

Uma das principais vantagens do biodiesel frente ao diesel oriundo do petróleo é possuir baixa toxicidade e baixa emissão de gases considerados poluentes, além de diminuir a emissão de CO₂, principal gás responsável pelo efeito estufa. É ainda considerado isento de gases com enxofre em sua composição (BENTO, 2017).

Os lipídios produzidos pelas leveduras podem ser uma alternativa para produção do biodiesel. Primeiramente, graças às semelhanças entre o perfil dos ácidos graxos dos lipídios produzidos pelas leveduras e o perfil dos ácidos graxos produzidos pelas plantas oleaginosas como a soja, por exemplo (Tabela 1). Em segundo lugar, graças ao potencial ecológico que o cultivo microbiano representa pelo potencial de usar coprodutos, subprodutos e resíduos industriais como substrato, garantindo assim sustentabilidade ao processo.

Wahlen et al. (2012) produziram lipídios através de alguns micro-organismos, dentre eles a levedura *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. A partir desses lipídios produziram biodiesel, que posteriormente foi testado em motores de injeção indireta. Enquanto o óleo diesel mostrou uma potência de arranque de 6,33 kW, o biodiesel produzido a partir dos lipídios da levedura mostrou uma potência de 5,89 kW, ou 93 % quando comparado ao óleo diesel. Quando comparado com o biodiesel produzido a partir da soja, com potência de arranque de 6,11 kW, o biodiesel produzido a partir dos lipídios da levedura alcançou 96 % de equivalência. Nos testes de emissões de poluentes, o biodiesel produzido a partir dos lipídios da levedura emitiu 0,048 % de CO (frente aos 0,109 % do óleo diesel) e 11,86 % de hidrocarbonetos (frente aos 28,96 % do óleo diesel), destacando assim sua vantagem para o meio ambiente. Esses dados evidenciam a potencialidade do uso dos lipídios microbianos para a produção de biodiesel, embora outros importantes parâmetros devam ser também avaliados, como o número de cetano e estabilidade oxidativa, por exemplo.

3.6.2 Alimentação

Outra possibilidade de aplicação dos lipídios obtidos a partir das leveduras é na alimentação tanto animal como humana. A levedura rica em lipídios pode ser, após inativação, usada como fonte de nutrientes na alimentação. Entretanto, somente as leveduras

certificadas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) podem ser utilizadas para esse fim (SPIER, 2014).

Dentre os diferentes ácidos graxos produzidos pelas leveduras, os monoinsaturados e os poli-insaturados são considerados como fundamentais para a alimentação humana, pois representam as “gorduras boas” da dieta alimentar. Atualmente, as fontes para esses ácidos graxos são os azeites de oliva, óleos de girassol, óleo de soja, abacate (fontes vegetais), carne suína, peixes (fontes animais), dentre outros (ROSA, 2014).

Tanto os ácidos graxos monoinsaturados quanto os poli-insaturados atuam na saúde humana, como na prevenção das doenças cardiovasculares, por exemplo. A ingestão de quantidades adequadas de ácidos graxos monoinsaturados aumenta os níveis do colesterol HDL (HDL = *High Density Lipoprotein* – lipoproteína de alta densidade), considerado o “bom colesterol”, ajudando também na redução do “colesterol ruim”, o LDL (LDL = *Low Density Lipoprotein* – lipoproteína de baixa densidade) (ROSA, 2014).

Algumas pesquisas vêm sendo conduzidas com o objetivo de utilizar a biomassa lipídica das leveduras como fonte de proteínas, sais minerais e ácidos graxos na alimentação animal. Grassi (2018) estudou os efeitos da alimentação de tilápias durante 76 dias com biomassa produzida a partir de alguns micro-organismos, dentre eles a levedura *Saccharomyces cerevisiae* SC 50. Para a produção da biomassa foram utilizados resíduos industriais. Foram utilizadas 3 diferentes concentrações de biomassa: 0 %, 0,25 % e 0,5 %. Foi observado um aumento no *status* antioxidante total sem interferência nos parâmetros bioquímicos, um aumento na deposição de carotenoides e também no teor proteico dos peixes, sem influenciar negativamente na saúde dos animais, o que evidencia o potencial do uso da biomassa microbiana para fins de alimentação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASCAS DE SOJA

As cascas de soja foram doadas pela empresa Bianchini®, localizada em Rio Grande - RS, em parceria com a empresa Baldo®, localizada em Encantado - RS.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CASCAS DE SOJA

Para determinação de ligninas insolúvel e solúvel, cinzas ácidas, carboidratos e produtos de degradação da hidrólise, além de celulose e hemicelulose, adaptou-se a metodologia descrita por Gouveia et al. (2009) e Rocha et al. (2012). Dois gramas (massa seca) de cascas moídas com granulometria ≤ 1 mm foram pesados e transferidos para um béquer de 100 mL. Foram adicionados 10 mL de solução H_2SO_4 72 % (v/v) sobre as cascas. Separadamente, tanto a solução ácida como o béquer com as cascas foram previamente ambientados no banho até atingirem equilíbrio térmico. O béquer com a mistura 'cascas + ácido' foi mantido em banho termostático (Quimis Q335D, Brasil) a 45 °C durante 7 min, com constante e vigorosa agitação da mistura utilizando-se um bastão de vidro. A reação foi interrompida com a adição de 275 mL de água destilada. A água foi adicionada ao béquer aos poucos, e todo o conteúdo resultante foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 mL. Este foi tampado com tampão de algodão hidrófobo e gaze recoberta por papel alumínio. O frasco foi então autoclavado a 121 °C por 30 min. Após a descompressão da autoclave (AV 30 – Phoenix, Brasil), o frasco Erlenmeyer foi deixado resfriar naturalmente. O conteúdo foi filtrado em papel de filtro qualitativo previamente tarado. O filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL. Completou-se o volume com água destilada.

Para determinação dos teores dos carboidratos e dos produtos de degradação da hidrólise das cascas de soja, necessários nas Equações 3, 4 e 5, uma alíquota da solução no balão de 500 mL foi analisada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Para tanto, foi utilizado um cromatógrafo (Thermo Scientific modelo Dionex Ultimate 3000, Estados Unidos), contendo módulo de bomba LGP 3400 SD, módulo de injetor WPS 3000 TSL, detector espectrofotométrico por conjunto de arranjo de diodos DAD 3000, detector de índice de refração RI 101 Shodex e coluna Aminex HPX 87H. Ácido sulfúrico foi utilizado como fase móvel, com concentração proporcional de 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, vazão de 0,60 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volume de injeção de 20 μL , temperatura do amostrador em 15 °C, temperatura da coluna a

50 °C e temperatura ambiente para o detector. O tempo total de injeção foi de 51 min. As amostras foram diluídas (1:2 – amostra:água destilada) e injetadas e analisadas em duplicata. Os dados foram captados e analisados no *software* Chromeleon 6.80 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

4.2.1 Ligninas insolúvel e solúvel, cinzas, celulose e hemicelulose

O material retido no papel de filtro (item 4.2) foi lavado com 1500 mL de água destilada visando à eliminação de sais dissolvidos. Após a lavagem, o conjunto ‘papel de filtro + retido’ foi seco em estufa (Quimis Q-316 MA, Brasil) a 105 °C até massa constante ($M_{\text{Lig.Ins.}}$). O filtrado obtido nessa etapa foi descartado. A Equação 1 (GOUVEIA et al., 2009) foi usada para o cálculo do teor de lignina insolúvel na fração sólida (% Lig_{insol.}).

$$\% \text{Lig}_{\text{insol.}} = \frac{M_{\text{Lig.Ins.}} - M_{\text{CA}}}{M_{\text{A}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

Lig_{Insol.}: lignina insolúvel na fração sólida (%); $M_{\text{Lig.Ins.}}$: massa de lignina insolúvel (g); M_{CA} : massa de cinzas insolúveis em meio ácido (g); M_{A} : massa da amostra (base seca – em g); 100: fator para conversão em porcentagem

As cinzas foram determinadas calcinando-se o conjunto ‘papel de filtro + retido’ em forno mufla (Quimis Q318M24, Brasil) seguindo a metodologia de Gouveia et al. (2009) até atingir massa constante (M_{CA}). A Equação 2 foi utilizada para determinar o teor de cinzas.

$$\% \text{Cinzas} = \frac{M_{\text{CA}}}{M_{\text{A}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

M_{CA} : massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio – em g); M_{A} : massa da amostra (base seca – em g); 100: fator para conversão em porcentagem

Da solução obtida no item 4.2, 5 mL foram pipetados e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 20 mL de água destilada e o pH foi elevado até 12 com o auxílio de NaOH 6,5 M. O volume do balão foi completado com água destilada. Com o auxílio de um espectrofotômetro (Biospectro SP 220, China), foi feita a leitura em 280 nm usando água destilada como branco. A Equação 3 (GOUVEIA et al., 2009) foi usada para o cálculo da concentração de lignina solúvel na fração líquida ($C_{Lig.}$).

$$C_{Lig.} = 4,187 \cdot 10^{-2} \times (A_s - A_{PD}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (3)$$

Onde:

$C_{Lig.}$: concentração de lignina solúvel ($g \cdot L^{-1}$)

$4,187 \cdot 10^{-2}$: coeficiente angular

$3,279 \cdot 10^{-4}$: coeficiente linear

A_s : absorção a 280 nm da solução de lignina junto com os produtos da degradação

A_{PD} : $c_1 \cdot \varepsilon_1 + c_2 \cdot \varepsilon_2$

Com: c_1 = concentração do furfural ($g \cdot L^{-1}$) obtida na CLAE;

c_2 = concentração do hidroximetilfurfural ($g \cdot L^{-1}$) obtida na CLAE;

ε_1 = absorvidade do furfural a 280 nm = $146,85 L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ e

ε_2 = absorvidade do hidroximetilfurfural a 280 nm = $114 L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ (determinados experimentalmente).

Para determinação dos teores de celulose e hemicelulose nas cascas de soja desse estudo, foram utilizadas as Equações 4 e 5 propostas por Rocha et al. (2012). Nestas equações os fatores de perda para a hidrólise foram determinados por Irick et al. (1988) e os fatores de conversão foram determinados por Kaar et al. (1991).

$$\% \text{ Celulose} = \frac{(M_G \times FP_G \times FC_G) + (M_C \times FP_C \times FC_C) + (M_{HMF} \times FP_{HMF} \times FC_{HMF})}{M_A} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \frac{(M_x \times FP_x \times FC_x) + (M_{AR} \times FP_{AR} \times FC_{AR}) + (M_F \times FP_F \times FC_F) + (M_{AC} \times FP_{AC} \times FC_{AC})}{M_A} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

M_G : massa de glicose (g); FP_G : fator de perda da glicose para a hidrólise = 1,055; FC_G : fator de conversão da celulose em glicose = 0,9; M_C : massa de celobiose (g); FP_C : fator de perda da celobiose para a hidrólise = 1,150 ; FC_C : fator de conversão da celulose em celobiose = 0,95; M_{HMF} : massa de hidroximetilfurfural (g); FP_{HMF} : fator de perda do hidroximetilfurfural para a hidrólise = 1,010; FC_{HMF} : fator de conversão da celulose em hidroximetilfurfural = 1,29; M_X : massa de xilose (g); FP_X : fator de perda da xilose para a hidrólise = 1,155; FC_X : fator de conversão da hemicelulose em xilose = 0,88; M_{AR} : massa de arabinose (g); FP_{AR} : fator de perda da arabinose para a hidrólise = 1,090; FC_{AR} : fator de conversão da hemicelulose em arabinose = 0,88; M_F : massa de furfural (g); FP_F : fator de perda do furfural para a hidrólise = 1,050; FC_F : fator de conversão da hemicelulose em furfural = 1,37; M_{AC} : massa de ácido acético (g); FP_{AC} : fator de perda do ácido acético para a hidrólise = 1,020; FC_{AC} : fator de conversão da hemicelulose em ácido acético = 0,72; M_A : massa da amostra (base seca – em g); 100: fator para conversão em porcentagem.

4.2.2 Umidade, lipídios e proteína bruta

A determinação da umidade foi realizada conforme o procedimento padrão de secagem em estufa AOAC 925.45b, que consistiu em aquecimento da amostra a 105 ± 3 °C por 24 h (AOAC, 1995). A relação matemática definida para o cálculo do teor de umidade está apresentada na Equação 6. O experimento foi realizado em triplicata.

$$\% \text{ de umidade (U)} = \frac{M-m}{M-t} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

M: massa inicial (massa do recipiente + massa úmida das cascas – em g);

m: massa final (massa do recipiente + massa seca das cascas – em g);

t: tara (massa do recipiente seco – em g).

100: fator para conversão em porcentagem

Os lipídios foram determinados seguindo-se a metodologia clássica de Soxhlet AOAC 920.39 (AOAC, 1995). Foram utilizadas cascas moídas com granulometria ≤ 1 mm em cartucho de celulose. Utilizou-se éter dietílico como solvente extrator. O refluxo ocorreu

durante 8 h (de 4 a 5 gotas por segundo). A relação matemática definida para o cálculo do teor de lipídios está apresentada na Equação 7. A determinação foi realizada em triplicata.

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{M_{B+LE} - M_B}{M_A} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

M_{B+LE} : massa do balão + lipídios (g); M_B : massa do balão seco (g); M_A : massa da amostra seca pesada antes da extração (g); 100: fator para conversão em porcentagem

O parâmetro proteína bruta foi determinado de acordo com a metodologia AOAC 960.52 (AOAC, 1995). Foram realizadas as três etapas do método: digestão, destilação e titulação. Para a digestão, utilizou-se um bloco digestor (Tecnal TE007D, Brasil). Para a destilação, utilizou-se um destilador de nitrogênio (Tecnal TE-0364, Brasil). Para a titulação, utilizou-se solução HCl 0,1 N em bureta. Todo o processo foi feito tanto para a amostra como para o branco. A Equação 8 foi usada para o cálculo do teor de proteína bruta presente nas cascas. A determinação foi realizada em triplicata.

$$\% \text{ Proteína bruta} = \frac{(V_A - V_B) \times 14,007 \times N \times fc \times f}{M_A} \quad (8)$$

Onde:

V_A : volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL)

V_B : volume de HCl gasto na titulação do branco (mL)

14,007: fator de conversão para o nitrogênio

N: normalidade da solução de HCl usada na titulação

fc: fator de correção do volume de solução (obtido na padronização do HCl) = 0,987

f: fator de conversão de nitrogênio total em proteína para a soja = 6,25

M_A : massa da amostra pesada (mg)

4.2.3 Metais

Para determinar os principais metais presentes nas cascas de soja, utilizou-se a técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Para tanto, cascas de soja com granulometria ≤ 1 mm foram previamente digeridas seguindo a

metodologia de Oliveira et al. (2017). A solução resultante da digestão foi utilizada para determinação dos metais. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Alumínio, cromo, sódio, manganês, cobre, zinco, ferro, magnésio e cálcio foram quantificados utilizando-se um ICP OES (Perkin-Elmer - OPTIMA 3000, Estados Unidos) e *software* ICP-Winlab (Perkin-Elmer, Estados Unidos). Argônio foi utilizado como gás principal, auxiliar e na nebulização. As condições e parâmetros utilizados estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro I – Parâmetros instrumentais e acessórios ICP OES

Parâmetros		Condições
Potência de radiofrequência		1,3 kW
Vazão do gás principal		14 L·min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização		0,85 L·min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar		1 L·min ⁻¹
Nebulizador		Apex-Q
Tipo de câmara de nebulização		Ciclônica
Observação		Axial
Vazão da amostra		6 · 10 ⁻⁴ L·min ⁻¹
Comprimento de onda	Alumínio	308 nm
	Cromo	267 nm
	Sódio	589 nm
	Manganês	257 nm
	Cobre	327 nm
	Zinco	213 nm
	Ferro	238 nm
	Magnésio	280 nm
	Cálcio	317 nm

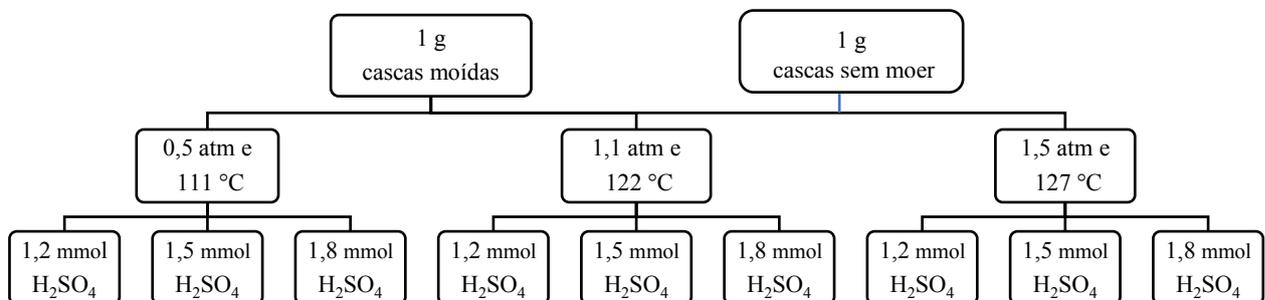
4.3 TESTES DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ÁCIDA DAS CASCAS DE SOJA

Com base na metodologia descrita por Cassales (2010), foram propostos alguns testes para verificar a influência da quantidade de ácido, da granulometria das cascas de soja, da pressão e temperatura na autoclave, sobre a liberação de carboidratos. A relação sólido-líquido (gramas de cascas : mililitros de ácido + água) foi mantida em 1:8,8, assim como o tempo de reação (cerca de 10 min de pré-aquecimento, 40 min de reação na temperatura e pressão definidas e aproximadamente 10 min de resfriamento). A reação ocorreu no interior da autoclave (AV 30 – Phoenix, Brasil). Após descompressão desta, o HCS foi resfriado em banho de gelo, filtrado sob vácuo (Tecnal TE-058, Brasil) através de papel de filtro comum

em funil de Büchner, e centrifugado a 10414 x g (Eppendorf 5804R, Alemanha) para remoção de partículas suspensas.

Com relação à granulometria das cascas, foram testadas duas condições: previamente moídas em moinho de facas (Marconi MC090/FA, Brasil) para padronização da granulometria (fixada em ≤ 1 mm), e cascas sem nenhum tratamento (com diâmetro médio de 5 mm). As quantidades de cascas moídas e sem moer, as pressões e temperaturas internas da autoclave, assim como as concentrações do ácido testadas na reação, estão esquematizadas na Figura 4. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 4 - Esquema experimental de hidrólise em diferentes condições



Para determinação do teor de açúcares redutores liberados em cada teste, utilizou-se a metodologia DNS descrita por Miller (1959), em triplicata.

Antes e após cada um dos testes de hidrólise, foram feitas imagens com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura (JSM - 6610LV, Japão) sob diferentes ampliações. Ouro foi utilizado para recobrir as amostras.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO DE CASCAS DE SOJA (HCS)

Sob a melhor condição de hidrólise determinada pelo estudo prévio, foi feita a caracterização do hidrolisado de cascas de soja (HCS) quanto aos carboidratos (xilose, arabinose, glicose e celobiose) e os produtos de degradação (ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural) presentes. Para tanto, foi utilizado um cromatógrafo (Thermo Scientific modelo Dionex Ultimate 3000, Estados Unidos), módulo de bomba LGP 3400 SD, módulo de injetor WPS 3000 TSL, detector espectrofotométrico por conjunto de arranjo de diodos DAD 3000, detector de índice de refração RI 101 Shodex e coluna Aminex HPX 87H. Ácido sulfúrico foi utilizado como fase móvel, com concentração proporcional de $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,

vazão de $0,60 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$, temperatura do amostrador em $15 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura da coluna a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e temperatura ambiente para o detector. O tempo total de injeção foi de 51 min. As amostras foram diluídas (1:5 – amostra:água destilada) e injetadas, sendo analisadas em duplicata. Os dados foram captados e analisados no *software* Chromeleon 6.80 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

O HCS foi ainda caracterizado em relação aos teores de carbono e nitrogênio, para posterior estudo da influência da razão C/N na acumulação lipídica. Para tanto, utilizou-se um analisador elementar (Perkin Elmer modelo 2400 série II, Estados Unidos). Caracterizou-se o HCS obtido na melhor condição estudada anteriormente para a hidrólise ácida.

4.5 MICRO-ORGANISMO

Nos cultivos foi utilizada a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, isolada pela equipe do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG em estudo anterior (OTERO, 2011), e depositada na Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação André Tosello sob o n° 7688.

4.6 PRÉ CULTIVO

4.6.1 Reativação, pré-inóculo e inóculo

A levedura foi reativada em tubos de ensaio com ágar *Yeast Malt* (YM) inclinado, composto por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): extrato de levedura (3), extrato de malte (3), peptona (5), glicose (10) e ágar (20). Os tubos foram incubados em estufa (Quimis Q-316 MA, Brasil) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h.

As culturas dos tubos foram raspadas com 10 mL de caldo YM (mesma composição citada, sem adição de ágar) e o conteúdo sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio estéreis, que foram posteriormente incubados em estufa (Quimis Q-316 MA, Brasil) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h.

O conteúdo de 2 tubos de pré-inóculo foram vertidos em um frasco Erlenmeyer contendo 180 mL de caldo YM, completando assim o volume final de 200 mL. Os frascos Erlenmeyer foram colocados em incubadora rotatória (Tecnal TE-424, Brasil) a 180 rpm e $25 \text{ }^\circ\text{C}$, monitorando-se o crescimento por câmara de Neubauer até alcançar o mínimo de $1 \times 10^8 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ (SANTOS et al., 2012). O inóculo foi preparado em triplicata.

4.7 CULTIVOS PRELIMINARES EM FRASCOS AGITADOS

4.7.1 Arabinose, glicose e xilose como principais fontes de carbono

Para compreender o comportamento da *R. mucilaginosa* CCT 7688 durante o processo de assimilação dos principais carboidratos presentes no HCS, foram feitos cultivos usando o meio de cultivo proposto por Evans e Ratledge (1983), composto por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NH_4Cl (0,5); KH_2PO_4 (7); Na_2HPO_4 (2); $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (1,5); $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,1); extrato de levedura (1,5); $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,008); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,0001). Uma triplicata usando este meio de cultivo foi preparada individualmente para cada um dos três principais carboidratos presentes no HCS: xilose, arabinose e glicose, todos com concentração inicial de $30 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os carboidratos usados nos cultivos possuíam grau analítico. Após preparo de cada meio, o pH foi ajustado em 5,5. O meio de cultivo e os respectivos carboidratos foram esterilizados separadamente para evitar a reação de Maillard. O volume final foi 180 mL para cada frasco Erlenmeyer.

Após o inóculo, monitorado com o auxílio da câmara de Neubauer, atingir a contagem mínima ($1 \times 10^8 \text{células}\cdot\text{mL}^{-1}$), os frascos Erlenmeyer com os meios de cultivo e carboidratos analíticos foram inoculados diluindo-se o inóculo com água peptonada 0,1 % de forma que a concentração inicial fosse igual a $1 \times 10^7 \text{células}\cdot\text{mL}^{-1}$ (SANTOS et al., 2012). O volume final para cada frasco foi 200 mL (180 mL de meio + 20 mL de inóculo e água peptonada 0,1 %).

Os cultivos foram realizados em incubadora rotatória (Tecnal TE-424, Brasil) a 180 rpm e $25 \text{ }^\circ\text{C}$, e foram finalizados quando as concentrações de biomassa se mostraram constantes. Os pH e as concentrações de biomassa foram determinadas ao longo do cultivo conforme item 4.10.1. Os carboidratos remanescentes foram determinados por CLAE ao final dos cultivos, conforme item 4.10.2. Os teores lipídicos e os lipídios totais foram determinados ao final dos cultivos, conforme item 4.10.3.

4.7.2 HCS como fonte de carbono

O HCS obtido a partir da melhor condição de hidrólise, determinada no item 4.3, foi neutralizado com NaOH 10 M até alcançar pH 5,5, filtrado sob vácuo (Tecnal TE 058, Brasil) através de papel de filtro comum em funil de Büchner, e então centrifugado a $10414 \times g$ (Eppendorf 5804R, Alemanha) para remoção de partículas suspensas. Em seguida, o HCS foi

caracterizado por CLAE conforme item 4.4. Posteriormente, o HCS foi concentrado em evaporador rotativo (Tecnal TE-058, Brasil) a 70 °C até atingir concentração igual a 33,34 g·L⁻¹ em termos de carboidratos (monitorado através de CLAE). Foram preparados 3 frascos Erlenmeyer (triplicata) com 180 mL de HCS concentrado cada, com concentração inicial de açúcares redutores (AR) igual a 33,34 g·L⁻¹, de forma que ao receber os 20 mL restantes reservados à inoculação (totalizando 200 mL de meio de cultivo), a concentração inicial de AR fosse igual a 30 g·L⁻¹. Sobre os 180 mL de HCS concentrado em cada frasco Erlenmeyer, foram acrescentados os demais componentes do meio de cultivo proposto por Evans e Ratledge (1983). O pH inicial foi reajustado para 5,5. Os frascos com os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave (Phoenix AV 30, Brasil) a 122 °C por 15 min.

Após inoculação, os frascos Erlenmeyer foram então incubados em incubadora rotatória (Tecnal TE-424, Brasil) a 180 rpm e 25 °C. Os cultivos foram finalizados quando as concentrações de biomassa se mostraram constantes. Os pH e as concentrações de biomassa foram determinadas ao longo do cultivo conforme item 4.10.1. Os carboidratos remanescentes foram determinados por CLAE ao final dos cultivos, conforme item 4.10.2. Os teores lipídicos e os lipídios totais foram determinados ao final dos cultivos, conforme item 4.10.3.

4.7.3 Mistura Xilose:Arabinose:Glicose:Celobiose como fonte de carbono

Uma mistura com os principais carboidratos presente no HCS concentrado, obtido no item 4.7.2, foi utilizada no cultivo de *R. mucilaginosa* CCT 7688 buscando simular o HCS concentrado em um meio sintético. Os carboidratos utilizados possuíam grau analítico. A concentração inicial da mistura de carboidratos foi 30 g·L⁻¹, quando somadas as concentrações dos 4 carboidratos envolvidos. O meio de cultivo foi aquele proposto por Evans e Ratledge (1983). O experimento foi realizado em triplicata. Os procedimentos de preparo do meio, volume de meio, correção de pH para 5,5, esterilização, reativação do micro-organismo, pré-inóculo, inóculo e inoculação do meio de cultivo (concentração inicial de células no meio = 1×10^7 células·mL⁻¹), foram feitos da mesma forma que nos itens 4.6 e 4.7.1.

Os cultivos foram realizados em incubadora rotatória (Tecnal TE-424, Brasil) a 180 rpm e 25 °C, e foram finalizados quando as concentrações de biomassa se mostraram constantes. Os pH e as concentrações de biomassa foram determinadas ao longo do cultivo conforme item 4.10.1. As concentrações dos carboidratos foram acompanhadas por CLAE ao

longo dos cultivos, conforme item 4.10.2. Os teores lipídicos e os lipídios totais foram acompanhados ao longo dos cultivos, conforme item 4.10.3.

4.8 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS

4.8.1 Principais carboidratos presentes no HCS

Com o objetivo de verificar a influência de alguns fatores na maximização da biossíntese de biomassa e de lipídios a partir dos principais carboidratos presentes no HCS, planejamentos experimentais foram propostos, conforme Tabela 2. As variáveis dependentes (respostas) estudadas foram biomassa, teor lipídico e lipídios totais.

Tabela 2 – Níveis e variáveis utilizadas no DCC para a maximização da biossíntese de biomassa e lipídios utilizando diferentes carboidratos como fonte de carbono.

Carboidratos	Variáveis independentes (fatores)	Níveis		
		-1	0	1
Xilose arabinose e glicose	Razão C/N	40	60	80
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O (g·L ⁻¹)	1,5	3,0	4,5
	pH inicial	3,5	4,5	5,5

Primeiramente, foram propostos 3 planejamentos do tipo delineamento composto central (DCC) para cada um dos três principais carboidratos presentes no HCS (xilose, arabinose e glicose). Foram preestabelecidos três diferentes fatores ($k = 3$) a serem testados: a razão C/N, a concentração de MgSO₄ · 7 H₂O e o pH inicial, resultando em delineamentos 2³ com 11 experimentos cada (2^k + 3 pontos centrais). A concentração inicial de cada carboidrato foi fixada em 30 g·L⁻¹, sendo o meio de cultivo utilizado aquele proposto por Evans e Ratledge (1983) com alterações na concentração de MgSO₄ · 7 H₂O e nas fontes de carbono e nitrogênio de forma a adequar as razões C/N estipuladas na Tabela 2.

Os procedimentos de preparo do meio, volume de meio, esterilização, reativação do micro-organismo, pré-inóculo, inóculo e inoculação do meio de cultivo (concentração inicial de células no meio = 1 x 10⁷ células·mL⁻¹), foram feitos da mesma forma que nos itens 4.6 e 4.7.1.

Os cultivos foram realizados em incubadora rotatória (Tecnal TE-424, Brasil) a 180 rpm e 25 °C, e foram finalizados após 240 h. Os pH e as concentrações de biomassa foram determinadas ao longo do cultivo conforme item 4.10.1. Os carboidratos remanescentes foram determinados por CLAE ao final dos cultivos para os ensaios com os melhores resultados para a variável lipídios totais, conforme item 4.10.2. Os teores lipídicos e os lipídios totais foram determinados ao final dos cultivos, conforme item 4.10.3.

4.8.2 HCS

Após execução dos planejamentos com os principais carboidratos presentes no HCS, foram feitas comparações entre os resultados alcançados (item 5.4.4) com o objetivo de propor os melhores fatores e níveis a serem estudados com o HCS. Portanto, os níveis e as variáveis estudadas estão apresentados no item 5.4.5.

O HCS concentrado utilizado nos ensaios do planejamento foi suplementado com os componentes do meio proposto por Evans e Ratledge (1983) com alterações no pH inicial, na concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e na razão C/N, de forma a adequar o meio de cultivo aos níveis estabelecidos no planejamento (item 5.4.5). Todos os demais parâmetros e condições, procedimentos de preparo e acompanhamento do cultivo foram feitos conforme item 4.8.1.

4.9 ESTRATÉGIAS PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS

A partir das melhores condições determinadas através dos planejamentos para a glicose e para o HCS concentrado, foram propostas 4 diferentes estratégias de cultivo em batelada alimentada (BA) com o objetivo de aumentar a produção de lipídios.

A primeira estratégia (BA 1) consistiu inicialmente em glicose $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ como principal fonte de carbono em um meio de cultivo suplementado com os componentes do meio proposto por Evans e Ratledge (1983). Os parâmetros razão C/N, pH inicial e concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ foram ajustados para coincidirem com aqueles determinados no melhor ensaio para o planejamento da glicose (item 5.4.1). O cultivo foi acompanhado até que a concentração de biomassa fosse constante para, então, haver a alimentação de HCS (apenas HCS, sem adição de outros nutrientes). Adicionou-se HCS concentrado em volume suficiente para que, somado ao volume já existente no frasco Erlenmeyer, a concentração de HCS no meio fosse $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em termos de AR). O cultivo foi acompanhado até que a concentração de biomassa novamente fosse constante.

A segunda estratégia (BA 2) foi executada similarmente à primeira estratégia, mas inicialmente com glicose $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e posterior alimentação de HCS concentrado (apenas HCS, sem adição de outros nutrientes) em volume suficiente para que, somado ao volume já existente no frasco Erlenmeyer, a concentração de HCS no meio fosse $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em termos de AR).

A terceira estratégia (BA 3) consistiu inicialmente em HCS $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em termos de AR) em um meio de cultivo suplementado com os componentes do meio proposto por Evans e Ratledge (1983). Os parâmetros razão C/N, pH inicial e concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ foram ajustados para coincidirem com aqueles determinados no melhor ensaio para o planejamento do HCS concentrado (item 5.4.5). O cultivo foi acompanhado até que a concentração de biomassa fosse constante para, então, haver a alimentação de glicose $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (apenas glicose, sem adição de outros nutrientes), sendo acompanhado até que a concentração de biomassa novamente fosse constante.

A quarta estratégia (BA 4) foi executada similarmente à terceira estratégia, mas iniciando com HCS $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (em termos de AR) e posterior alimentação com glicose (apenas glicose, sem adição de outros nutrientes) em volume suficiente para que, somado ao volume já existente no frasco Erlenmeyer, a concentração de glicose no meio fosse $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os procedimentos de preparo do meio, volume de meio, esterilização, reativação do micro-organismo, pré-inóculo, inóculo e inoculação do meio de cultivo (concentração inicial de células no meio = $1 \times 10^7 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$), foram feitos da mesma forma que nos itens 4.6 e 4.7.1 para todas as estratégias. Os cultivos foram realizados em incubadora rotatória (Tecnal TE-424, Brasil) a 180 rpm e $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Todas as 4 estratégias foram realizadas em triplicata. Os pH e as concentrações de biomassa foram determinadas ao longo do cultivo conforme item 4.10.1. Os carboidratos remanescentes foram determinados por CLAE ao final dos cultivos, conforme item 4.10.2. Os teores lipídicos e os lipídios totais foram determinados ao final dos cultivos, conforme item 4.10.3.

Repetiu-se o cultivo para aquela que se mostrou a melhor estratégia, com o objetivo de acompanhar a cinética da produção de lipídios totais ao longo do tempo. Para cada 24 h de cultivo uma triplicata foi analisada em termos de lipídios totais.

4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA MONITORAMENTO DOS CULTIVOS

4.10.1 Biomassa e pH

A concentração de biomassa ao longo do cultivo foi determinada por absorvância a 600 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP 220, China). Para tanto, uma alíquota de 5 mL de cada cultivo foi centrifugada (Eppendorf 5804R, Alemanha) a 10414 x g por 15 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação do pH e a biomassa precipitada foi ressuspendida e diluída com água destilada em balão volumétrico para determinação da concentração. Para tanto, utilizou-se uma curva padrão de biomassa previamente construída, conforme metodologia de Choi e Park (2003). Já o pH foi determinado com o auxílio de um pHmetro digital (Marte MB-10, Brasil).

4.10.2 Consumo dos carboidratos

As concentrações dos carboidratos foram determinadas ao final dos cultivos para os cálculos dos parâmetros de crescimento celular (item 4.11) e determinação dos carboidratos residuais, assim como também foram determinadas ao longo dos cultivos para construção das curvas cinéticas (exclusivamente para os itens 4.7.3 e 4.9). Para tanto, uma alíquota de 5 mL de cada cultivo foi centrifugada (Eppendorf 5804R, Alemanha) a 10414 x g por 15 min. Os sobrenadantes recolhidos foram filtrados sob vácuo em membrana de acetato de celulose de 0,45 μm (Sartorius Stedim, Alemanha) e, em seguida, analisados por CLAE. Para tanto, foi utilizado um cromatógrafo (Thermo Scientific modelo Dionex Ultimate 3000, Estados Unidos), módulo de bomba LGP 3400 SD, módulo de injetor WPS 3000 TSL, detector espectrofotométrico por conjunto de arranjo de diodos DAD 3000, detector de índice de refração RID e coluna Aminex HPX 87H. Ácido sulfúrico foi utilizado como fase móvel, com concentração proporcional de 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, vazão de 0,60 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volume de injeção de 20 μL , temperatura do amostrador em 15 $^{\circ}\text{C}$, temperatura da coluna a 50 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura ambiente para o detector. Os dados foram captados e analisados no *software* Chromeleon 6.80 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

4.10.3 Lipídios

Ao final dos cultivos, todo o conteúdo de cada frasco Erlenmeyer foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Alemanha) a 10414 x g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e a biomassa precipitada foram acrescentados 15 mL de água destilada para lavagem. O conteúdo foi ressuspensionado com o auxílio de um agitador vortex (ProLab VX-28, Brasil) e, então, novamente centrifugado sobre as mesmas condições anteriores. O novo sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensionada em vortex após a adição de 10 mL de água destilada. O conteúdo ressuspensionado foi vertido sobre placas de Petri que, posteriormente, foram armazenadas em estufa (Quimis Q-316 MA, Brasil) a 35 °C por 48 h para evaporação da água. Após a secagem, as placas foram raspadas e a biomassa seca foi utilizada para o processo de extração lipídica conforme metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959), adaptado por Manirakiza et al. (2001).

Para o acompanhamento cinético da produção de lipídios (itens 4.7.3 e 4.9), uma triplicata foi submetida ao mesmo procedimento acima a cada 24 h de cultivo.

O parâmetro lipídios totais foi determinado a partir da relação entre a concentração de biomassa ao final do cultivo e o teor lipídico nela contido, conforme Equação 9.

$$\text{Lipídios totais (g} \cdot \text{L}^{-1}\text{)} = \frac{C_x \cdot \text{TL}}{100} \quad (9)$$

Onde:

C_x : concentração da biomassa ao final do cultivo ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$);

TL: teor lipídico (%)

4.11 CÁLCULO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR

Os fatores de conversão foram calculados conforme Schmidell et al. (2001). O fator de conversão do carboidrato em biomassa ($Y_{X/S}$), o fator de conversão de carboidrato em lipídios ($Y_{P/S}$), assim como o fator de conversão da biomassa em lipídios ($Y_{P/X}$), foram calculados através das Equações 10, 11 e 12, respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (10)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_f}{S_0 - S_f} \quad (11)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_f}{X_f - X_0} \quad (12)$$

Onde:

X_f : concentração final de biomassa ($g \cdot L^{-1}$); X_0 : concentração inicial de biomassa ($g \cdot L^{-1}$);
 S_0 : concentração inicial de açúcares adicionados ($g \cdot L^{-1}$); S_f : concentração final de açúcares residuais ($g \cdot L^{-1}$); P_f : concentração final de lipídios produzidos ($g \cdot L^{-1}$).

Para avaliar o desempenho do cultivo microbiano, foram calculadas as produtividades em biomassa (P_X) e em lipídios (P_L), através das Equações 13 e 14, respectivamente (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P_X = \frac{X_f - X_0}{t_t} \quad (13)$$

$$P_L = \frac{P_f}{t_t} \quad (14)$$

Onde:

X_f : concentração final de biomassa ($g \cdot L^{-1}$); X_0 : concentração inicial de biomassa ($g \cdot L^{-1}$);
 P_f : concentração final de lipídios produzidos ($g \cdot L^{-1}$); t_t : tempo total de cultivo (h).

Para determinação da velocidade máxima de crescimento, foi utilizada a fase exponencial, pois nesta a velocidade específica é constante e máxima (MONOD, 1949). O cálculo foi feito com através da Equação 15, conforme Schmidell et al. (2001). Para tanto, os dados do tempo e da concentração de biomassa foram lançados no *software* Excel® (Microsoft, Estados Unidos). A curva que representou o crescimento exponencial foi usada para gerar uma linha de tendência que conseguisse englobar o maior número de pontos possíveis desta fase. Ao gerar a equação que representou a linha de tendência, μ_{max} foi determinada por similaridade com a Equação 15.

$$\ln(X_1) = \mu_{max}t + \ln(X_0) \quad (15)$$

Onde:

X_1 : concentração da biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); t : tempo de cultivo (h); X_0 : concentração de biomassa inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.12 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

4.12.1 Análise por RMN ^1H .

Para o experimento de ressonância magnética nuclear (RMN) cerca de 10 mg de lipídios produzidos por *R. mucilaginosa* CCT 7688 (para o cultivo com melhor produção de lipídios totais neste estudo) foram inseridos em um tubo de vidro específico para RMN. Em seguida foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) até volume final de 500 μL . Medições de RMN unidimensional foram realizadas em espectrômetro Ascend 400 MHz 9,4 T (Bruker, Estados Unidos). Os espectros foram adquiridos com 128 varreduras (NS), 297 k pontos (TE), 6,84 s de aquisição (AQ) e tempo de espera de 1 s (D1). Todos os espectros foram processados com a utilização de multiplicação exponencial (^1H , 0,30 Hz (LB)) e correções manuais de fase e de linha de base.

4.12.2 Derivatização e Análise em CG/MS

A determinação do perfil de ácidos graxos foi realizada (para o cultivo com melhor produção de lipídios totais neste estudo) utilizando o método adaptado de Metcalfe, Schmitz e Pelka (1966) para a esterificação da fração lipídica (derivatização). As amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso (Shimadzu 2010 Plus, Japão), equipado com injetor *split/splitless*, coluna capilar RTX®-1 (30 m \times 0,25 mm diâmetro interno \times 0,25 μm) e detector por ionização de chama. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio em uma vazão de 1,25 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, e as temperaturas do injetor e do detector foram de 260 $^{\circ}\text{C}$. Para a separação, as condições cromatográficas foram: temperatura inicial da coluna de 50 $^{\circ}\text{C}$, elevando-se para 200 $^{\circ}\text{C}$ em uma taxa de 6 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sendo mantida nesta temperatura por 4 min; na segunda rampa de aquecimento, a taxa de aumento foi de 2 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$, sendo mantida nesta temperatura por 10 min. Os padrões Sigma-Aldrich foram utilizados para identificação dos ácidos graxos, sendo estes quantificados por normalização da área.

4.13 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Análise de variância foi utilizada para determinar as diferenças entre os parâmetros estatísticos. Quando necessário, as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de significância (p -valor $< 0,05$). As curvas de contorno foram desenvolvidas conforme Rodrigues e Iemma (2014). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* Statistica® 5.0. Para todas as análises de variância, os pressupostos de independência, normalidade e homocedasticidade foram previamente verificados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CASCAS DE SOJA

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados para a caracterização das cascas de soja utilizadas neste estudo.

Tabela 3 - Caracterização das cascas de soja

Metais (mg·kg ⁻¹) ⁽¹⁾	
Alumínio	502,01
Zinco	42,20
Manganês	40,12
Sódio	12,06
Cobre	7,29
Cromo	2,60
Cálcio	0,0048
Magnésio	0,0032
Ferro	0,0014
Carboidratos e produtos de degradação (%) ⁽¹⁾⁽²⁾	
Glicose	37,90
Xilose	20,55
Arabinose	5,25
Celobiose	2,50
Furfural	0,60
Ácido acético	0,60
Hidroximetilfurfural	0,30

⁽¹⁾n = 1; ⁽²⁾Cromatograma apresentado no Apêndice 1.

Através da cromatografia (Tabela 3 – Apêndice 1) e das equações 3, 4 e 5, foi possível estimar os teores de lignina solúvel, celulose e hemicelulose em 9,94 %, 39,11 % e 27,22 %, respectivamente. A determinação da lignina insolúvel resultou em 4,79 ± 0,12 %. Desta forma, a lignina total foi estimada em 14,73 %. Já os parâmetros proteína bruta, cinzas e lipídios corresponderam a 10,15 ± 0,33 %, 4,16 ± 0,11 % e 2,57 ± 0,09 %, respectivamente. Outros parâmetros não determinados corresponderam a 2,06 % (estimado pela diferença entre o total - 100 % - e os demais parâmetros estimados/determinados). Em todos os

procedimentos de caracterização realizados foi utilizada base seca, exceto para a umidade, que resultou em um teor de 11,78 % \pm 0,12.

Cassales (2010) caracterizou cascas de soja e determinou teores de celulose, hemicelulose e lignina total iguais a 39,7 %, 25,5 % e 9,1 %, respectivamente. Foram ainda determinados os teores de cinzas e proteína bruta, resultando em teores iguais a 0,6 % e 13,1 %, respectivamente. Mielenz et al. (2009), após caracterizarem cascas de soja, obtiveram teores de celulose, hemicelulose e lignina total iguais a 38,4 %, 10,2 % e 2,8 %, respectivamente. Já os teores de cinzas e proteína bruta resultaram em teores iguais a 5,8 % e 10,7 %, respectivamente. Corredor et al. (2008) também caracterizaram cascas de soja e determinaram teores de celulose, hemicelulose e lignina total iguais a 36,4 %, 12,5 % e 18,2 %, respectivamente. Foram determinados ainda os teores de cinzas, proteína bruta e lipídios, resultando em teores iguais a 4,24 %, 14,21 % e 3,20 %, respectivamente. Já Cortivo et al. (2018) determinaram teores de celulose, hemicelulose e lignina total para as cascas de soja por eles caracterizadas iguais a 39 %, 24 % e 12 %, respectivamente, sendo estes valores muito próximos aos determinados neste estudo.

A soma dos teores de glicose, celobiose e hidroximetilfurfural (40,7 %) identificados na cromatografia ficaram próximas do teor calculado de celulose (39,11 %). A literatura prevê essa proximidade, pois a quebra das ligações poliméricas da celulose libera majoritariamente glicose, celobiose e hidroximetilfurfural (IRICK et al., 1988; KAAR et al., 1991; ROCHA et al., 2012). O pequeno desvio entre o teor de celulose e os produtos liberados pode ser explicado ao serem considerados os produtos formados em baixíssimas proporções não investigados neste estudo e que não foram considerados no cálculo, como o amido e o ácido fórmico, por exemplo. O mesmo ocorre para a soma dos teores de xilose, arabinose, furfural e ácido acético (27 %), que ficaram muito próximos do teor de hemicelulose calculado (27,22 %). A literatura também prevê essa proximidade, pois a quebra das ligações poliméricas da hemicelulose libera majoritariamente xilose, arabinose, ácido acético e furfural (IRICK et al., 1988; KAAR et al., 1991; ROCHA et al., 2012). O pequeno desvio também pode ser explicado pela não investigação de produtos formados em baixíssimas proporções a partir da quebra da hemicelulose, como o ácido glicurônico, por exemplo.

Os teores dos metais determinados neste estudo tiveram valores muito próximos aos determinados por Cassales (2010), com exceção do alumínio, onde foi determinada uma concentração de 713 mg·kg⁻¹ frente aos 502,01 mg·kg⁻¹ deste estudo. Metais são importantes para o crescimento dos micro-organismos. O magnésio, por exemplo, amplamente avaliado

no presente estudo, vem sendo relatado como um componente favorável no crescimento e um facilitador do acúmulo lipídico (ESSLINGER, 2009; SPIER, 2014; PEREIRA, 2018).

5.2 ESTUDO DAS CONDIÇÕES PARA HIDRÓLISE ÁCIDA DAS CASCAS DE SOJA

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da hidrólise em termos de liberação de açúcares redutores (AR) realizado a partir das cascas de soja moídas e sem moer. Nesta tabela estão apresentadas as condições de pressão (P - atm), temperatura (T - °C), quantidade de ácido sulfúrico por grama de cascas utilizadas (H_2SO_4 - $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) e a granulometria média das cascas (≤ 1 mm ou ~ 5 mm).

Tabela 4 - AR produzidos sob as respectivas condições de hidrólise

Condições P e T	Cascas moídas (≤ 1 mm)		Cascas sem moer (~ 5 mm)	
	H_2SO_4 ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	H_2SO_4 ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
0,5 atm e 111 °C	1,2	$9,34^{\text{C}} \pm 0,01$	1,2	$0,23^{\text{A,ab}} \pm 0,01$
	1,5	$9,85^{\text{B}} \pm 0,01$	1,5	$0,15^{\text{B}} \leq 0,01$
	1,8	$10,09^{\text{A,c}} \leq 0,01$	1,8	$0,16^{\text{B}} \leq 0,01$
1,1 atm e 122 °C	1,2	$15,27^{\text{C}} \leq 0,01$	1,2	$0,22^{\text{A,b}} \leq 0,01$
	1,5	$17,41^{\text{B}} \leq 0,01$	1,5	$0,14^{\text{B}} \leq 0,01$
	1,8	$18,10^{\text{A,a}} \leq 0,01$	1,8	$0,15^{\text{B}} \pm 0,02$
1,5 atm e 127 °C	1,2	$16,48^{\text{A,b}} \pm 0,10$	1,2	$0,22^{\text{B}} \pm 0,01$
	1,5	$14,06^{\text{B}} \pm 0,10$	1,5	$0,18^{\text{C}} \pm 0,01$
	1,8	$10,74^{\text{C}} \pm 0,03$	1,8	$0,26^{\text{A,a}} \pm 0,02$

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença estatística ao nível de significância de 5 % no teste Tukey entre as diferentes concentrações de ácido sob as mesmas condições de pressão e temperatura. Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença estatística ao nível de significância de 5 % no teste Tukey entre a melhor concentração de ácido sob as específicas condições de pressão e temperatura.

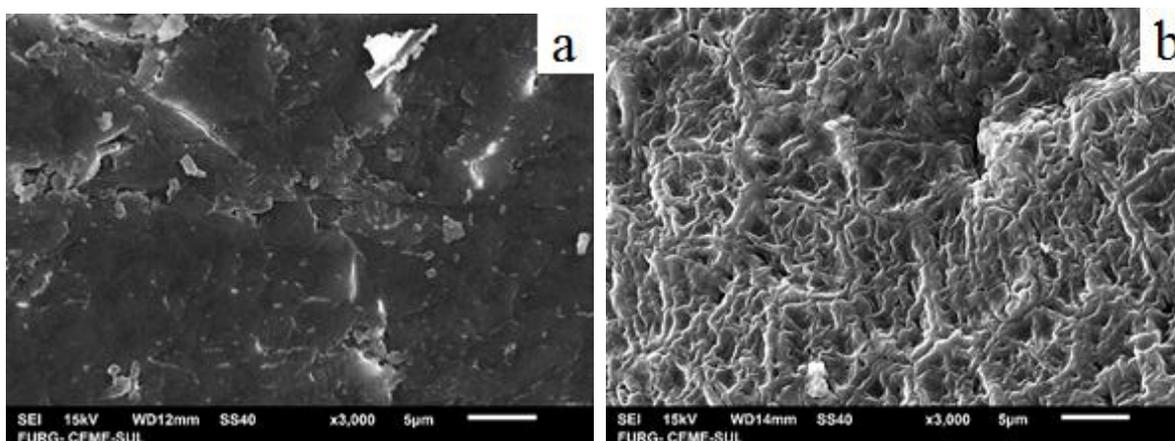
Para as cascas de soja moída, a análise estatística mostrou que, a 1,1 atm, 122 °C e $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ de ácido, a produção de AR foi maior que as demais. Para esta mesma condição de temperatura e pressão, e a 0,5 atm e 111 °C, o uso de $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ de ácido sulfúrico mostrou ser a melhor escolha, mas a 1,5 atm e 127 °C o efeito da concentração do ácido foi o oposto, onde $1,2 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ foi a relação mais produtiva de ácido testado. A análise estatística

também mostrou que, para as cascas de soja sem moagem, a melhor condição foi de 1,5 atm e 127 °C, quando foram utilizados 1,8 mmol·g⁻¹ de ácido sulfúrico.

Ao se analisar cada condição de temperatura e pressão testada, foi observado que para as condições de 0,5 atm e 111 °C e 1,1 atm e 122 °C o uso de 1,2 mmol·g⁻¹ de ácido resultou nos melhores valores, embora a 1,5 atm e 127 °C o uso de 1,8 mmol·g⁻¹ foi o melhor para a produção de açúcares redutores a partir das cascas de soja sem moagem. Para estas, todos os valores mostraram-se inferiores em relação às cascas moídas. Ao comparar os valores obtidos para os dois tipos de cascas de soja, ficou claro que o uso de cascas de soja moídas resultou em valores muito superiores aos obtidos sem moagem, indicando que a maior superfície de contato desempenha um papel importante na produção de açúcares por hidrólise ácida.

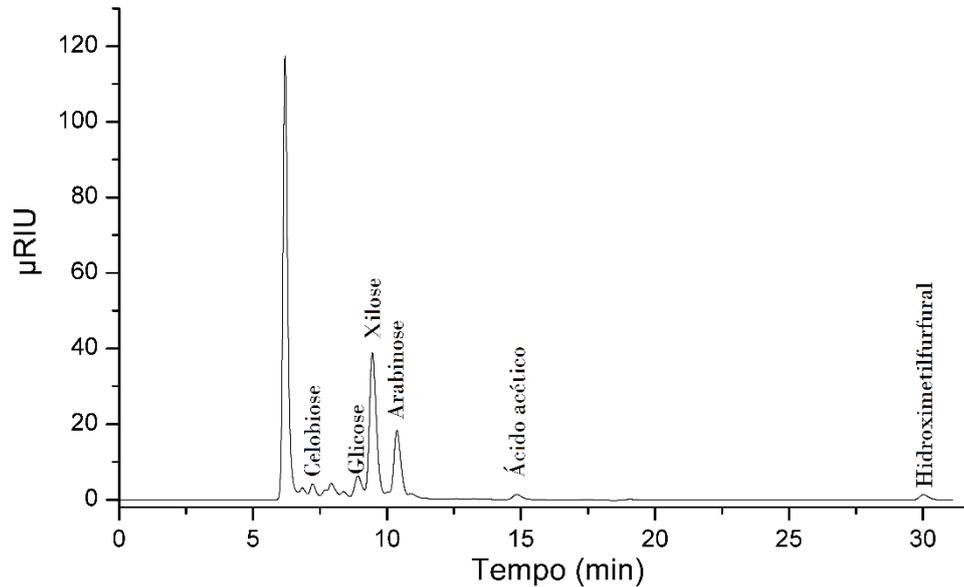
Na Figura 5, imagens de MEV (microscopia eletrônica de varredura) das cascas de soja podem ser vistas antes e depois da hidrólise. Microscopias foram feitas para todos os ensaios experimentais (Figura 4), mas apenas aquelas representando a melhor condição de hidrólise (1,1 atm, 122 °C e H₂SO₄ 1,8 mmol·g⁻¹) foram registradas na Figura 5. O ataque químico sob pressão e temperatura alterou a morfologia completamente lisa (a) para uma superfície rugosa e vazada (b).

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura com aumento de 3000 vezes realizada nas cascas de soja moídas antes (a) e após (b) a hidrólise ácida.



A partir das condições que foram consideradas as mais promissoras na liberação de carboidratos (1,1 atm, 122 °C, H₂SO₄ 1,8 mmol·g⁻¹), conforme Tabela 4, foi realizada uma cromatografia. Os resultados obtidos a partir desta estão apresentados na Figura 6 e Tabela 5, respectivamente. A soma dos carboidratos determinados na cromatografia e apresentados na Tabela 5 (17,8 g·L⁻¹) foi muito próxima àquela determinada por DNS (18,1 g·L⁻¹) apresentada na Tabela 4.

Figura 6 - Cromatograma para o produto da hidrólise ácida das cascas de soja moídas realizada sob as condições de 1,1 atm, 122 °C e H₂SO₄ 1,8 mmol·g⁻¹.



$\mu\text{RIU} = (\mu\text{RIU} = 1 \times 10^{-6} \text{ Refractive Index Units})$ unidades de índice de refração.

Tabela 5 – Interpretação do cromatograma do produto da hidrólise ácida das cascas de soja moídas realizada sob as condições de 1,1 atm, 122 °C e H₂SO₄ 1,8 mmol·g⁻¹.

Componentes	Concentração (g·L ⁻¹)	Tempo de retenção (min)
Xilose	11,59	9,45
Arabinose	4,37	10,37
Glicose	1,24	8,91
Ácido acético	1,08	14,84
Celobiose	0,60	7,22
Hidroximetilfurfural	0,06	30,46
Furfural	0,00	nd

nd = não detectado; n = 1

Cassales (2010) determinou a composição do hidrolisado obtido a partir de otimização da hidrólise ácida de cascas de soja, obtendo (g·L⁻¹): glicose 1,5, xilose 6,3, arabinose 4,5, ácido acético 0,6, furfural 0,03 e hidroximetilfurfural 0,08. Assim, o HCS utilizado neste estudo tem maior teor de carboidratos fermentáveis (17,8 g·L⁻¹), mas também um maior teor de produtos de degradação (1,14 g·L⁻¹) quando comparados aos 12,3 g·L⁻¹ de carboidratos fermentáveis e 0,71 g·L⁻¹ de produtos de degradação determinados por Cassales (2010). Todos

os compostos liberados na hidrólise ácida das cascas de soja que não eram carboidratos foram considerados produtos de degradação neste presente trabalho.

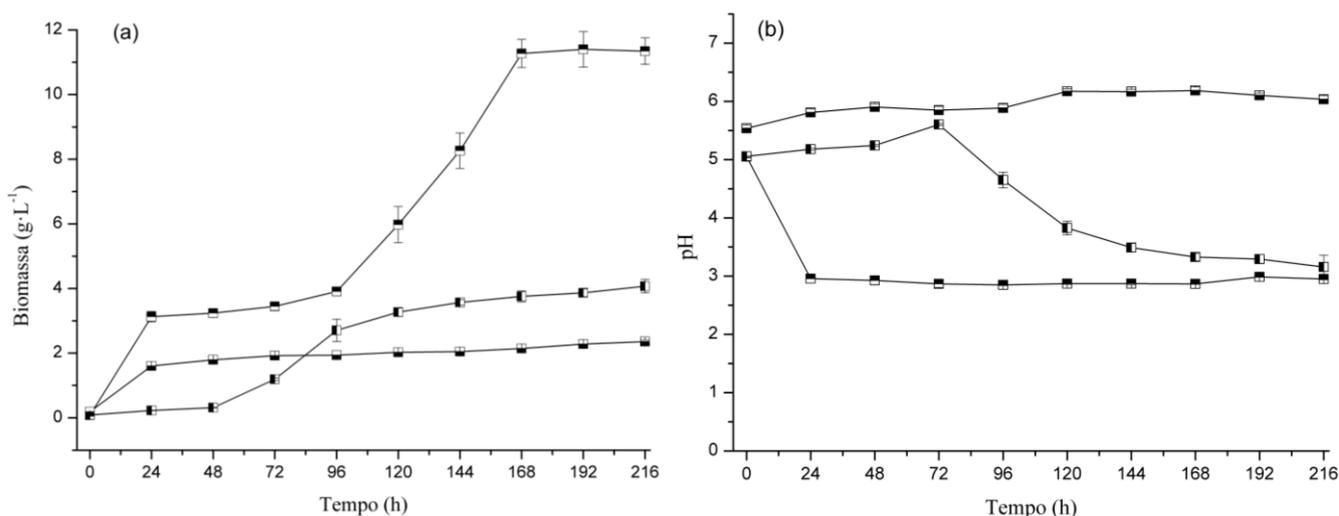
Com base nos resultados dos testes preliminares, as condições de hidrólise para todos os cultivos em frascos agitados com HCS em sua composição nesse presente trabalho, foram definidas como: H_2SO_4 $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, relação S:L 1:8,8, cascas com granulometria $\leq 1 \text{ mm}$ e tempo de reação de aproximadamente 60 min, sendo 40 min na pressão e temperatura de 1,1 atm e $122 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

5.3 CULTIVOS PRELIMINARES EM FRASCOS AGITADOS

5.3.1 Arabinose, glicose, xilose e mistura de carboidratos como fontes de carbono

Os cultivos preliminares usando arabinose, glicose e xilose como fonte de carbono no meio proposto por Evans e Ratledge (1983) foram acompanhados por 216 h. Os perfis de pH e concentração de biomassa (determinada com o auxílio da curva padrão de biomassa – Apêndice 2) ao longo do tempo estão apresentados na Figura 7.

Figura 7 – Cinética de acompanhamento da concentração de biomassa (a) e do pH (b) nos cultivos com *R. mucilaginosa* CCT 7688 no meio de cultivo proposto por Evans e Ratledge (1983) utilizando (■) glicose, (▣) arabinose e (▢) xilose como fontes de carbono.



Para a arabinose, após 216 h de cultivo foram produzidos $2,36 \pm 0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa e $0,06 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais. Foram determinados $26,70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de arabinose residual após o término do cultivo, o que indicou o consumo de apenas 11 % da fonte de

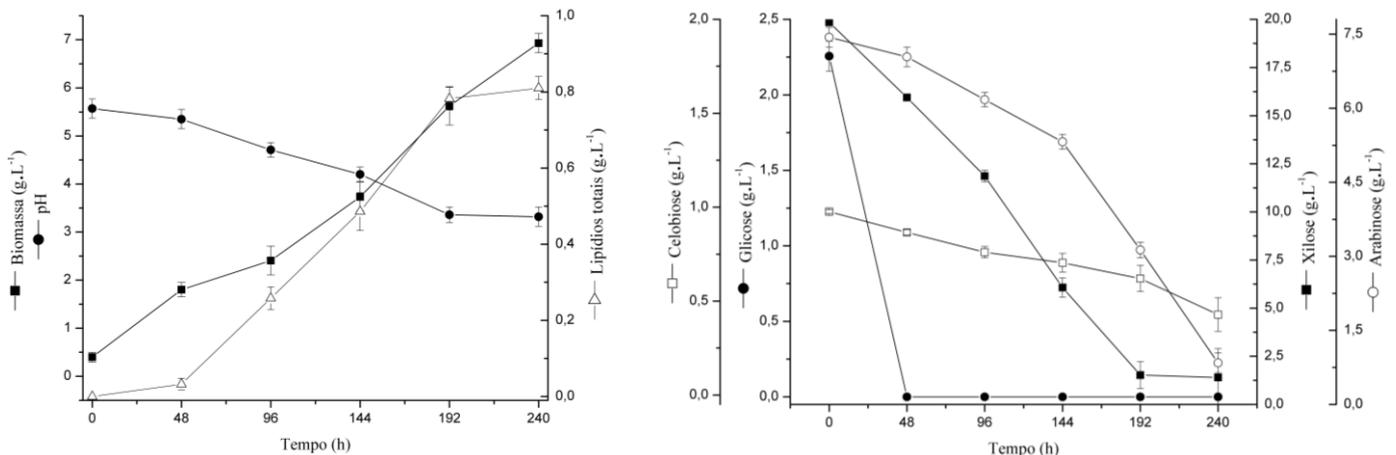
carbono disponível (Apêndice 3). O pH inicial foi $5,4 \pm 0,1$ sofrendo uma pequena elevação ao longo do cultivo, quando em 216 h foi registrado $5,9 \pm 0,1$.

Para a glicose foram produzidos $11,34 \pm 0,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa e $3,67 \pm 0,56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais após 216 h de cultivo. Toda a glicose disponível foi consumida, o que indicou a assimilação de 100 % da fonte de carbono disponível (Apêndice 3). O pH inicial foi $5,0 \pm 0,1$, mas em 24 h de cultivo declinou até $2,9 \pm 0,1$ onde se manteve praticamente estável até o final do cultivo.

Nos cultivos com a xilose, após 216 h de cultivo foram produzidos $4,07 \pm 0,20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa e $0,14 \pm 0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais. Foram determinados $14,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose residual após o término do cultivo, o que indicou o consumo de 50,6 % da fonte de carbono disponível (Apêndice 3). O pH inicial foi igual a $5,0 \pm 0,1$, sofrendo queda ao longo do cultivo quando alcançou $3,1 \pm 0,2$ em 216 h.

Após obtenção e concentração do HCS (item 4.7.2), este apresentou as seguintes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): xilose (19,85), arabinose (7,44), glicose (2,25) e celobiose (0,976), totalizando aproximadamente $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em termos de AR (Apêndice 4). Desta forma, uma mistura de carboidratos foi elaborada com as mesmas concentrações dos carboidratos supracitados (item 4.7.3), além dos componentes do meio descrito por Evans e Ratledge (1983). Os perfis de pH, concentração de lipídios totais, concentração dos carboidratos e concentração de biomassa ao longo do tempo para o cultivo com a mistura de carboidratos estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Acompanhamento de pH, biomassa, lipídios totais (a) e concentração dos carboidratos (b) ao longo de 240 h de cultivo usando a mistura de carboidratos



Durante as primeiras 48 h de cultivo na mistura de carboidratos houve uma pequena produção de lipídios totais ($0,03 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), aumentando significativamente após esse período até alcançar $0,79 \pm 0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Já a biomassa teve constante crescimento desde as primeiras horas até o fim do cultivo, alcançando $6,93 \pm 0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O pH, inicialmente em $5,5 \pm 0,1$, sofreu queda até o fim do cultivo quando foi registrado $3,3 \pm 0,2$. Dentre os carboidratos, a glicose se destacou ao ser completamente consumida em 48 h de cultivo. Xilose e arabinose tiveram consumo de cerca de 93 % e 89 %, respectivamente, após as 240 h de cultivo (Apêndice 3). Já a celobiose foi o carboidrato com menor consumo, restando ao final do cultivo mais de 40 % da concentração inicial (Apêndice 3).

Na Tabela 6 abaixo estão apresentados os parâmetros determinados para os cultivos envolvendo as diferentes fontes de carbono presentes no HCS.

Tabela 6 - Parâmetros de crescimento e produção lipídica para as diferentes fontes de carbono utilizadas.

Parâmetro Avaliado	Fonte de carbono utilizada			
	Arabinose	Glicose	Xilose	Mistura
Biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)*	$2,36^d \pm 0,05$	$11,34^a \pm 0,41$	$4,07^c \pm 0,20$	$6,93^b \pm 0,02$
Lipídios totais ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)*	$0,06^d \pm 0,01$	$3,67^a \pm 0,56$	$0,14^c \pm 0,03$	$0,79^b \pm 0,01$
Teor lipídico (%)*	$2,57^c \pm 0,32$	$32,26^a \pm 3,86$	$3,49^c \pm 0,99$	$11,52^b \pm 0,22$
$Y_{X/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)**	$0,658^a \pm 0,022$	$0,375^b \pm 0,013$	$0,263^c \pm 0,012$	$0,234^c \pm < 0,001$
$Y_{P/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)**	$0,018^b \pm < 0,001$	$0,122^a \pm 0,018$	$0,009^b \pm 0,001$	$0,028^b \pm < 0,001$
$Y_{P/X}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)**	$0,027^c \pm 0,004$	$0,325^a \pm 0,038$	$0,035^c \pm 0,005$	$0,122^b \pm 0,003$
P_X ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	$0,011^d \pm < 0,001$	$0,058^a \pm 0,002$	$0,020^c \pm < 0,001$	$0,027^b \pm < 0,001$
P_L ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	$0,0003^b \pm < 0,0001$	$0,0190^a \pm 0,0030$	$0,0007^b \pm < 0,0001$	$0,0030^b \pm < 0,0001$
μ_{\max} (h^{-1})	$0,047^b \pm < 0,001$	$0,158^a \pm 0,009$	$0,047^b \pm 0,002$	$0,018^c \pm < 0,001$

* Parâmetros determinados ao final de cada cultivo; ** As concentrações dos carboidratos residuais estão apresentadas no Apêndice 3; n = 3. Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença estatística ao nível de significância de 5 % no teste Tukey.

Bura et al. (2012) investigaram a capacidade de assimilação de arabinose por *R. mucilaginosa* PTD3 I visando produção de arabitol. Os pesquisadores observaram que a conversão de arabinose em arabitol atingiu apenas 29 % da conversão teórica, se mostrando assim como o carboidrato com a menor taxa de conversão dentre os demais carboidratos estudados. Embora neste presente estudo apenas 11 % da concentração inicial de arabinose tenha sido convertida em biomassa por *R. mucilaginosa* CCT 7688, observou-se um fator de

conversão do carboidrato em biomassa ($Y_{X/S}$) proporcionalmente elevado, com valor igual a $0,658 \pm 0,022 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ para uma concentração de biomassa igual a $2,36 \pm 0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. No entanto, a concentração de lipídios totais foi baixa ($0,06 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) quando comparada à glicose ($3,67 \pm 0,56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), por exemplo, resultando em um fator de conversão do carboidrato em lipídios igual a $0,018 \pm 0,003 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Enshaeieh et al. (2015), cultivando *R. mucilaginosa* (cepa sem identificação) com glicose ($75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 6,5, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm, obtiveram lipídios totais, biomassa e teor lipídico iguais a $10,97 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $18,84 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 58,2 %, respectivamente. Já Ahmad et al. (2015), usando glicose ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de carbono no cultivo de *R. mucilaginosa* FRR 2406, obtiveram biomassa, lipídios totais e teor lipídico iguais a $16,79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $3,61 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 21,55 %, respectivamente, sendo a glicose completamente consumida em 168 h. O presente estudo obteve valores semelhantes, $11,34 \pm 0,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa com teor lipídico igual a $32,26 \pm 3,86 \%$. A glicose também foi completamente consumida.

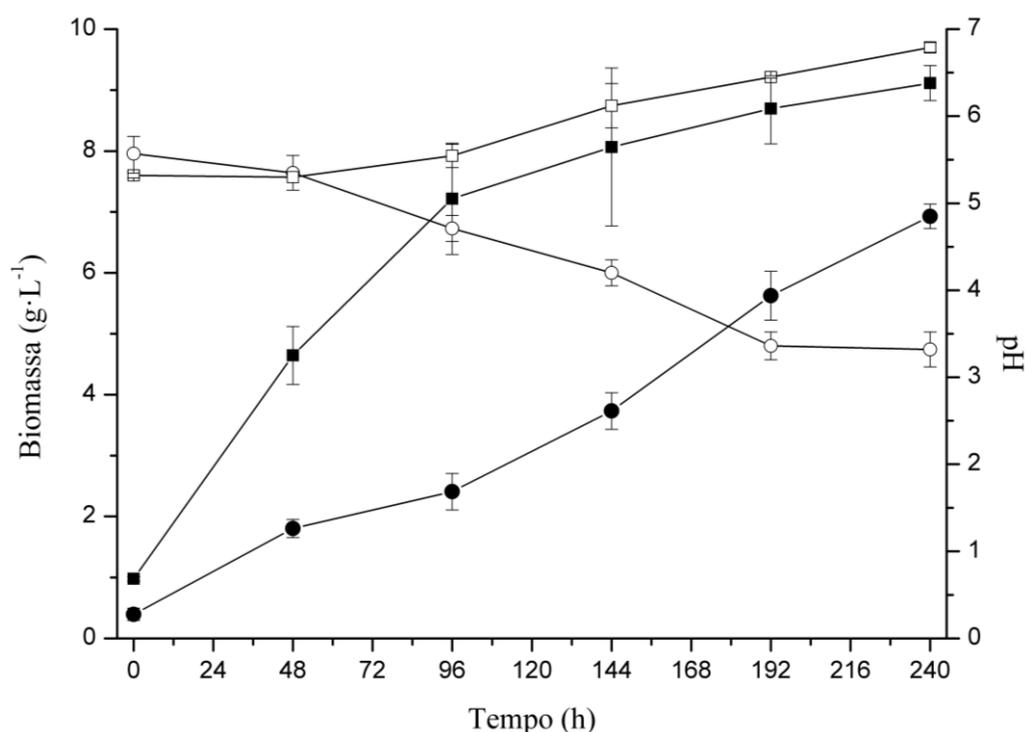
Ahmad et al. (2015), usando xilose ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de carbono no cultivo de *R. mucilaginosa* FRR 2406, obtiveram biomassa, lipídios totais e teor lipídico iguais a $10,78 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 14,41 %, respectivamente. A xilose foi completamente consumida em 144 h de cultivo. Já Pan et al. (2009), cultivando *R. mucilaginosa* H3-4 em meio a xilose ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), obtiveram biomassa, lipídios totais e teor lipídico iguais a $8,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $3,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 36,12 %, respectivamente. Houve o consumo de 99 % do açúcar em 120 h. Em ambos os casos, foram determinados valores superiores aos apresentados neste presente estudo, onde a biomassa produzida em 216 h de cultivo foi de $4,07 \pm 0,20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ com teor lipídico de $3,49 \pm 0,99 \%$.

Após análise estatística comparando as diferenças entre as médias com nível de significância de 5 % no teste Tukey, foi possível observar que, dentre as fontes de carbono testadas, a glicose se destacou das demais na maioria dos parâmetros analisados, com exceção do parâmetro $Y_{X/S}$. Esse desempenho com a glicose como fonte de carbono já era previsto, uma vez que na presença de glicose as células da levedura induzem uma gama de transportadores de hexoses e outras proteínas que juntas internalizam a glicose através da membrana celular com facilidade, permitindo assim a metabolização da hexose (CARLSON, 1988). Glicose, meio sintético, xilose e arabinose foram, respectivamente, as fontes de carbono que resultaram nas maiores produções de biomassa.

5.3.2 HCS como fonte de carbono

Os cultivos preliminares usando HCS concentrado como fonte de carbono no meio proposto por Evans e Ratledge (1983) foram acompanhados por 240 h (assim como foi feito para a mistura de carboidratos). Os perfis de pH e concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ao longo do tempo estão apresentados na Figura 9. Para efeito de comparação, foram adicionados os perfis da mistura de carboidratos que simulou a concentração dos carboidratos presentes no HCS.

Figura 9 – Cinética de acompanhamento da concentração de biomassa para o HCS concentrado (■) e mistura de carboidratos (●), assim como do pH para o HCS concentrado (□) e mistura de carboidratos (○) nos cultivos com *R. mucilaginosa* CCT 7688 no meio de cultivo proposto por Evans e Ratledge (1983).



Nos cultivos com o HCS concentrado foram produzidos $9,11 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa em 240 h. O pH inicial foi igual a $5,3 \pm 0,1$, sofrendo aumento ao longo do cultivo chegando a $6,9 \pm 0,1$ em 240 h. A soma dos carboidratos presentes no HCS após as 240 h de cultivo foi igual a $1,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Apêndice 3), representando assim um consumo de 96 % dos carboidratos inicialmente disponíveis. Na mistura de carboidratos, após 240 h foi determinado a presença de $2,66 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carboidratos residuais (Apêndice 3), o que indicou um consumo de 91 % dos carboidratos inicialmente disponíveis. Embora o HCS concentrado possuísse teor de

xilose igual a $19,85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no início do cultivo (Apêndice 4), após 240 h de cultivo apenas aproximadamente 3 % do carboidrato permaneceu (Apêndice 3), indicando que no meio composto pelo HCS concentrado havia componentes que facilitaram a assimilação da xilose, diferentemente do que foi observado nos cultivos preliminares que utilizaram a xilose como principal fonte de carbono, onde após 216 h de cultivo aproximadamente 50 % do carboidrato permanecia como residual (Apêndice 3).

Não foram encontrados registros do uso de HCS no cultivo de *R. mucilaginosa*. No entanto, Schirmer-Michel et al. (2008) utilizaram o HCS no cultivo de *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 e produziram $9,30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa. O HCS era composto (em termos de carboidratos) por xilose, arabinose, manose e glicose, com concentrações iguais a $14,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $13,65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $8,23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Na Tabela 7 estão apresentados os parâmetros monitorados no cultivo envolvendo o HCS concentrado. Para efeito de comparação, os parâmetros obtidos a partir dos cultivos utilizando o meio sintético também foram apresentados.

Tabela 7 - Parâmetros de crescimento e produção lipídica para o cultivo utilizando o HCS concentrado como fonte de carbono, assim como para o meio sintético.

Parâmetro avaliado	Fonte de carbono utilizada	
	HCS concentrado	Mistura
Biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)*	$9,11^a \pm 0,01$	$6,93^b \pm 0,02$
Lipídios totais ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)*	$0,48^b \pm 0,06$	$0,79^a \pm 0,01$
Teor lipídico (%)*	$5,30^b \pm 0,68$	$11,52^a \pm 0,22$
$Y_{X/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)**	$0,282^a \pm 0,001$	$0,234^b \pm < 0,001$
$Y_{P/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)**	$0,016^b \pm 0,002$	$0,028^a \pm < 0,001$
$Y_{P/X}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)**	$0,059^b \pm 0,007$	$0,122^a \pm 0,003$
P_X ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	$0,033^a \pm < 0,001$	$0,027^b \pm < 0,001$
P_L ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	$0,0020^b \pm < 0,0001$	$0,0030^a \pm < 0,0001$
μ_{\max} (h^{-1})	$0,025^a \pm 0,002$	$0,018^a \pm < 0,001$

* Parâmetros determinados ao final de cada cultivo; ** As concentrações dos carboidratos residuais estão apresentadas no Apêndice 3. n = 3. Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença estatística ao nível de significância de 5 % no teste Tukey.

A biomassa produzida quando utilizada a mistura de carboidratos alcançou uma concentração inferior àquela alcançada quando utilizado o HCS concentrado. No entanto, a concentração de lipídios totais foi maior quando utilizada a mistura de carboidratos do que

quando utilizado o HCS concentrado. O parâmetro P_x para o HCS se mostrou estatisticamente maior do que quando utilizada a mistura de carboidratos. Já o parâmetro P_L se mostrou estatisticamente maior para a mistura de carboidratos do que para o HCS. No HCS concentrado a razão C/N inicial foi igual a aproximadamente 52, enquanto para a mistura a razão C/N inicial foi igual a aproximadamente 44 (Apêndice 5).

Os resultados obtidos a partir dos cultivos preliminares mostraram que a *R. mucilaginosa* CCT 7688 apresentou diferentes comportamentos dependendo da fonte de carbono a ser assimilada. Quando pentoses e hexoses estavam conjuntamente presentes (mistura de carboidratos), houve preferência por assimilar a hexose. Houve ainda maior assimilação dos carboidratos como um todo para o HCS concentrado (com $1,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em carboidratos residuais) do que para a mistura de carboidratos (com $2,66 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em carboidratos residuais). Esses dados indicam que é possível maximizar o consumo dos carboidratos visando maior produção lipídica, pois o micro-organismo demonstrou capacidade de assimilação dos carboidratos envolvidos neste estudo.

5.4 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS

Quando se trata de cultivo microbiano, geralmente é bastante complexo definir quais fatores realmente influenciam significativamente nas variáveis resposta. Para *R. mucilaginosa* CCT 7688, estudos anteriores como os de Spier (2014) e Pereira (2018) indicaram que o pH e a concentração do metal magnésio influenciaram significativamente o acúmulo de lipídios. A razão C/N é outro fator que é estudado por vários pesquisadores quando o objetivo é a obtenção de lipídios intracelulares (RATLEDGE, 2004; SANTOS, 2009; FABRICIO, 2018). Baseado nessas afirmativas, propôs-se estudar a influência dos 3 fatores (razão C/N, concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ e pH inicial) no acúmulo de lipídios por *R. mucilaginosa* CCT 7688 usando os três principais carboidratos presentes no HCS (xilose, arabinose e glicose) de forma individual, objetivando testar a influência desses fatores nas variáveis biomassa, teor lipídico e lipídios totais.

As razões C/N foram definidas com base na razão utilizada por Evans e Ratledge (1983) em seu trabalho (C/N = 40). A partir desta, foram propostas as outras razões a serem testadas, uma alta (C/N = 80) e uma intermediária (C/N = 60). As concentrações dos componentes do meio de cultivo que continham nitrogênio e /ou carbono (carboidrato, NH_4Cl e extrato de levedura) foram usadas nos cálculos para alcançarem as razões C/N estabelecidas. O extrato de levedura (12,25 % de N e 37,79 % de C, determinado

experimentalmente – Apêndice 5) teve sua concentração fixada em $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Este último foi fixado devido ao seu alto custo, mas foi mantida uma concentração mínima de forma a garantir seus nutrientes necessários ao desenvolvimento celular (BACCIOTTI, 2015). Já a concentração do NH_4Cl foi variada utilizando-se a ferramenta solver do *software* Excel® (Microsoft, Estados Unidos) de forma que as razões C/N estabelecidas na Tabela 2 fossem alcançadas, visto que é um sal de baixo custo comercial.

Dos estudos de Spier (2014) e Pereira (2018), que utilizaram em seus trabalhos concentrações de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) entre 0 e $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, foram determinadas as concentrações a serem testadas para esse componente. Para tanto, estabeleceu-se a concentração de $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ como nível central e propôs-se testar um nível acima ($4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e um nível abaixo ($1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), conforme Tabela 2.

Para o pH inicial, baseado no pH 5,5 proposto por Evans e Ratledge (1983), referência no cultivo de leveduras visando produção lipídica, e também baseado no pH inicial (4,5) utilizado por Spier (2014) em seu estudo com *R. mucilaginosa* CCT 7688, propôs-se o pH de Spier (2014) como nível central e o de Evans e Ratledge (1983) como nível mais alto, testando assim um pH mais baixo (3,5) no menor nível. Essa decisão foi embasada pela faixa de pH observada ao longo dos cultivos preliminares com carboidratos em grau analítico, que indicaram a capacidade da *R. mucilaginosa* CCT 7688 de atuar em pH inferiores a 3.

Primeiramente, foram realizados a maximização de biomassa, teor lipídico e lipídios totais para a glicose, depois para a xilose e por fim para a arabinose, buscando determinar a influência de cada fator estudado sobre as variáveis resposta.

5.4.1 Glicose

Na Tabela 8 estão apresentados os fatores estudados, os níveis (reais e codificados) e os resultados para o delineamento composto central utilizando glicose como principal fonte de carbono.

A média dos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11) para o parâmetro lipídios totais resultou em $4,11 \pm 0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Desta forma, o ensaio 6 foi aquele que apresentou o melhor resultado quando considerada a variável resposta mais importante: os lipídios totais. Foram produzidos neste ensaio $9,69 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa e $4,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais.

Tabela 8 - DCC 2³ (valores reais e codificados) para maximização da produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais utilizando glicose como principal fonte de carbono.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	B*	TL	LT
1	-1 (40)	-1 (1,5)	-1 (3,5)	9,63	32,82	3,16
2	+1 (80)	-1 (1,5)	-1 (3,5)	8,88	44,47	3,95
3	-1 (40)	+1 (4,5)	-1 (3,5)	9,83	35,73	3,51
4	+1 (80)	+1 (4,5)	-1 (3,5)	10,11	39,38	3,98
5	-1 (40)	-1 (1,5)	+1 (5,5)	11,51	34,52	3,97
6	+1 (80)	-1 (1,5)	+1 (5,5)	9,69	42,89	4,15
7	-1 (40)	+1 (4,5)	+1 (5,5)	11,74	34,47	4,05
8	+1 (80)	+1 (4,5)	+1 (5,5)	10,26	37,46	3,84
9	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	9,97	40,40	4,03
10	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	10,37	40,71	4,22
11	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	10,20	40,12	4,09

X₁: Razão C/N; X₂: Concentração de MgSO₄ · 7 H₂O (g·L⁻¹); X₃: pH inicial; B: Biomassa (g·L⁻¹); TL: Teor lipídico (%); LT: Lipídios totais (g·L⁻¹). Os valores entre parênteses são os valores reais e aqueles fora dos parênteses são os valores codificados. *Valores de biomassa determinados ao final das 240 h de cultivo.

Na Tabela 9 estão apresentados os efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais utilizando glicose como principal fonte de carbono.

Para a biomassa produzida a partir da glicose como principal fonte de carbono, as interações ‘razão C/N x MgSO₄ · 7 H₂O’ e ‘MgSO₄ · 7 H₂O x pH inicial’ não foram significativas (p-valor > 0,05). A razão C/N mostrou ter efeito negativo quando elevada do nível -1 (C/N = 40) para o nível +1 (C/N = 80), indicando que o aumento desse fator desfavoreceu a produção de biomassa. Embora o aumento da razão C/N seja necessária para garantir o acúmulo lipídico, o efeito negativo na produção de biomassa interfere nos interesses comerciais por reduzir os lipídios totais (RATLEDGE, 2004). Assim como a razão C/N, a interação ‘razão C/N x pH inicial’ também desfavoreceu a produção de biomassa. Os fatores MgSO₄ · 7 H₂O e pH inicial tiveram efeitos opostos à razão C/N e à interação ‘razão C/N x pH inicial’, uma vez que a mudança dos níveis -1 para o +1 favoreceram significativamente a produção de biomassa (em 0,55 g·L⁻¹ e 1,18 g·L⁻¹, respectivamente).

Para o teor lipídico produzido a partir da glicose como principal fonte de carbono, nenhuma das interações se mostraram significativas. Os fatores MgSO₄ · 7 H₂O e pH inicial também não foram significativos (p-valor > 0,05). O aumento do nível -1 para o nível +1 para

a razão C/N favoreceu o aumento do teor lipídico, assim como a literatura previa (RATLEDGE, 2004; SANTOS, 2009; FABRICIO, 2018).

Para os lipídios totais produzidos a partir da glicose como principal fonte de carbono, nenhum dos fatores ou interações estudadas mostrou efeito significativo ao nível de confiança estudado (95 %), conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais obtidos no cultivo com glicose como principal fonte de carbono.

Biomassa				
Fator	Efeito (g·L ⁻¹)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X ₁ (L)*	-0,94	0,13	-7,03	< 0,01
X ₂ (L)*	0,55	0,13	4,14	0,01
X ₃ (L)*	1,18	0,13	8,82	< 0,01
X ₁ X ₂	0,34	0,13	2,56	0,06
X ₁ X ₃ *	-0,71	0,13	-5,27	< 0,01
X ₂ X ₃	-0,15	0,13	-1,17	0,30
Teor lipídico				
Fator	Efeito (%)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X ₁ (L)*	6,66	1,44	4,60	0,01
X ₂ (L)	-1,91	1,44	-1,32	0,25
X ₃ (L)	-0,76	1,44	-0,53	0,62
X ₁ X ₂	-3,34	1,44	-2,31	0,08
X ₁ X ₃	-0,98	1,44	-0,68	0,53
X ₂ X ₃	-0,82	1,44	-0,57	0,60
Lipídios totais				
Fator	Efeito (g·L ⁻¹)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X ₁ (L)	0,31	0,15	1,95	0,12
X ₂ (L)	0,03	0,15	0,23	0,83
X ₃ (L)	0,35	0,15	2,23	0,09
X ₁ X ₂	-0,17	0,15	-1,11	0,33
X ₁ X ₃	-0,32	0,15	-2,02	0,11
X ₂ X ₃	-0,15	0,15	-0,98	0,38

*(p-valor < 0,05); X₁: Razão C/N; X₂: Concentração de MgSO₄ · 7 H₂O (g·L⁻¹); X₃: pH inicial; (L): linear

Na Tabela 10 estão apresentadas as análises de variância para biomassa, teor lipídico e lipídios totais para os cultivos do planejamento usando glicose como principal fonte de carbono.

Tabela 10 - Análise de variância para o DCC 2³ do cultivo utilizando glicose como principal fonte de carbono.

Biomassa					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	4	6,21	1,55	21,56	4,53
Resíduo	6	0,43	0,07		
Total	10	6,64			
Teor lipídico					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	1	88,90	88,90	15,68	5,11
Resíduo	9	51,00	5,66		
Total	10	139,90			

A partir das análises de variância e dos coeficientes de regressão (com coeficientes de correlação de até 0,97), foi possível estabelecer as equações dos modelos que representam o comportamento das respostas biomassa (Equação 16) e teor lipídico (Equação 17) em função das variáveis codificadas. Como para os lipídios totais não houve fator ou interação significativa, não foi gerado nenhum modelo. O F_{calculado} se mostrou maior que o F_{tabelado} para biomassa e teor lipídico (Tabela 10), assim como a razão F_{calculado}/F_{tabelado} foi igual a 4,76 para a biomassa e igual a 3,07 para o teor lipídico, tornando assim preditivo o modelo gerado. Além disso, os desvios entre os resultados experimentais (não publicados) e os preditos pelos modelos (Equações 16 e 17) foram inferiores a 15 % (RODRIGUES e IEMMA, 2014). Assim sendo, as Equações 16 e 17 preveem bem o comportamento da produção de biomassa e teor lipídico frente aos fatores estudados.

$$\text{Biomassa (g}\cdot\text{L}^{-1}) = 10,20 - 0,47 X_1 + 0,28 X_2 + 0,59 X_3 - 0,35 X_1X_3 \quad (16)$$

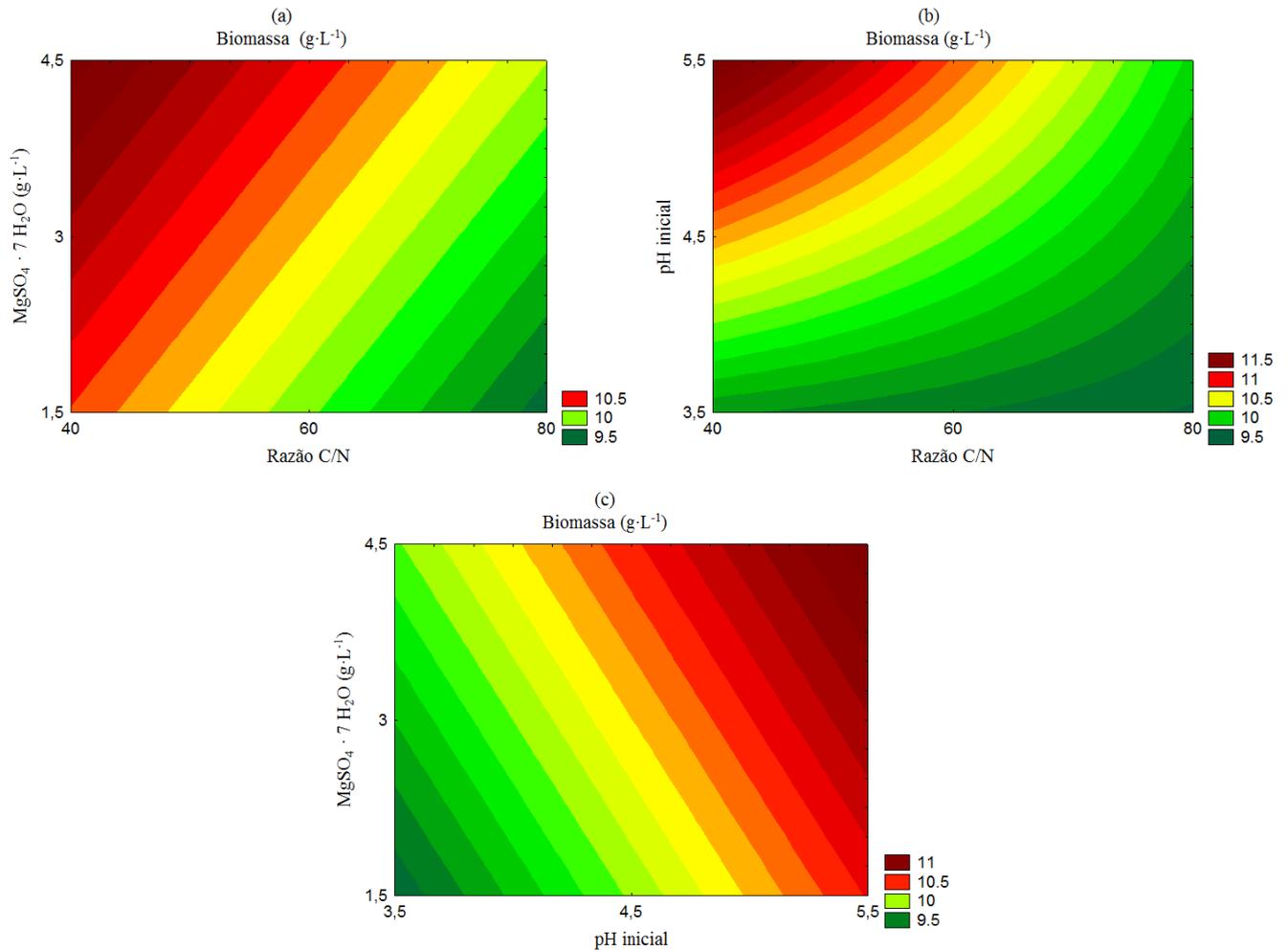
$$\text{Teor Lipídico (\%)} = 38,45 + 3,33 X_1 \quad (17)$$

Onde:

X₁: Razão C/N; X₂: Concentração de MgSO₄ · 7 H₂O (g·L⁻¹); X₃: pH inicial

A partir da Equação 16 foram geradas as curvas de contorno para a biomassa, conforme Figura 10.

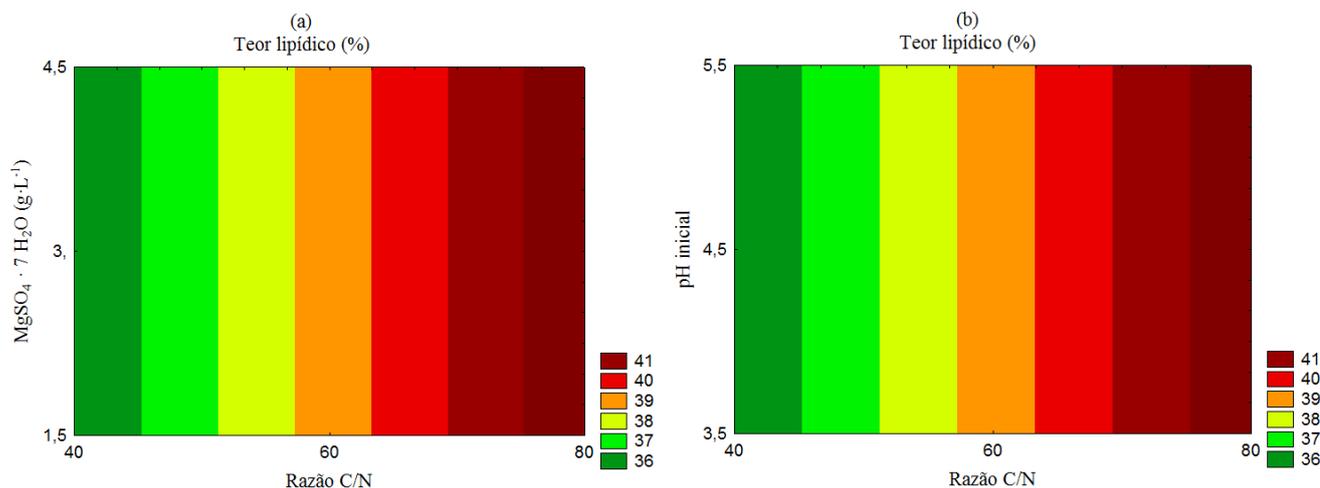
Figura 10 – Curvas de contorno para biomassa produzida a partir da glicose em função da razão C/N e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e do pH inicial e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (c).



Pela análise da Figura 10, foi possível observar que o aumento da razão C/N desfavoreceu a produção de biomassa, assim como o uso de pH inicial mais baixo. Quando a razão C/N foi aumentada do nível -1 para o nível +1 (de 40 para 80, respectivamente), houve menor produção de biomassa. Para o pH inicial, quando avaliada a elevação do nível -1 para o +1 (de 3,5 para 5,5, respectivamente), houve favorecimento da produção de biomassa, indicando que o uso do pH inicial 5,5 é a melhor escolha dentro do intervalo pesquisado. Já para a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, a mudança da menor concentração para a maior concentração (de 1,5 g·L⁻¹ para 4,5 g·L⁻¹) favoreceu a produção de biomassa.

A partir da Equação 17 foram geradas as curvas de contorno para o teor lipídico, conforme Figura 11.

Figura 11 - Curvas de contorno para o teor lipídico obtido a partir da glicose em função da razão C/N e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b).



A partir da análise da Figura 11, foi possível observar que o aumento do nível -1 para o nível +1 na razão C/N (de 40 para 80, respectivamente) favoreceu o acúmulo lipídico. Tanto a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ como o pH inicial não foram significativos (Tabela 9).

5.4.2 Xilose

Na Tabela 11 estão apresentados os fatores estudados, os níveis (reais e codificados) e os resultados para o delineamento composto central utilizando xilose como principal fonte de carbono.

A análise da Tabela 11 permitiu observar que o ensaio 7 foi aquele com a melhor produção de lipídios totais, alcançando 0,46 g·L⁻¹. O mesmo ensaio também foi aquele com maior produção de biomassa, alcançando a concentração de 5,17 g·L⁻¹. Já para o teor lipídico o ensaio 2 foi aquele com melhor resultado, alcançando 11,14 %. No entanto, o ensaio 2 foi aquele de menor produção de biomassa (1,77 g·L⁻¹), o que interferiu diretamente nos lipídios totais.

Tabela 11 - DCC 2³ (valores reais e codificados) para maximização da produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais utilizando xilose como principal fonte de carbono.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	B*	TL	LT
1	-1 (40)	-1 (1,5)	-1 (3,5)	3,00	9,01	0,27
2	+1 (80)	-1 (1,5)	-1 (3,5)	1,77	11,14	0,19
3	-1 (40)	+1 (4,5)	-1 (3,5)	2,98	10,05	0,29
4	+1 (80)	+1 (4,5)	-1 (3,5)	1,80	10,00	0,18
5	-1 (40)	-1 (1,5)	+1 (5,5)	5,10	8,42	0,43
6	+1 (80)	-1 (1,5)	+1 (5,5)	3,60	8,50	0,30
7	-1 (40)	+1 (4,5)	+1 (5,5)	5,17	9,06	0,46
8	+1 (80)	+1 (4,5)	+1 (5,5)	3,35	8,82	0,29
9	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	2,43	9,38	0,22
10	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	2,59	9,38	0,24
11	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	2,52	10,22	0,25

X₁: Razão C/N; X₂: Concentração de MgSO₄ · 7 H₂O (g·L⁻¹); X₃: pH inicial; B: Biomassa (g·L⁻¹); TL: Teor lipídico (%); LT: Lipídios totais (g·L⁻¹). Os valores entre parênteses são os valores reais e aqueles fora dos parênteses são os valores codificados. *Valores de biomassa determinados ao final das 240 h de cultivo.

Na Tabela 12 estão apresentados os efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais dos ensaios em que a xilose foi a principal fonte de carbono utilizada.

Para a biomassa produzida a partir de xilose como principal fonte de carbono, nenhuma das interações se mostraram significativas, assim como a concentração de MgSO₄ · 7 H₂O. Para a razão C/N, o aumento do nível -1 para o nível +1 (de 40 para 80, respectivamente) foi desfavorável para a produção de biomassa, reduzindo-a em 1,43 g·L⁻¹. Já para o pH inicial, o aumento do nível -1 para o +1 (de 3,5 para 5,5, respectivamente) se mostrou favorável para a biomassa, aumentando-a em 1,92 g·L⁻¹.

Para o teor lipídico nenhuma das interações se mostraram significativas (p-valor > 0,05), assim como a razão C/N e a concentração de MgSO₄ · 7 H₂O. Já para o pH inicial, o aumento do nível -1 para o nível +1 reduziu o teor lipídico em 1,35 %, conforme Tabela 12.

Para os lipídios totais nenhuma das interações se mostraram significativas, assim como a concentração de MgSO₄ · 7 H₂O. Para a razão C/N o aumento do nível -1 para o nível +1 diminuiu os lipídios totais em 0,12 g·L⁻¹. Já o pH inicial favoreceu a produção em 0,14 g·L⁻¹ ao partir do menor nível para o maior nível estudado.

Tabela 12 - Efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais obtidos no cultivo com xilose como principal fonte de carbono.

Biomassa				
Fator	Efeito (g·L ⁻¹)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X ₁ (L)*	-1,43	0,43	-3,27	0,03
X ₂ (L)	-0,04	0,43	-0,10	0,92
X ₃ (L)*	1,92	0,43	4,38	0,01
X ₁ X ₂	-0,07	0,43	-0,15	0,88
X ₁ X ₃	-0,23	0,43	-0,52	0,62
X ₂ X ₃	-0,04	0,43	-0,10	0,92
Teor lipídico				
Fator	Efeito (%)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X ₁ (L)	0,47	0,36	1,30	0,26
X ₂ (L)	0,21	0,36	0,59	0,58
X ₃ (L)*	-1,35	0,36	-3,70	0,02
X ₁ X ₂	-0,62	0,36	-1,72	0,16
X ₁ X ₃	-0,55	0,36	-1,3	0,20
X ₂ X ₃	0,26	0,36	0,72	0,72
Lipídios totais				
Fator	Efeito (g·L ⁻¹)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X ₁ (L)*	-0,12	0,03	-3,65	0,02
X ₂ (L)	0,01	0,03	0,29	0,78
X ₃ (L)*	0,14	0,03	4,12	0,01
X ₁ X ₂	-0,02	0,03	-0,72	0,51
X ₁ X ₃	-0,02	0,03	-0,77	0,48
X ₂ X ₃	< 0,01	0,03	0,13	0,90

*(p-valor < 0,05); X₁: Razão C/N; X₂: Concentração de MgSO₄ · 7 H₂O (g·L⁻¹); X₃: pH inicial; (L): linear

Na Tabela 13 estão apresentadas as análises de variância para biomassa, teor lipídico e lipídios totais para os cultivos do planejamento usando xilose como principal fonte de carbono.

Tabela 13 - Análise de variância para o DCC 2³ do cultivo utilizando xilose como principal fonte de carbono.

Biomassa					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	2	11,49	5,74	27,68	4,45
Resíduo	8	1,66	0,20		
Total	10	13,15			
Teor lipídico					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	1	3,65	3,65	10,39	5,11
Resíduo	9	3,16	0,35		
Total	10	6,81			
Lipídios totais					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	2	0,06	0,03	23,18	4,45
Resíduo	8	0,01	< 0,01		
Total	10	0,08			

A partir das análises de variância e dos coeficientes de regressão (com coeficientes de correlação de até 0,93), foi possível estabelecer as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam o comportamento das respostas biomassa (Equação 18), teor lipídico (Equação 19) e lipídios totais (Equação 20) em função das variáveis estudadas. O F_{calculado} se mostrou maior que o F_{tabelado} para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais (Tabela 13), assim como a razão F_{calculado}/F_{tabelado} foi igual a 6,22 para a biomassa, 2,03 para o teor lipídico e igual a 5,21 para os lipídios totais. Assim sendo, as Equações 18, 19 e 20 preveem bem o comportamento frente aos fatores estudados para a produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais, respectivamente.

$$\text{Biomassa (g}\cdot\text{L}^{-1}) = 3,11 - 0,71 X_1 + 0,96 X_3 \quad (18)$$

$$\text{Teor Lipídico (\%)} = 9,45 - 0,67 X_3 \quad (19)$$

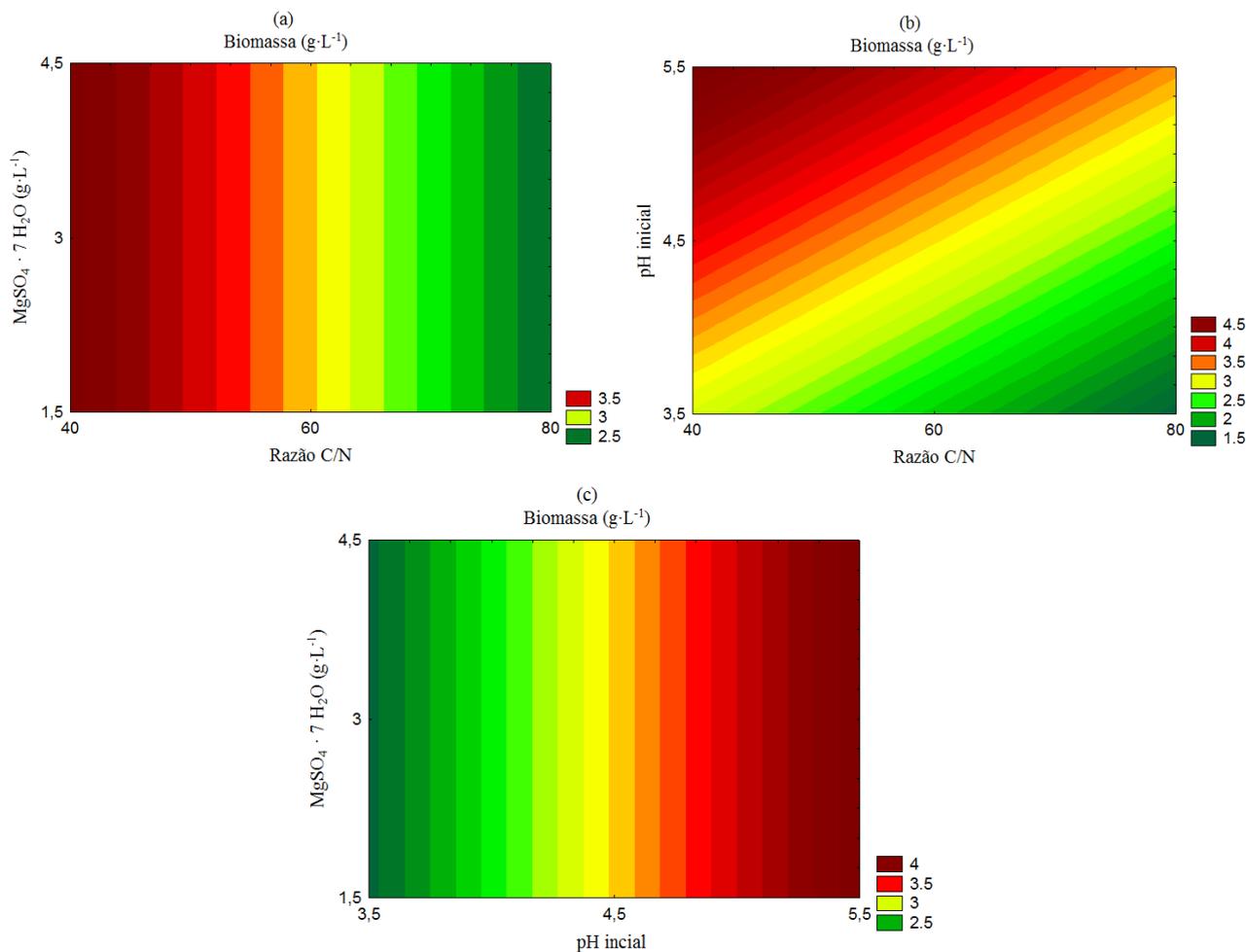
$$\text{Lipídios Totais (g}\cdot\text{L}^{-1}) = 0,28 - 0,06 X_1 + 0,07 X_3 \quad (20)$$

Onde:

X₁: Razão C/N ; X₂: Concentração de MgSO₄ · 7 H₂O (g·L⁻¹) ; X₃: pH inicial

A partir da Equação 18 foram geradas as curvas de contorno para a biomassa, conforme Figura 12.

Figura 12 – Curvas de contorno para biomassa produzida a partir da xilose em função da razão C/N e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e do pH inicial e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (c).

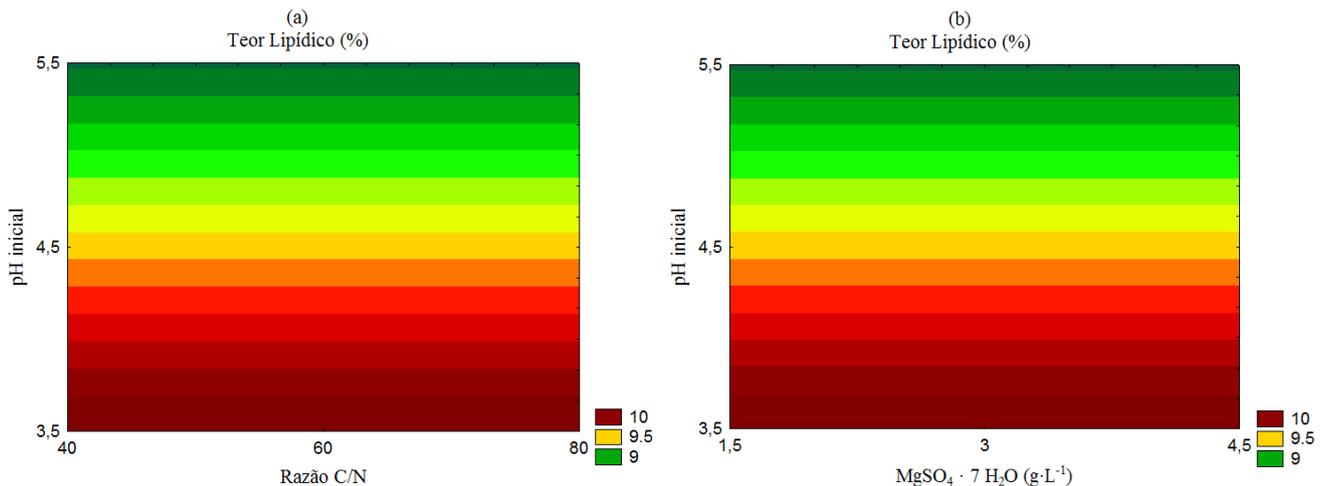


Pela análise da Figura 12, foi possível observar que quando a razão C/N foi aumentada do nível -1 para o nível +1 (de 40 para 80, respectivamente), houve menor produção de biomassa. Quando avaliado o aumento do pH inicial do nível -1 para o +1 (de 3,5 para 5,5, respectivamente), houve aumento na produção de biomassa, indicando que o uso do pH inicial 5,5 é a melhor escolha para a produção dentro do intervalo pesquisado. Essas observações para a razão C/N e para o pH inicial são idênticas àquelas determinadas para a biomassa a partir da glicose.

Não houve diferença estatística para a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ entre os níveis estudados para a biomassa produzida usando-se xilose como principal fonte de carbono.

A partir da Equação 19 foram geradas as curvas de contorno para o teor lipídico, conforme Figura 13.

Figura 13 – Curvas de contorno para o teor lipídico obtido a partir da xilose em função da razão C/N e do pH inicial (a) e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e do pH inicial (b).



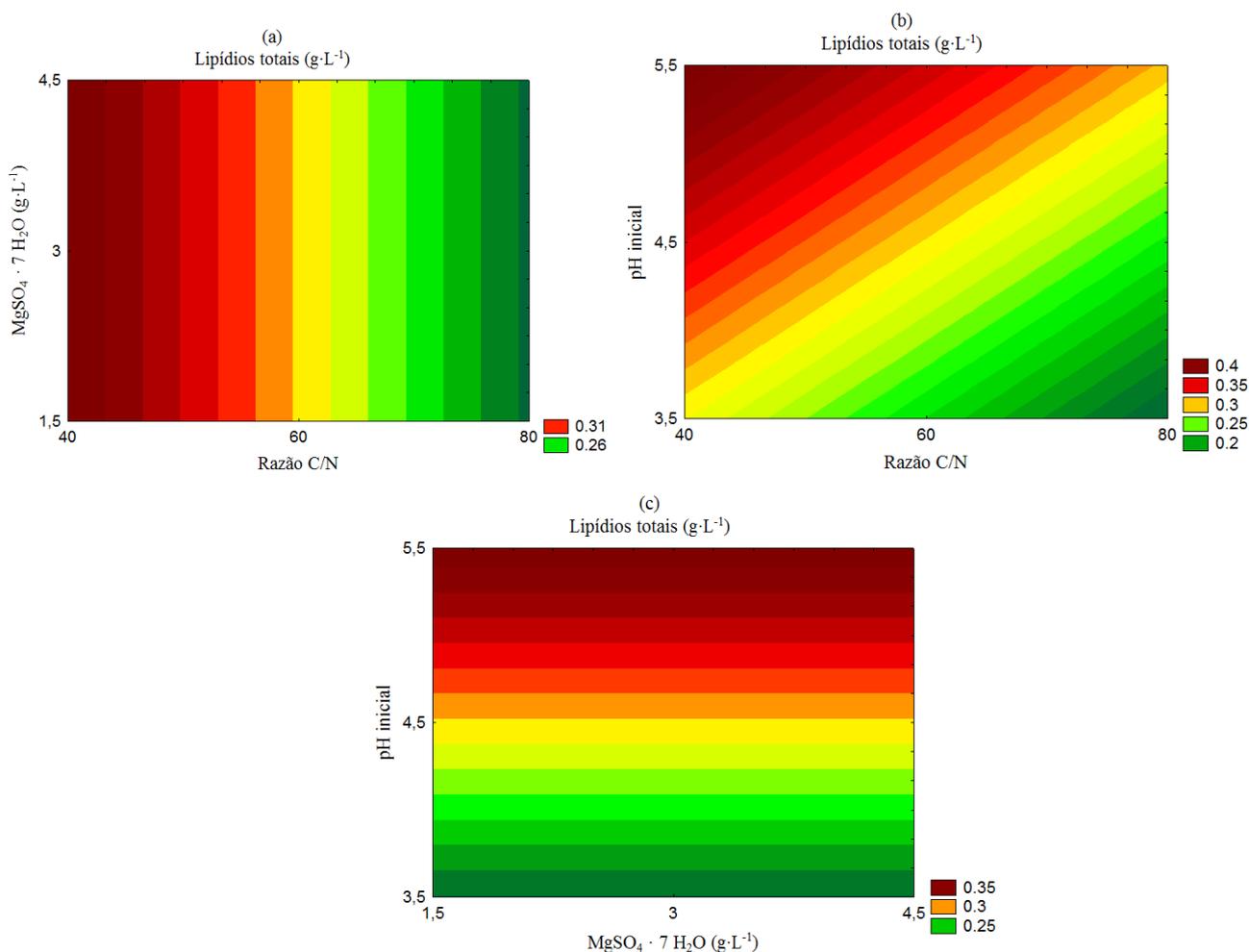
A partir da Figura 13 foi possível observar que o aumento do nível -1 para o nível +1 do pH inicial (de 3,5 para 5,5, respectivamente) desfavoreceu o teor lipídico. Assim, para a variável em questão, o pH inicial ideal dentro da faixa estudada seria 3,5. Tanto a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ como a razão C/N não foram estatisticamente significativas.

A partir da Equação 20 foram geradas as curvas de contorno para os lipídios totais, conforme Figura 14.

A partir da Figura 14 foi possível observar que o aumento do nível -1 para o nível +1 para a razão C/N (de 40 para 80, respectivamente) desfavoreceu os lipídios totais. O oposto foi observado para o pH inicial, que ao ser elevado do nível -1 para o nível +1 (de 3,5 para 5,5, respectivamente) favoreceu os lipídios totais. Essa observação para o pH inicial é semelhante àquela feita a partir dos resultados da biomassa a partir da xilose, mas oposta àquela feita a partir dos resultados do teor lipídico a partir da xilose. Isso provavelmente aconteceu pela maior proporção da biomassa produzida frente ao teor lipídico nela contido (Tabela 11), uma vez que o parâmetro lipídios totais é uma relação entre biomassa e teor lipídico (Equação 9).

A concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, assim como já observado na Tabela 12, não se mostrou estatisticamente significativa na faixa estudada para o teor lipídico acumulado quando xilose foi utilizada como principal fonte de carbono.

Figura 14 – Curvas de contorno para os lipídios totais obtidos a partir da xilose em função da razão C/N e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e do pH inicial (c).



5.4.3 Arabinose

Na Tabela 14 estão apresentados os fatores estudados, os níveis e os resultados para o delineamento composto central utilizando arabinose como principal fonte de carbono.

Após análise dos resultados apresentados na Tabela 14, observou-se que o ensaio 8 foi aquele com a melhor produção de lipídios totais, alcançando 2,24 g·L⁻¹. O mesmo ensaio foi aquele com a maior produção de biomassa, alcançando 8,19 g·L⁻¹. Já para o teor lipídico, o

ensaio 4 foi aquele com melhor resultado, com 29,58 % da biomassa produzida constituída por lipídios.

Tabela 14 - DCC 2³ (valores reais e codificados) para maximização da produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais utilizando arabinose como principal fonte de carbono.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	B*	TL	LT
1	-1 (40)	-1 (1,5)	-1 (3,5)	7,89	17,38	1,37
2	+1 (80)	-1 (1,5)	-1 (3,5)	6,99	28,63	2,00
3	-1 (40)	+1 (4,5)	-1 (3,5)	7,74	19,79	1,53
4	+1 (80)	+1 (4,5)	-1 (3,5)	7,33	29,58	2,16
5	-1 (40)	-1 (1,5)	+1 (5,5)	7,91	17,19	1,36
6	+1 (80)	-1 (1,5)	+1 (5,5)	7,98	26,30	2,10
7	-1 (40)	+1 (4,5)	+1 (5,5)	8,14	18,12	1,47
8	+1 (80)	+1 (4,5)	+1 (5,5)	8,19	27,44	2,24
9	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	7,72	23,28	1,79
10	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	7,76	23,09	1,79
11	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	7,74	23,28	1,80

X₁: Razão C/N; X₂: Concentração de MgSO₄ · 7 H₂O (g·L⁻¹); X₃: pH inicial; B: Biomassa (g·L⁻¹); TL: Teor lipídico (%); LT: Lipídios totais (g·L⁻¹). Os valores entre parênteses são os valores reais e aqueles fora dos parênteses são os valores codificados. *Valores de biomassa determinados ao final das 240 h de cultivo.

Na Tabela 15 estão apresentados os efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais.

Para a biomassa produzida a partir de arabinose como principal fonte de carbono, a razão C/N e o pH inicial se mostraram estatisticamente significativos, assim como a interação ‘C/N x pH inicial’. Enquanto esta interação e o pH inicial aumentaram a produção de biomassa após mudança do nível -1 para o nível +1 (em 0,36 g·L⁻¹ e 0,57 g·L⁻¹, respectivamente), a mesma mudança diminuiu a produção de biomassa em 0,29 g·L⁻¹ para a razão C/N.

Para o teor lipídico produzido a partir da arabinose como principal fonte de carbono, a razão C/N, concentração de MgSO₄ · 7 H₂O e o pH inicial foram estatisticamente significativos, assim como a interação ‘razão C/N x pH inicial’. Tanto esta interação como o pH inicial reduziram o teor lipídico após mudança do nível -1 para +1 (em 0,65 % e 1,57 %, respectivamente). Já a mesma mudança de nível para a razão C/N e a concentração de MgSO₄ · 7 H₂O favoreceu o teor lipídico em 9,86 % e 1,35 %, respectivamente.

Para os lipídios totais obtidos a partir da arabinose como principal fonte de carbono, a razão C/N, concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, o pH inicial assim como a interação ‘razão C/N x pH inicial’ foram estatisticamente significativos, favorecendo os lipídios totais em $0,69 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, conforme Tabela 15.

Tabela 15 - Efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais obtidos no cultivo com arabinose como principal fonte de carbono.

Biomassa				
Fator	Efeito ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X_1 (L)*	-0,29	0,06	-4,45	0,01
X_2 (L)	0,15	0,06	2,35	0,07
X_3 (L)*	0,57	0,06	8,57	< 0,01
X_1X_2	0,11	0,06	1,74	0,15
X_1X_3 *	0,36	0,06	5,40	< 0,01
X_2X_3	0,06	0,06	0,89	0,42
Teor lipídico				
Fator	Efeito (%)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X_1 (L)*	9,86	0,23	42,40	< 0,01
X_2 (L)*	1,35	0,23	5,82	< 0,01
X_3 (L)*	-1,57	0,23	-6,78	< 0,01
X_1X_2	-0,31	0,23	-1,33	0,25
X_1X_3 *	-0,65	0,23	-2,80	0,04
X_2X_3	-0,32	0,23	-1,38	0,24
Lipídios totais				
Fator	Efeito ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X_1 (L)*	0,69	0,01	76,72	< 0,01
X_2 (L)*	0,14	0,01	16,27	< 0,01
X_3 (L)*	0,03	0,01	3,11	0,03
X_1X_2	0,01	0,01	1,07	0,34
X_1X_3 *	0,06	0,01	6,83	< 0,01
X_2X_3	-0,01	0,01	-1,82	0,14

*(p-valor < 0,05); X_1 : Razão C/N; X_2 : Concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); X_3 : pH inicial; (L): linear

Na Tabela 16 estão apresentadas as análises de variância para a variável biomassa, teor lipídico e lipídios totais.

Tabela 16 - Análise de variância para o DCC 2³ do cultivo utilizando arabinose como principal fonte de carbono.

Biomassa					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	3	1,08	0,36	36,01	4,35
Resíduo	7	0,12	0,01		
Total	10	1,20			
Teor lipídico					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	4	204,28	51,07	364,8	4,53
Resíduo	6	0,83	0,14		
Total	10	205,12			
Lipídios totais					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	4	1,02	0,25	1098,01	4,53
Resíduo	6	< 0,01	< 0,01		
Total	10	1,02			

A partir das análises de variância e dos coeficientes de regressão (com coeficientes de correlação de entre 0,95 e 0,99), foi possível estabelecer as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam o comportamento das respostas biomassa (Equação 21), teor lipídico (Equação 22) e lipídios totais (Equação 23) em função das variáveis. O F_{calculado} se mostrou maior que o F_{tabelado} para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais (Tabela 17), assim como a razão F_{calculado}/F_{tabelado} foi igual a 8,28 para a biomassa, 80,53 para o teor lipídico e 242,38 para os lipídios totais. Além disso, os desvios entre os resultados experimentais e os preditos pelos modelos foram inferiores a 15 % (RODRIGUES e IEMMA, 2014). Assim sendo, as Equações 21, 22 e 23 preveem bem o comportamento frente aos fatores estudados para a produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais, respectivamente.

$$\text{Biomassa (g}\cdot\text{L}^{-1}\text{)} = 7,76 - 0,15 X_1 + 0,28 X_3 + 0,18 X_1X_3 \quad (21)$$

$$\text{Teor Lipídico (\%)} = 23,10 + 4,93 X_1 + 0,67 X_2 - 0,79 X_3 - 0,32 X_1 X_3 \quad (22)$$

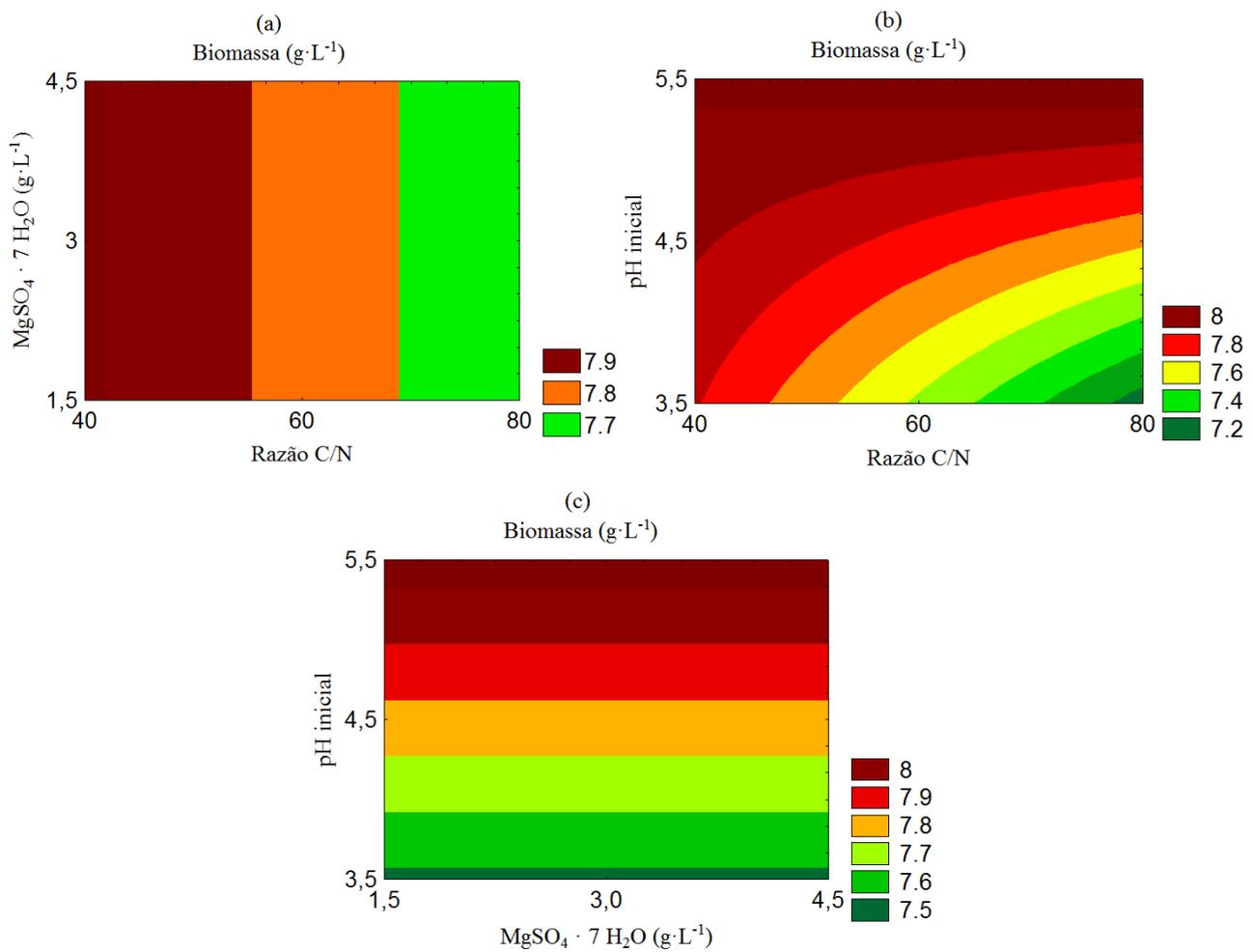
$$\text{Lipídios Totais (g}\cdot\text{L}^{-1}\text{)} = 1,78 + 0,34 X_1 + 0,07 X_2 + 0,01 X_3 + 0,03 X_1 X_3 \quad (23)$$

Onde:

X_1 : Razão C/N; X_2 : Concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); X_3 : pH inicial

A partir da Equação 21 foram geradas as curvas de contorno para a biomassa, conforme Figura 15.

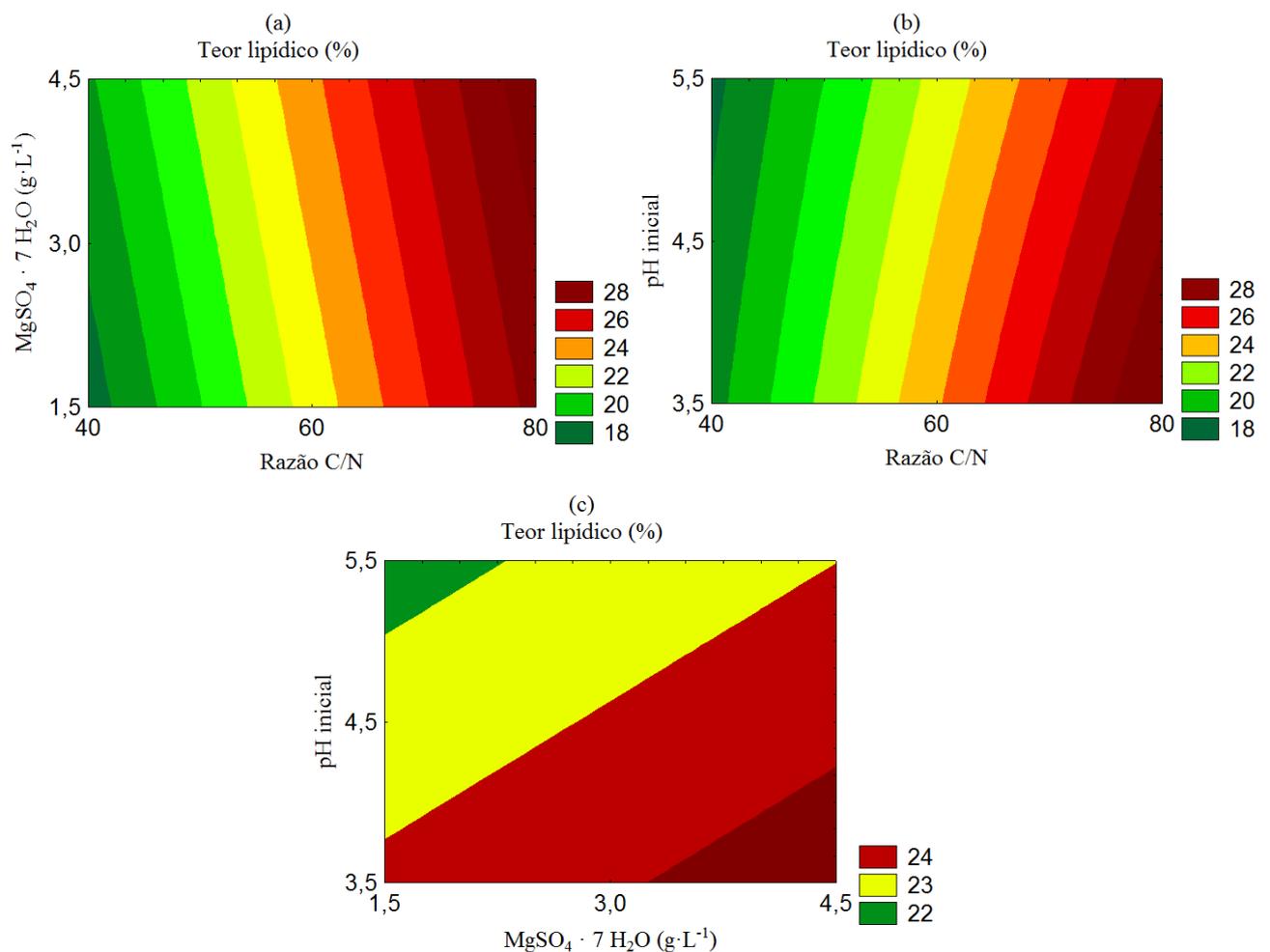
Figura 15 – Curvas de contorno para biomassa produzida a partir da arabinose em função da razão C/N e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e do pH inicial (c).



Pela análise da Figura 15 foi possível observar que, para a razão C/N, o aumento do nível -1 para o nível +1 desfavoreceu a produção de biomassa, sendo o menor nível (com razão C/N = 40) o melhor entre aqueles estudados. Para o pH inicial foi possível observar que a mudança do nível -1 para o +1 favoreceu a produção de biomassa, sendo o maior nível (com pH inicial = 5,5) o melhor entre aqueles estudados. Para a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a mudança do menor nível para o maior nível não foi estatisticamente significativa para os níveis estudados.

A partir da Equação 22 foram geradas as curvas de contorno para o teor lipídico, conforme Figura 16.

Figura 16 – Curvas de contorno para o teor lipídico obtido a partir da arabinose em função da razão C/N e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (a), da razão C/N e pH inicial (b) e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e do pH inicial (c).

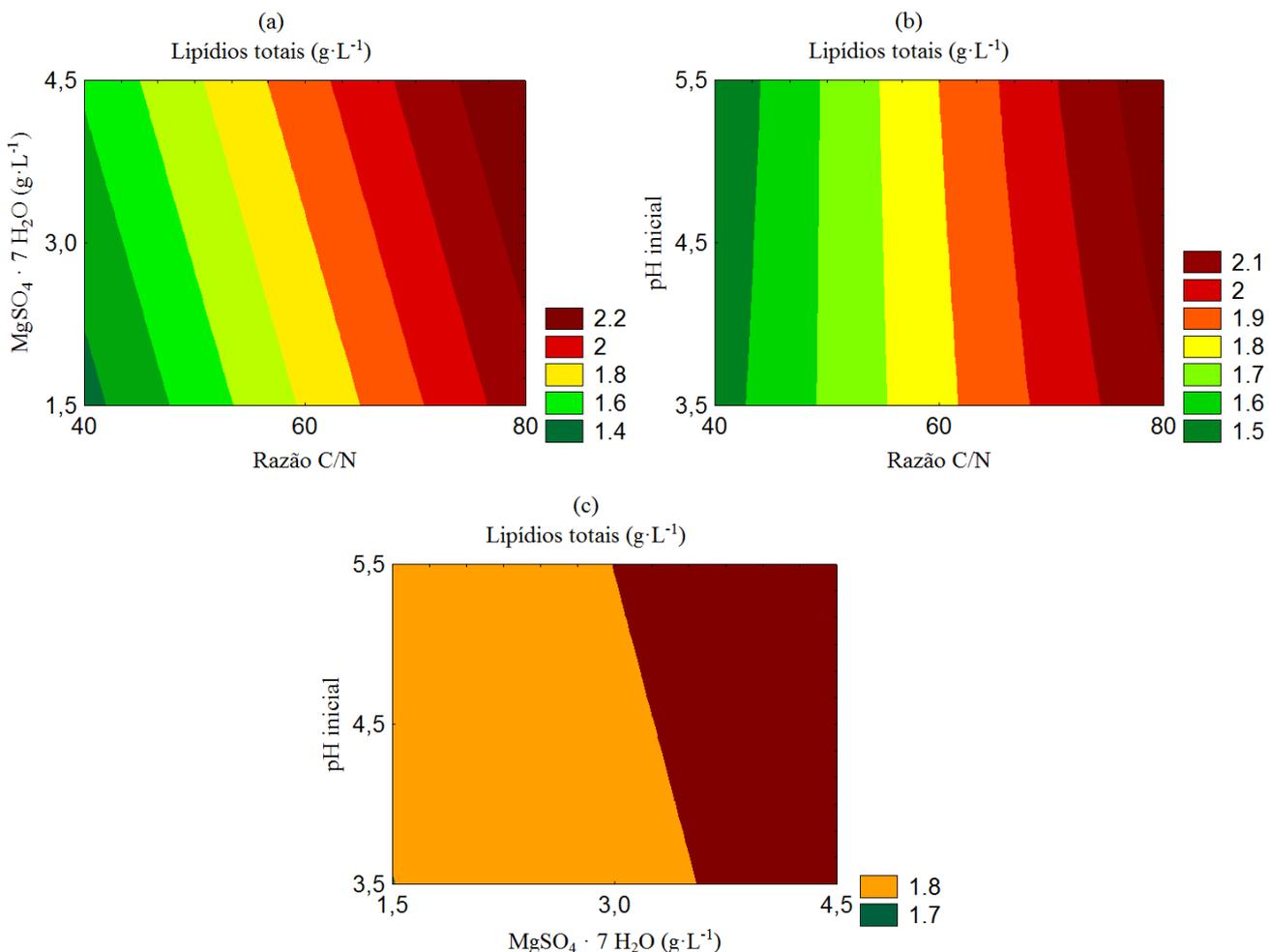


Pela análise da Figura 16 foi possível observar que, para a razão C/N, o aumento do menor nível para o maior nível favoreceu o teor lipídico, sendo o maior nível (com razão C/N

= 80) o melhor entre aqueles estudados. Para o pH inicial a mesma mudança de nível desfavoreceu o teor lipídico, sendo o pH inicial igual a 3,5 aquele com melhores resultados entre os níveis estudados. Para a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a mudança do menor nível para o maior nível favoreceu a produção de biomassa, sendo o maior nível (com concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} = 4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) aquele que apresentou os melhores resultados entre os níveis estudados para o teor lipídico.

A partir da Equação 23 foram geradas as curvas de contorno para os lipídios totais, conforme Figura 17.

Figura 17 – Curvas de contorno para os lipídios totais obtidos a partir da arabinose em função da razão C/N e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e do pH inicial (c).



Pela análise da Figura 17 foi possível observar que, para a razão C/N, o aumento do menor nível para o maior nível favoreceu os lipídios totais, sendo o maior nível (com razão C/N = 80) o melhor entre aqueles estudados. Para o pH inicial a mesma mudança de nível

também favoreceu os lipídios totais, sendo o pH inicial igual a 5,5 aquele com melhores resultados entre os níveis estudados. Para a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, a mudança do menor nível para o maior nível favoreceu a produção dos lipídios totais, sendo o maior nível (com concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} = 4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) aquele que apresentou os melhores resultados entre os níveis estudados.

5.4.4 Comparação de resultados

Com o objetivo de analisar os resultados dos planejamentos para os carboidratos estudados e tomar decisões para o planejamento sobre o HCS, elaborou-se a Tabela 17. Nesta foram analisados os efeitos quando os fatores foram variados do nível -1 para o nível +1. Os fatores foram rotulados como “favoreceu” ou “desfavoreceu” dependendo do efeito que a mudança de nível causou nas respectivas respostas. Os campos rotulados como “não significante” indicaram que, para aquela determinada resposta e para o respectivo fator nas faixas estudadas, os efeitos não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Tabela 17 – Comparação dos resultados dos planejamentos experimentais para os fatores razão C/N (X_1), concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (X_2) e pH inicial (X_3) estudados com diferentes carboidratos.

Carboidrato	Resposta	Fatores		
		X_1	X_2	X_3
Glicose	Biomassa	Desfavoreceu	Favoreceu	Favoreceu
	Teor lipídico	Favoreceu	Não significante	Não significante
	Lipídios totais	Não significante	Não significante	Não significante
Xilose	Biomassa	Desfavoreceu	Não significante	Favoreceu
	Teor lipídico	Não significante	Não significante	Desfavoreceu
	Lipídios totais	Desfavoreceu	Não significante	Favoreceu
Arabinose	Biomassa	Desfavoreceu	Não significante	Favoreceu
	Teor lipídico	Favoreceu	Favoreceu	Desfavoreceu
	Lipídios totais	Favoreceu	Favoreceu	Favoreceu

Os lipídios totais, determinados através da relação entre a biomassa e o teor lipídico nela contido (Equação 9), tiveram diferentes resultados para os diferentes carboidratos, conforme Tabela 17. Enquanto o aumento de nível para a razão C/N no planejamento da

glicose foi estatisticamente não significativa, para a xilose o mesmo aumento desfavoreceu a produção dos lipídios totais e para a arabinose houve favorecimento. A concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ foi significativa e favorável para os lipídios totais apenas para a mudança de nível estudada no planejamento experimental da arabinose, se mostrando estatisticamente não significativa para os demais carboidratos. Já o pH inicial se mostrou favorável aos lipídios totais para a mudança de nível estudada, tanto nos planejamentos da xilose quanto na arabinose, sendo ainda estatisticamente não significativa para o planejamento envolvendo a glicose.

Essas divergências podem ser em parte explicadas pela complexidade do metabolismo celular de *R. mucilaginosa* CCT 7688, que assimila de formas diferentes cada carboidrato, conforme observado através dos resultados dos cultivos preliminares (item 5.3.1 e 5.3.2), e especialmente dos planejamentos experimentais para cada carboidrato (item 5.4). Nestes planejamentos foi possível observar que, ao modificar o meio e as condições de cultivo, alterações metabólicas foram promovidas e influenciaram fortemente nos resultados.

Para a glicose, comparando-se os resultados do cultivo preliminar (Tabela 6) e a melhor condição obtida no planejamento experimental (Tabela 8), a produção de biomassa reduziu de $11,34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $9,69 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. No entanto, o teor lipídico aumentou de 32,26 % para 42,89 %, levando os lipídios totais a aumentarem de $3,67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $4,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Isso indicou que, para a glicose, os incrementos nos lipídios totais estão mais relacionados ao teor lipídico do que à biomassa. De um cultivo para o outro a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ foi mantida em $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, assim como o pH foi mantido em 5,5 e a razão C/N elevada de 40 para 80.

Para a xilose, comparando-se os resultados do cultivo preliminar (Tabela 6) e a melhor condição obtida no planejamento experimental (Tabela 11), a produção de biomassa aumentou de $4,07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $5,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, assim como o teor lipídico aumentou de 3,49 % para 9,06 %, levando os lipídios totais a um aumento de $0,14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $0,46 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Isso indicou que, para a xilose, os incrementos nos lipídios totais estão mais relacionados ao teor lipídico (com aumento de cerca de 61 %) do que à biomassa (com um aumento de cerca de 21 %). De um cultivo para o outro a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ foi elevada de $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, o pH mantido em 5,5 e a razão C/N mantida em 40.

Para a arabinose, comparando-se os resultados do cultivo preliminar (Tabela 6) e a melhor condição obtida no planejamento experimental (Tabela 14), a produção de biomassa saltou de $2,36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $8,19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, assim como o teor lipídico saltou de 2,57 % para 27,44 % levando os lipídios totais a um salto de $0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $2,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Isso indicou que, para a

arabinose, os incrementos nos lipídios totais estão relacionados tanto ao teor lipídico (com aumento de cerca de 90 %) quanto à biomassa (com um aumento de cerca de 71 %). De um cultivo para o outro a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ foi elevada de $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, o pH mantido em 5,5 e a razão C/N elevada de 40 para 80.

Com base nas comparações realizadas e nas divergências de resultados para os diferentes carboidratos estudados, decidiu-se estudar os mesmos fatores e níveis utilizando o HCS como principal fonte de carbono, visto que cada um dos três fatores estudados poderia atuar de formas diferentes na mistura complexa de carboidratos existente no HCS.

5.4.5 HCS concentrado

Na Tabela 18 estão apresentados os fatores estudados, os níveis e os resultados para o delineamento composto central utilizando o HCS concentrado como principal fonte de carbono.

Tabela 18 - DCC 2³ (valores reais e codificados) para maximização da produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais utilizando HCS concentrado como principal fonte de carbono.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	B*	TL	LT
1	-1 (40)	-1 (1,5)	-1 (3,5)	8,22	7,24	0,59
2	+1 (80)	-1 (1,5)	-1 (3,5)	7,26	19,41	1,41
3	-1 (40)	+1 (4,5)	-1 (3,5)	8,06	11,47	0,92
4	+1 (80)	+1 (4,5)	-1 (3,5)	7,62	15,51	1,18
5	-1 (40)	-1 (1,5)	+1 (5,5)	8,24	7,71	0,63
6	+1 (80)	-1 (1,5)	+1 (5,5)	8,32	13,58	1,13
7	-1 (40)	+1 (4,5)	+1 (5,5)	8,49	9,29	0,78
8	+1 (80)	+1 (4,5)	+1 (5,5)	8,54	11,42	0,97
9	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	8,04	9,34	0,75
10	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	8,09	9,71	0,78
11	0 (60)	0 (3,0)	0 (4,5)	8,06	9,42	0,76

X₁: Razão C/N; X₂: Concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); X₃: pH inicial; B: Biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); TL: Teor lipídico (%); LT: Lipídios totais ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Os valores entre parênteses são os valores reais e aqueles fora dos parênteses são os valores codificados. *Valores de biomassa determinados ao final das 240 h de cultivo.

Após análise dos resultados apresentados na Tabela 18, observou-se que o ensaio 2 foi aquele com a melhor produção de lipídios totais, alcançando $1,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O mesmo ensaio foi

aquele com o maior teor lipídico, representando 19,41 % da biomassa seca produzida. Já para a biomassa o ensaio 7 foi aquele com maior produção de biomassa, alcançando 8,49 g·L⁻¹.

Na Tabela 19 estão apresentados os efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais para o HCS concentrado como principal fonte de carbono.

Tabela 19 - Efeitos estimados, erros padrão, t-valores e p-valores para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais obtidos no cultivo com HCS concentrado como principal fonte de carbono.

Biomassa				
Fator	Efeito (g·L ⁻¹)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X ₁ (L)*	-0,31	0,07	-4,44	0,01
X ₂ (L)	0,17	0,07	2,36	0,07
X ₃ (L)*	0,60	0,07	8,58	< 0,01
X ₁ X ₂	0,12	0,07	1,73	0,15
X ₁ X ₃ *	0,38	0,07	5,39	< 0,01
X ₂ X ₃	0,06	0,07	0,91	0,41
Teor lipídico				
Fator	Efeito (%)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X ₁ (L)*	6,05	1,40	4,31	0,01
X ₂ (L)	-0,06	1,40	-0,04	0,96
X ₃ (L)	-2,90	1,40	-2,07	0,10
X ₁ X ₂	-2,97	1,40	-2,11	0,10
X ₁ X ₃	-2,05	1,40	-1,46	0,21
X ₂ X ₃	-0,23	1,40	-0,16	0,87
Lipídios totais				
Fator	Efeito (g·L ⁻¹)	Erro padrão	t (4)	p-valor
X ₁ (L)*	0,44	0,104	4,19	0,01
X ₂ (L)	0,02	0,104	0,24	0,82
X ₃ (L)	-0,15	0,104	-1,39	0,23
X ₁ X ₂	-0,21	0,104	-2,06	0,10
X ₁ X ₃	-0,10	0,104	-0,93	0,40
X ₂ X ₃	-0,26	0,104	-0,25	0,81

*(p-valor < 0,05); X₁: Razão C/N; X₂: Concentração de MgSO₄ · 7 H₂O (g·L⁻¹); X₃: pH inicial; (L): linear

Para a biomassa produzida a partir do HCS concentrado como principal fonte de carbono, se mostraram significativos a razão C/N, pH inicial e a interação entre eles. Com o aumento do nível -1 para o nível +1 a razão C/N desfavoreceu a produção de biomassa em $0,31 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto que para a mesma mudança de nível o pH inicial favoreceu a produção de biomassa em $0,60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Já a interação ‘razão C/N x pH inicial’ foi responsável pelo aumento de $0,38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ na produção de biomassa.

Para o teor lipídico produzido a partir do HCS concentrado como principal fonte de carbono, a razão C/N foi o único fator que se mostrou estatisticamente significativo dentro da faixa estudada, favorecendo o teor lipídico em 6,05 %.

Para os lipídios totais obtidos a partir do HCS concentrado como principal fonte de carbono, a razão C/N se mostrou como o único fator estatisticamente significativo dentro da faixa estudada, favorecendo os lipídios totais em $0,44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Quando comparados os resultados obtidos entre o cultivo preliminar com o HCS concentrado (item 5.3.2) e os resultados obtidos a partir do melhor ensaio (ensaio 2 – Tabela 18) sob as respectivas condições para o presente planejamento com o HCS concentrado, foi possível observar que houve redução da produção de biomassa, de $9,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $7,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. No entanto, houve expressivo aumento no teor lipídico, variando de 5,30 % para 19,41 %. Conseqüentemente, houve aumento dos lipídios totais, aumentando de $0,48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $1,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ entre o cultivo preliminar e a melhor condição desse presente planejamento. Isso indicou que, para o HCS concentrado, os incrementos nos lipídios totais estão mais relacionados ao teor lipídico (aumento de cerca de 72 %) do que à biomassa (redução de cerca de 20 %). De um cultivo para o outro a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ foi mantida em $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, o pH inicial reduzido de 5,5 para 3,5 e a razão C/N elevada de cerca de 50 (Apêndice 5) para 80.

Enshaieh et al. (2015), após estudarem a influência de alguns parâmetros na acumulação lipídica da *R. mucilaginosa* (cepa sem identificação), dentre eles o pH e a razão C/N, concluíram que uma elevada razão C/N foi favorável à produção de lipídios. Ao testarem um pH inicial igual a 6,5 e uma razão C/N 75, obtiveram em meio composto por hidrolisado de palha de trigo $15,88 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa com teor de 41,81 % de lipídios, alcançado $6,64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais. Já Silva et al. (2018) cultivando com *R. mucilaginosa* CCT 7688, testaram um meio composto por diferentes concentrações de manipueira com razão C/N 8 e também testaram um meio sintético com razão C/N 50 composto por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):

(40) glicose, (8,0) KH_2PO_4 , (0,5) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e (3,0) extrato de levedura. Foram obtidos $4,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por 13,33 % com meio formado por manipueira 50 % e $9,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por 41,92 % de lipídios quando utilizado o meio sintético. Esses são dados que evidenciam a importância da razão C/N na produção de lipídios.

Na Tabela 20 estão apresentadas as análises de variância para a variável biomassa, teor lipídico e lipídios totais para o planejamento utilizando o HCS concentrado como principal fonte de carbono.

Tabela 20 – Análise de variância para o DCC 2³ do cultivo utilizando HCS concentrado como principal fonte de carbono.

Biomassa					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	3	1,23	0,41	20,5	4,35
Resíduo	7	0,13	0,02		
Total	10	1,36			
Teor lipídico					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	1	73,37	73,37	11,23	5,21
Resíduo	9	58,81	6,53		
Total	10	132,18			
Lipídios totais					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	1	0,38	0,38	14,16	5,21
Resíduo	9	0,24	0,02		
Total	10	0,63			

A partir das análises de variância e dos coeficientes de regressão (com coeficientes de correlação de até 0,95), foi possível estabelecer as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam o comportamento das respostas biomassa (Equação 24), teor lipídico (Equação 25) e lipídios totais (Equação 26) em função das variáveis. O $F_{\text{calculado}}$ se mostrou maior que o F_{tabelado} para a biomassa, teor lipídico e lipídios totais (Tabela 20), assim como a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi igual a 4,71 para a biomassa, 2,15 para o teor lipídico e 2,71 para os lipídios totais. Assim sendo, as Equações 24, 25 e 26 preveem bem o comportamento frente aos fatores estudados para a produção de biomassa, teor lipídico e lipídios totais, respectivamente.

$$\text{Biomassa (g}\cdot\text{L}^{-1}) = 8,09 - 0,15 X_1 + 0,30 X_3 + 0,19 X_1 X_3 \quad (24)$$

$$\text{Teor Lipídico (\%)} = 11,28 + 3,03 X_1 \quad (25)$$

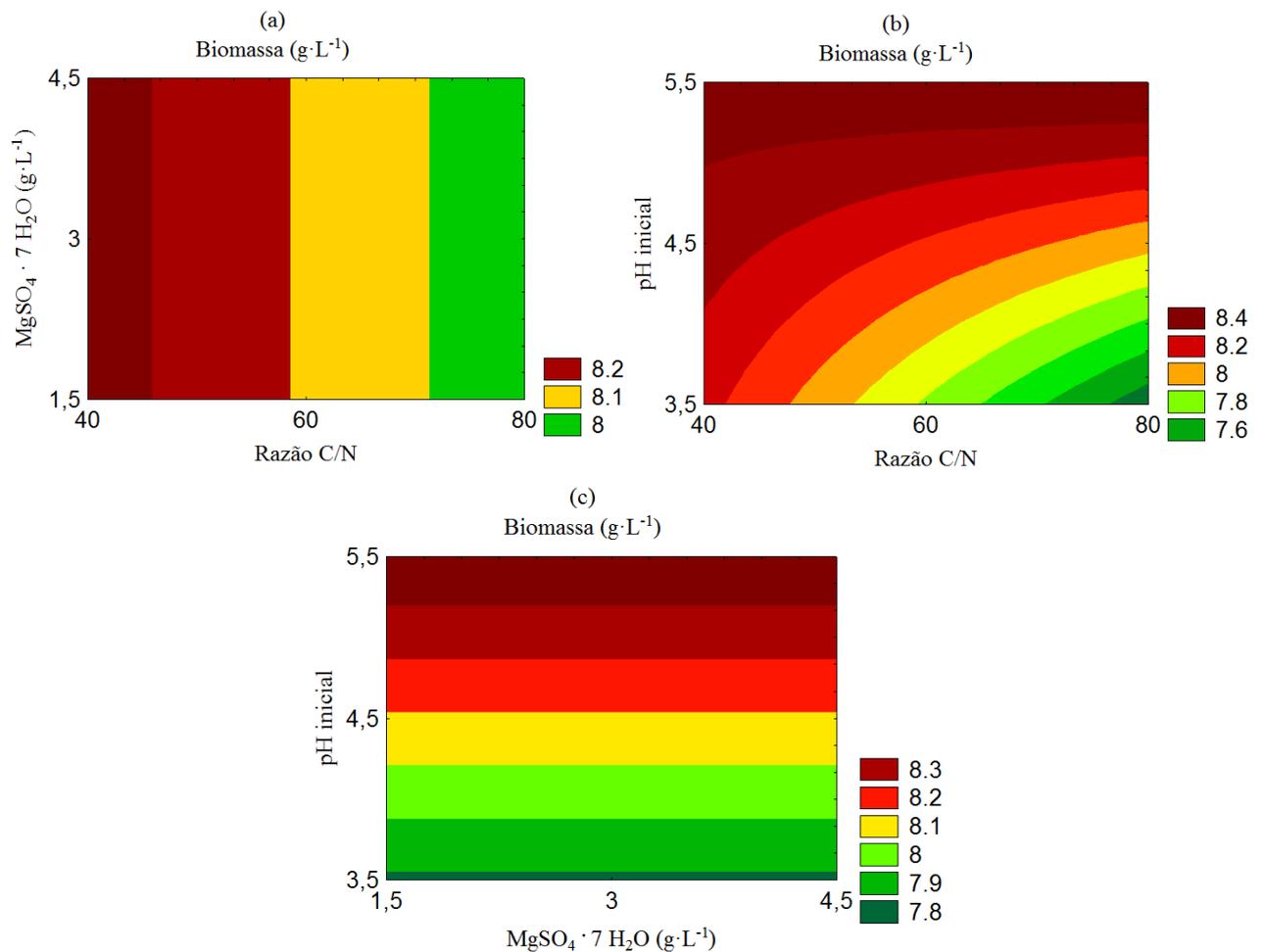
$$\text{Lipídios Totais (g}\cdot\text{L}^{-1}) = 0,90 + 0,22 X_1 \quad (26)$$

Onde:

X_1 : Razão C/N; X_2 : Concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); X_3 : pH inicial

A partir da Equação 24 foram geradas as curvas de contorno para a biomassa, conforme Figura 18.

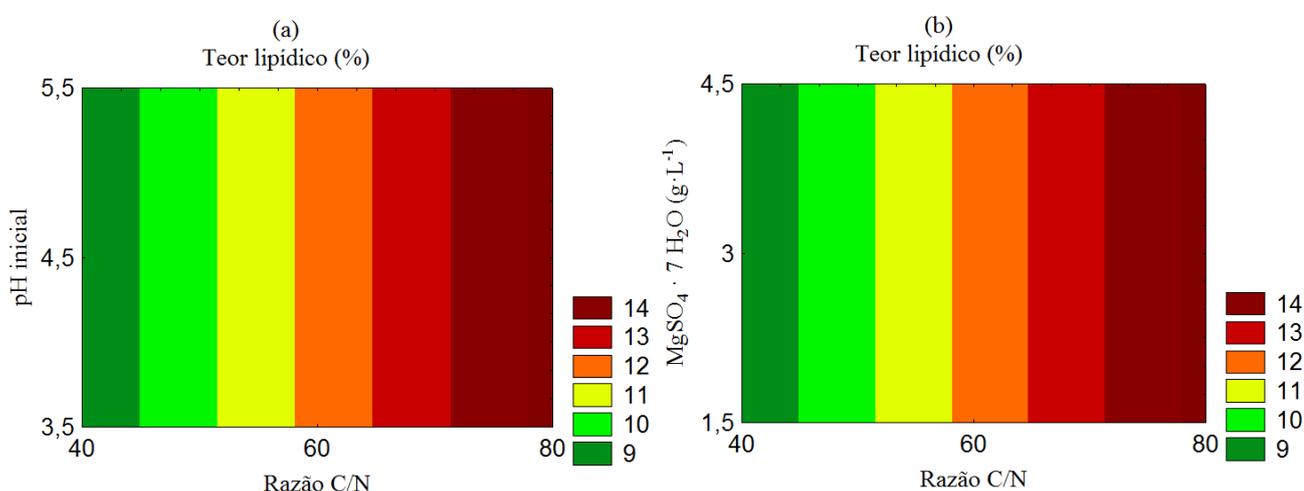
Figura 18 – Curvas de contorno para biomassa produzida a partir do HCS concentrado em função da razão C/N e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (a), da razão C/N e do pH inicial (b) e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e do pH inicial (c).



Pela análise da Figura 18 foi possível observar que, para a razão C/N, o aumento do nível -1 para o nível +1 desfavoreceu a produção de biomassa, sendo o menor nível (com razão C/N = 40) o melhor entre aqueles estudados. Para o pH inicial a mudança do nível -1 para o +1 favoreceu a produção de biomassa, sendo o maior nível (com pH inicial = 5,5) o melhor entre aqueles estudados. Para a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a mudança do menor nível para o maior nível não foi estatisticamente significativa para os níveis estudados.

A partir da Equação 25 foram geradas as curvas de contorno para o teor lipídico, conforme Figura 19.

Figura 19 – Curvas de contorno para o teor lipídico obtido a partir do HCS concentrado em função da razão C/N e pH inicial (a) e da razão C/N e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (b).

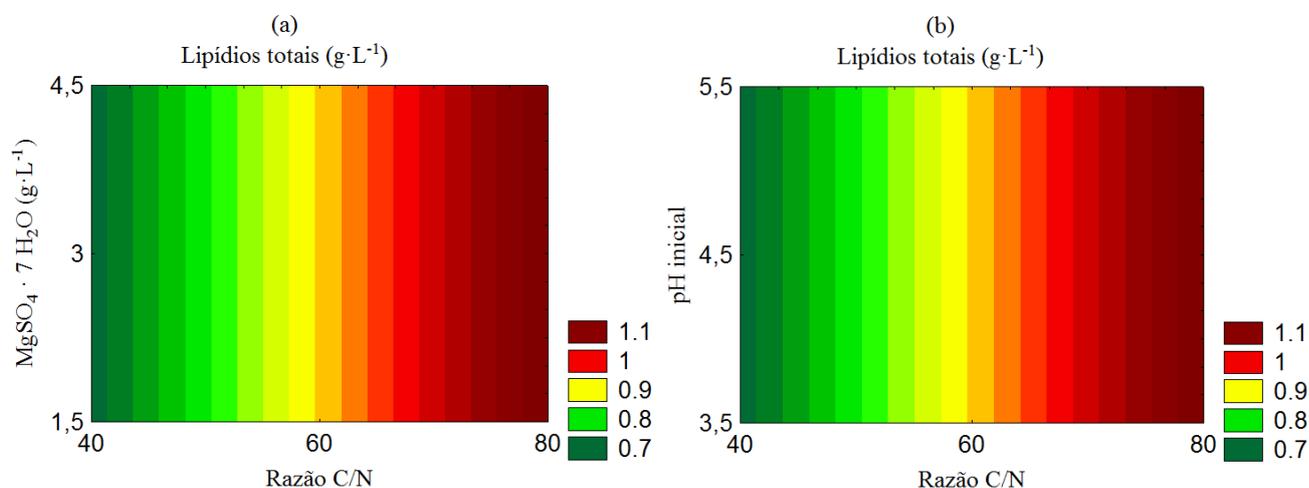


Pela análise da Figura 19 foi possível observar que, para a razão C/N, o aumento do menor nível para o maior nível favoreceu o teor lipídico, sendo o maior nível (com razão C/N = 80) o melhor entre aqueles estudados. Para o pH inicial e para a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, a mesma mudança de nível não foi estatisticamente significativa para os níveis estudados.

A partir da Equação 26 foram geradas as curvas de contorno para os lipídios totais, conforme Figura 20.

Pela análise da Figura 20 foi possível observar que, para a razão C/N, o aumento do menor nível para o maior nível favoreceu os lipídios totais, sendo o maior nível (com razão C/N = 80) o melhor entre aqueles estudados. Para o pH inicial e para a concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a mesma mudança de nível não foi estatisticamente significativa para os níveis estudados.

Figura 20 - Curvas de contorno para lipídios totais obtidos a partir do HCS concentrado em função da razão C/N e da concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (a) e da razão C/N e do pH inicial (b).



5.4.5.1 Validação

As condições determinadas para o ensaio 2 (Tabela 18) foram reproduzidas em triplicata como forma de validar os modelos representados pelas Equações 24, 25 e 26. Os resultados estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Triplicata onde foram reproduzidas as condições do ensaio de melhor resultado no planejamento para o HCS concentrado como principal fonte de carbono.

Ensaio	B	B _P	DR _B	TL	TL _P	DR _{TL}	LT	LT _P	DR _{LT}
1	7,08	7,45	-5,23	19,12	14,31	25,16	1,35	1,12	17,04
2	7,12	7,45	-4,63	18,76	14,31	23,72	1,33	1,12	15,79
3	7,18	7,45	-3,76	18,60	14,31	23,06	1,33	1,12	15,79

B: Biomassa (g·L⁻¹); B_P: Biomassa prevista pelo modelo (g·L⁻¹); DR_B: Desvio relativo para a biomassa (%); TL: Teor lipídico (%); TL_P: Teor lipídico previsto pelo modelo (%); DR_{TL}: Desvio relativo para o teor lipídico (%); LT: Lipídios totais (g·L⁻¹); LT_P: Lipídios totais previstos pelo modelo (g·L⁻¹); DR_{LT}: Desvio relativo para os lipídios totais (%). n = 3.

Para a biomassa houve uma produção média de aproximadamente 7,13 g·L⁻¹, o que foi, em média, 4,54 % menos do que o previsto pelo modelo (Equação 24). Na biomassa produzida houve um acúmulo médio de lipídios de aproximadamente 18,83 %, sendo este teor aproximadamente 23,98 %, em média, superior ao valor previsto pelo modelo (Equação 25).

Já a produção dos lipídios totais foi em média $1,33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, o que representou uma produção aproximadamente 16,20 %, em média, maior do que aquela prevista pelo modelo (Equação 26).

A razão C/N em vários estudos se mostra como fundamental na participação da estratégia de acúmulo de lipídios intracelulares (ENSHAIEH et al., 2015; SILVA et al., 2018), corroborando com os resultados alcançados para o HCS concentrado utilizado neste presente trabalho, pois este teve a maior produção de lipídios totais quando a razão C/N foi a maior estudada (C/N = 80). Já para o pH inicial, o HCS concentrado foi o único (dentre as demais fontes de carbono estudadas) em que o pH 3,5 se mostrou o mais favorável na produção de lipídios. A explicação pode estar na análise de estudos prévios. Quando cultivado apenas HCS concentrado, sem nenhuma suplementação, o pH inicial de 5,5 se elevou a 7 em menos de 24 h, o que se mostrou desfavorável à *R. mucilaginosa* CCT 7688 (dados não publicados), visto que em todos os cultivos esta levedura mostrou melhor desempenho em pH abaixo de 6. Quando o HCS concentrado foi suplementado com os sais do meio Evans e Ratledge (1983), eles possibilitaram um efeito-tampão que controlou o pH (controle este inexistente para o HCS concentrado não suplementado). Sendo assim, possivelmente o pH inicial 3,5 se destacou no planejamento juntamente com a alta razão C/N por permitir que o *R. mucilaginosa* CCT 7688 atuasse em pH ácido, favorecendo assim a síntese lipídica.

O acompanhamento cinético dos melhores ensaios para cada um dos planejamentos experimentais está apresentado no Apêndice 6.

5.5 TESTES DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS

Após execução dos planejamentos foi possível compreender que *R. mucilaginosa* CCT 7688 apresentou maior facilidade em assimilar a glicose dentre as demais fontes de carbono estudadas. A facilidade de consumo da principal fonte de carbono nos planejamentos em ordem crescente, medida através da produção de biomassa, foi: glicose > arabinose > HCS concentrado > xilose. Foi possível ainda avaliar que, dentre as fontes de carbono utilizadas nos planejamentos, a glicose foi aquela que possibilitou maior teor lipídico (40,71 %), enquanto que a xilose foi aquela que possibilitou o menor (9,06 %). Além disso, foi possível observar também que os incrementos nos lipídios totais estiveram mais relacionados com o aumento do teor lipídico do que da biomassa propriamente dita.

Com o objetivo de verificar diferentes estratégias para o aumento da produção de lipídios a partir do HCS, foram realizados os cultivos propostos na Tabela 22. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

As estratégias BA 1, BA 2, BA 3 e BA 4 foram elaboradas e conduzidas conforme item 4.9. Já a estratégia BS 1 consistiu nos valores médios determinados para a melhor condição alcançada e validada para o planejamento envolvendo o HCS concentrado (item 5.4.5.1).

Tabela 22 – Estratégias de cultivo e respectivos resultados para a produção de lipídios a partir do HCS.

Estratégia	Fonte de carbono inicial (g·L ⁻¹)	Fonte de carbono secundária (g·L ⁻¹)	B	TL	LT
BA 1	Glicose 15	HCS 15 ⁽¹⁾	6,75 ^d ± 0,06	12,55 ^c ± 0,13	0,84 ^d ± 0,01
BA 2	Glicose 10	HCS 20 ⁽¹⁾	6,26 ^e ± 0,03	10,27 ^d ± 0,29	0,64 ^e ± 0,01
BA 3	HCS 15 ⁽¹⁾	Glicose 15	9,92 ^b ± 0,03	19,31 ^b ± 0,18	1,91 ^b ± 0,02
BA 4	HCS 20 ⁽¹⁾	Glicose 10	11,92 ^a ± 0,02	29,28 ^a ± 0,13	3,49 ^a ± 0,01
BS 1	HCS 30 ⁽¹⁾⁽²⁾	-	7,12 ^c ± 0,05	18,82 ^b ± 0,26	1,33 ^c ± 0,01

⁽¹⁾ Concentração em termos de açúcares redutores. ⁽²⁾ Valor médio das determinações dos valores na Tabela 22.

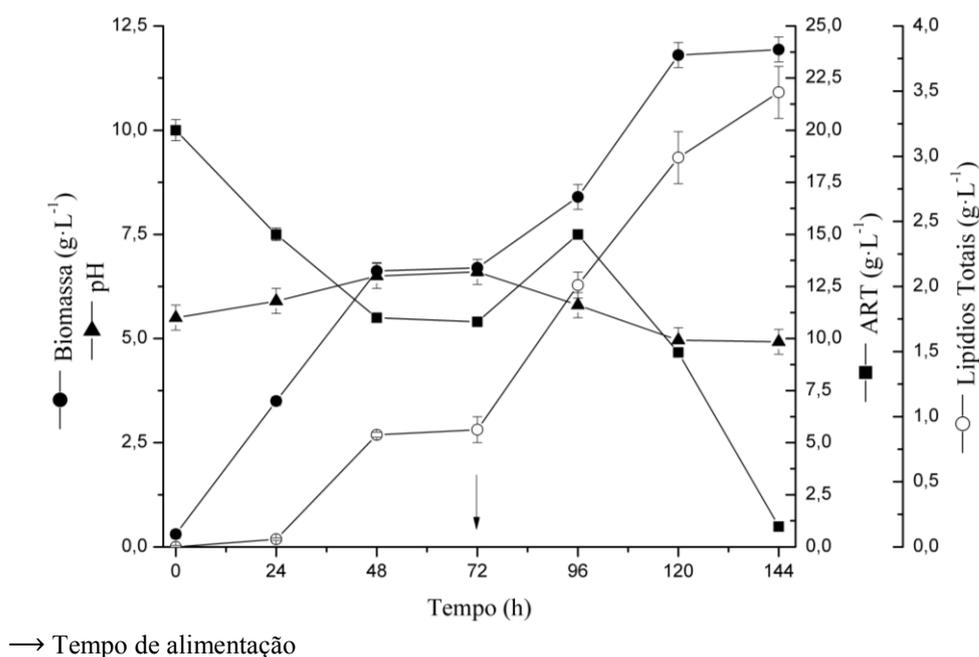
BA: Batelada alimentada; BS: Batelada simples; B: Biomassa (g·L⁻¹); TL: Teor lipídico (%); LT: Lipídios totais (g·L⁻¹). n = 3.

Conforme Tabela 22, a estratégia BA 4 foi estatisticamente a melhor para os três parâmetros avaliados. Se comparados com os resultados para o HCS concentrado após maximização através do planejamento e posterior validação (BS 1), houve um aumento de cerca de 40 % na produção de biomassa, cerca de 36 % no teor lipídico e cerca de 62 % nos lipídios totais. Na estratégia BA 4 o cultivo começou com o HCS com concentração (em termos dos açúcares redutores) igual a 20 g·L⁻¹. Com 72 h de cultivo a concentração de biomassa atingiu o estado estacionário, caracterizado pela leitura constante da concentração da biomassa. Neste momento, o cultivo foi alimentado com glicose suficiente para que o volume do meio de cultivo tivesse concentração igual a 10 g·L⁻¹ para este carboidrato. Às 144 h a biomassa atingiu novamente o estado estacionário dando fim ao cultivo, conforme apresentado na Figura 21.

Embora a presença da glicose muitas vezes cause competição entre os permeadores responsáveis pelo transporte do carboidrato através da membrana celular, para o HCS nas

condições utilizadas na estratégia BA 4 o efeito foi positivo. Embora a concentração da glicose representasse apenas 1/3 da concentração total dos açúcares redutores presentes, após sua adição houve uma produção de lipídios totais em uma taxa muito maior que aquela observada anteriormente. Aliado a esse fato, a concentração dos AR, estável em $10,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ao atingir 72 h, saltou após adição de glicose. No entanto, ao decorrer do cultivo a concentração de AR decresceu até atingir $0,98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ao final das 144 h, conforme Figura 21.

Figura 21 – Acompanhamento de pH, biomassa, lipídios totais e concentração dos açúcares redutores ao longo de 144 h de cultivo para a estratégia BA 4.



O aumento da produção de lipídios totais a partir da alimentação da glicose, assim como a redução da concentração dos AR a níveis inferiores aos registrados anteriormente, indicam que a glicose possivelmente influenciou no metabolismo celular. Estudos demonstram que a capacidade de uma levedura em acumular lipídios está ligada à sua capacidade de produzir elevadas quantidades de acetil-CoA (RATLEDGE, 2004), o que é facilmente desencadeado pela glicose. Para que isso ocorra uma série de reações de beta oxidação transformam a acetil-CoA produzida pelos metabólitos intermediários em ácidos graxos (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

Na Tabela 23 estão apresentados os parâmetros de crescimento para a estratégia com os melhores resultados (BA 4).

Os parâmetros de crescimento determinados para a estratégia BA 4 ficaram muito próximos daqueles determinados para o cultivo envolvendo o carboidrato de melhor resultado

para o presente trabalho, a glicose (Tabela 6). A produtividade em lipídios (P_L) para a estratégia BA 4 foi superior ($0,019 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) à produtividade observada para a glicose ($0,018 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). O fator de conversão de carboidrato em lipídios ($Y_{P/S}$) foi levemente superior para a glicose ($0,122 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) quando comparado com a estratégia BA 4 ($0,120 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Tabela 23 - Parâmetros de crescimento e produção lipídica para o cultivo utilizando a estratégia BA 4

Parâmetro avaliado	BA 4
Biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)*	$11,92 \pm 0,02$
Lipídios totais ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)*	$29,28 \pm 0,13$
Teor lipídico (%)*	$3,49 \pm 0,01$
$Y_{X/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	$0,400 \pm < 0,001$
$Y_{P/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	$0,120 \pm < 0,001$
$Y_{P/X}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	$0,300 \pm < 0,001$
P_X ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	$0,080 \pm < 0,001$
P_L ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	$0,018 \pm < 0,0001$
μ_{\max} (h^{-1})	$0,038 \pm < 0,001$

*Parâmetros determinados ao final de cada cultivo. n = 3.

Ladeira (2016), cultivando *Meyerozyma guilliermondii* BI281 em meio composto inicialmente por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): (30) glicerol, (5) KH_2PO_4 , (1) Na_2HPO_4 , (3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, (0,0002) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, (1,2) extrato de levedura, com pH inicial 5,5 e $30 \text{ }^\circ\text{C}$, testou diferentes estratégias de alimentação e observou que ao alimentar $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicerol bruto em 48 h de cultivo foi obtida a maior concentração de lipídios totais entre as demais estratégias avaliadas, alcançando assim $12,96 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por 18,70 % de teor lipídico, totalizando $2,42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais. Quando esses resultados foram comparados com a batelada simples, com produção de $8,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por 15,10 % de lipídios, totalizando $1,23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais, determinou-se que a alimentação possibilitou um aumento de 96,8 % na concentração dos lipídios totais.

Chang et al. (2013), cultivando a levedura *Cryptococcus* sp. SM5S05 em um meio com concentração de glicose e hidrolisado de espiga de milho variável, além de extrato de levedura (0,5%), peptona (0,5%) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,5%), sob 180 rpm, pH 6,0 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$, observaram que quando o cultivo começou com 2 % de glicose e foi alimentado com mais 4 % de glicose após 48 h, foram produzidos $11,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por 63,6 % de

lipídios, alcançando assim $7,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais. Em uma segunda estratégia, o cultivo iniciou com 4 % de glicose e após 48 h foi alimentado com hidrolisado de espiga de milho (com concentração de glicose no hidrolisado em torno de 2 %), produzindo $10,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por 61,4 % de lipídios, alcançando assim $6,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais.

Pereira (2018) cultivando *R. mucilaginosa* CCT 7688 em meio composto por $36,62 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicerol bruto; $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 ; $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 ; $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$; $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de levedura; com pH inicial 4,5, 180 rpm e $25 \text{ }^\circ\text{C}$, alcançou $21,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por 51 % de lipídios, resultando assim em $10,72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais quando cultivado em batelada alimentada com alimentações de 20 mL de glicerol bruto em 24 h de cultivo, 20 mL em 96 h e 20 mL em 144 h. Para o mesmo meio mas em batelada simples foram obtidos $8,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa composta por 42,9 % de lipídios resultado em $3,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais.

5.6 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

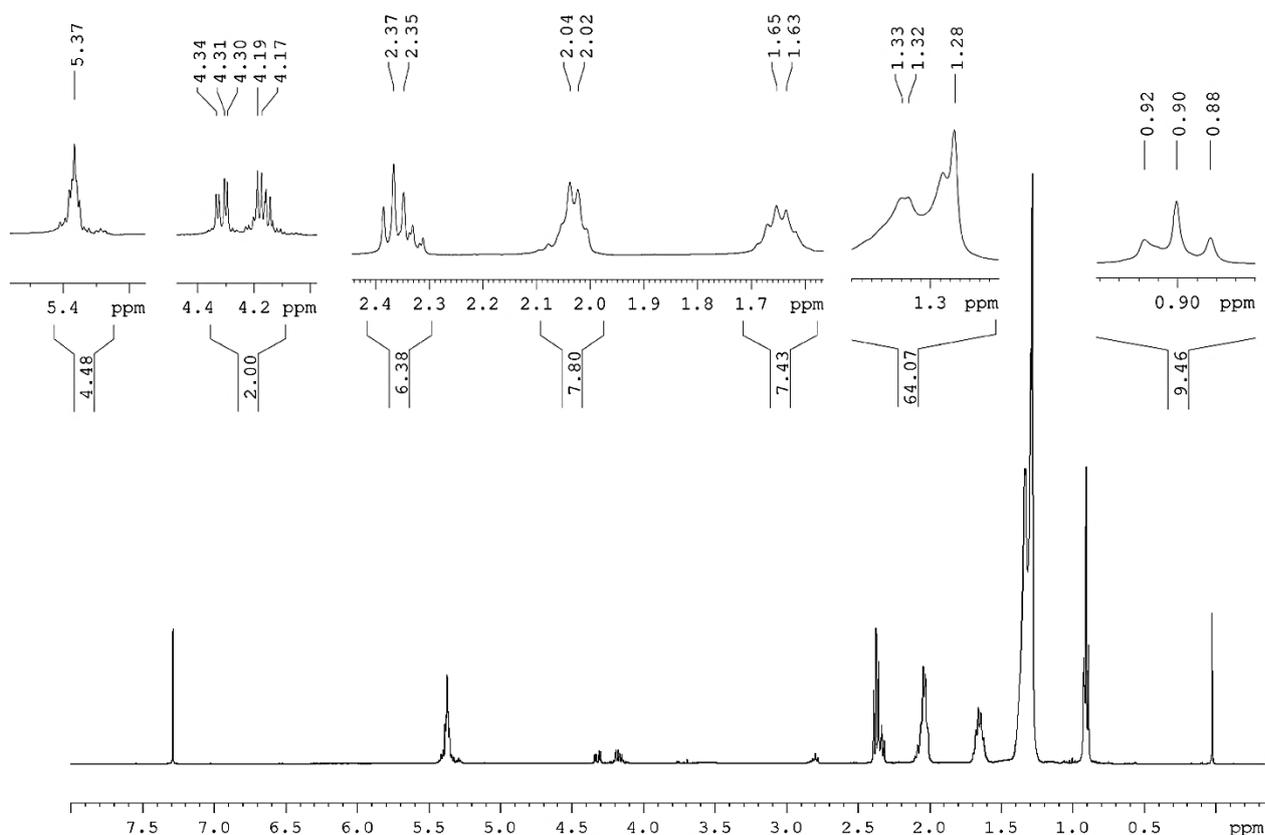
5.6.1 RMN ^1H

Uma vez alcançada a maior produção de lipídios totais através da estratégia BA 4, foi feita a caracterização através de RMN ^1H para os lipídios produzidos, conforme Figura 22.

O espectro obtido a partir do extrato lipídico extraído da biomassa produzida por *R. mucilaginosa* CCT 7688 apresentou sinais similares aos triacilgliceróis correspondentes aos ácidos oleico e linoleico. Na região entre 0,83 e 1,03 ppm os picos apresentados são característicos do grupo $-\text{CH}_3$, típicos dos hidrogênios das cadeias alquílicas dos ésteres dos ácidos graxos saturados e insaturados. Na região entre 1,22 e 1,42 ppm se encontra o maior pico, que é típico do grupo $-(\text{CH}_2)-$ característico das estruturas intermediárias das longas cadeias dos ácidos graxos. Entre 1,52 e 1,70 ppm se encontram os sinais dos hidrogênios ligados ao segundo carbono após o grupo acila $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$. Esse grupo geralmente está ligado a uma molécula de glicerol, fazendo uma ligação típica de um éster. Entre 1,94 e 2,14 ppm o sinal é característico do grupo $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$. Entre 2,23 e 2,36 ppm os sinais são típicos dos hidrogênios entre os carbonos do éster $-\text{OCO}-\text{CH}_2-$. Entre 2,70 e 2,84 ppm os sinais são típicos dos hidrogênios localizados entre duplas ligações $=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$, o que aponta para a formação de triacilglicerol com cadeias poli-insaturadas. Entre 4,10 e 4,32 ppm os sinais correspondem aos hidrogênios ligados na extremidade da molécula do glicerol $-\text{CH}_2\text{OCOR}$ que forma o triacilglicerol, enquanto que os sinais entre 5,20 e 5,26 ppm

correspondem ao hidrogênio “do meio” da molécula do glicerol $>\text{CHOCOR}$ formador do triacilglicerol. Por fim, os sinais entre 5,26 e 5,40 ppm são característicos do grupo $-\text{CH}=\text{CH}-$ que são os hidrogênios metílicos entre as duplas ligações. Todas as interpretações dos presentes deslocamentos químicos foram obtidas por comparação com Guillén e Ruiz (2003).

Figura 22 – Espectro de RMN ^1H com ampliações dos picos de 0,88 a 0,92 ppm, 1,28 a 1,33 ppm, 1,63 a 2,37 ppm, 4,17 a 4,34 ppm e 5,37 ppm, obtido do extrato lipídico da estratégia com maior produção de lipídios totais por *R. mucilaginosa* CCT 7688.



Utilizando as equações descritas por Guillén e Ruiz (2003) foi possível estimar as concentrações dos ácidos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados através da integração da área dos picos do espectro da Figura 22. Foi estimada a presença de 2,05 % de ácido linoleico (C18:2 c), 70 % de ácido oleico (C18:1 c) e 25,5 % de ácidos graxos saturados. Desta forma, os ácidos graxos produzidos na estratégia BA 4 foram compostos por cerca de 25,5 % de saturados, 70 % de monoinsaturados e 2,5 % de poli-insaturados.

Pereira (2018) determinou para os lipídios produzidos por *R. mucilaginosa* CCT 7688 na melhor estratégia estudada (366,2 g·L⁻¹ glicerol, 50,0 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 10,0 g·L⁻¹ Na₂HPO₄,

30,0 g·L⁻¹ MgSO₄ · 7 H₂O, 12 g·L⁻¹ extrato de levedura, pH inicial 4,5 e temperatura de 25 °C, mais alimentação de 20 mL de glicerol bruto em 48 h, 10 mL em 72 h, 10 mL em 96 h), concentrações de ácidos graxos saturados igual a 1,9 %, 18,1 % de monoinsaturados e 79,8 % de poli-insaturados.

Enshaeieh et al. (2015), cultivando *R. mucilaginosa* (cepa sem identificação) com glicose (75 g·L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (1 g·L⁻¹), extrato de levedura (1 g·L⁻¹), pH 6,5, 25 °C e 150 rpm, obtiveram lipídios totais, biomassa e teor lipídico iguais a 10,97 g·L⁻¹, 18,84 g·L⁻¹ e 58,2 %, respectivamente. Após identificação do perfil dos ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG/MS), observaram que os lipídios produzidos eram compostos por ácido palmítico (16,62 %), ácido oleico (69,45 %), ácido mirístico (1,98 %), ácido esteárico (1,63 %) e ácido linoleico (5,78 %).

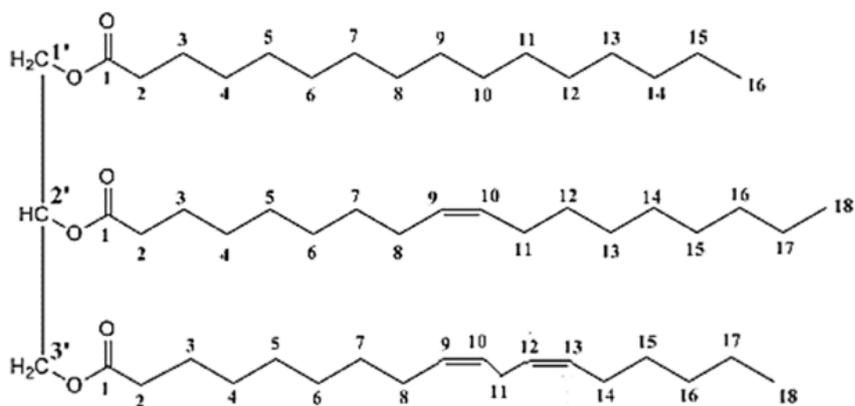
Na Tabela 24 e Figura 23 estão apresentadas as atribuições dos sinais do espectro de RMN ¹H utilizando como referência uma molécula de triacilglicerol composta pelos ácidos graxos palmítico, oleico e linoleico.

Tabela 24 – Atribuição dos sinais de RMN ¹H aos hidrogênios correspondentes

δ (ppm)	Hidrogênio (Glicerol)	Hidrogênio (Ac. Oleico)	Hidrogênio (Ac. Linoleico)
0,83-0,93		18	18
0,93-1,03			18
1,22-1,42		12-17 e 4-7	4-7 e 15-17
1,52-1,70		3	3
1,94-2,14		8 e 11	8 e 14
2,23-2,36		2	2
2,70-2,84			11
4,10-4,32	1' e 3'		
5,20-5,26	2'		
5,26-5,40		9 e 10	9-10 e 12-13

As regiões dos sinais obtidos a partir dos lipídios produzidos pela *R. mucilaginosa* CCT 7688 são semelhantes às regiões e sinais obtidos para os óleos de soja, girassol e milho, por exemplo, o que indica a possibilidade do uso do lipídio microbiano para os mesmos fins que aqueles empregados para os óleos tradicionais (GUILLÉN; RUIZ, 2003).

Figura 23 – Molécula de triacilglicerol composta pelos ácidos graxos palmítico (ligado ao carbono 1'), oleico (ligado ao carbono 2') e linoleico (ligado ao carbono 3'), com marcações numéricas para identificação dos hidrogênios.



5.6.2 CG/MS

Na Figura 24 está apresentado um dos cromatogramas obtidos a partir da análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa. O cromatograma dos padrões utilizados para quantificação está apresentado no Apêndice 7.

Na Tabela 25 está apresentado a interpretação do cromatograma (Figura 24) após integração dos sinais, caracterizando assim o perfil de ácidos graxos obtidos nos lipídios produzidos por *R. mucilaginosa* CCT 7688 na estratégia BA 4. Na mesma tabela estão apresentadas comparações com outros perfis de ácidos graxos para diferentes fontes de lipídios pesquisados na literatura.

Figura 24 – Cromatograma para identificação dos ácidos graxos que compõem os lipídios produzidos por *R. mucilaginosa* CCT 7688 na estratégia de cultivo BA 4.

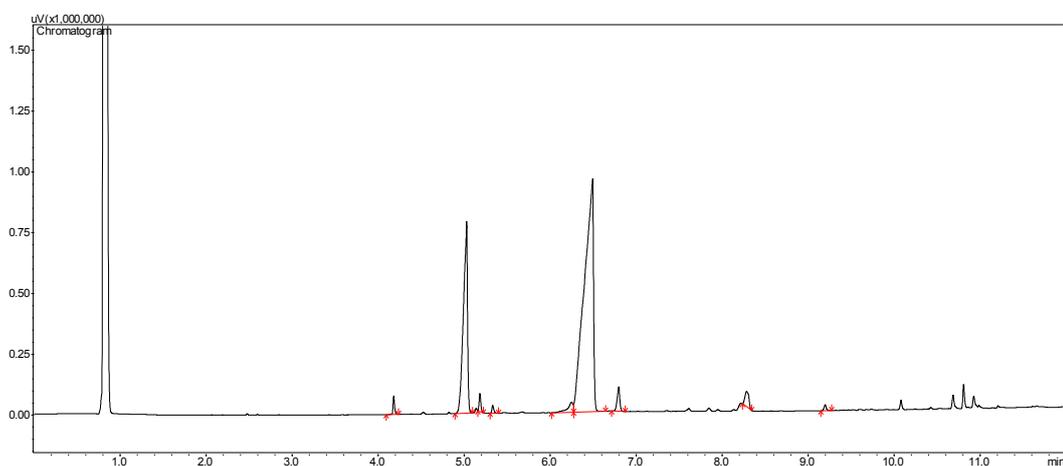


Tabela 25 – Perfil de ácidos graxos dos lipídios produzidos por *R. mucilaginosa* CCT 7688 para a estratégia BA 4 comparado a outros perfis presentes na literatura

Ácido graxo		Composição (%)				
		(1)*	(2)	(3)	(4)	(5)
C14:0	Mirístico ⁽¹⁾	0,88 ± 0,04	1,98	-	0,10	-
C16:0	Palmítico ⁽¹⁾	24,44 ± 0,26	16,62	18,51	14,00	11,7
C16:1	Palmitoleico ⁽²⁾	0,89 ± 0,11	-	3,26	0,20	-
C17:0	Heptadecanoico ⁽¹⁾	0,45 ± 0,04	-	-	-	-
C18:1 t	Elaidico ⁽²⁾	1,64 ± 0,13	-	-	-	-
C18:1 c	Oleico ⁽²⁾	67,25 ± 0,46	69,45	63,60	67,10	23,3
C18:2 c	Linoleico ⁽³⁾	2,17 ± 0,23	5,78	11,43	14,00	55,5
C20:2	11,14-eicosadienoico ⁽³⁾	1,89 ± 0,09	-	-	-	-
C22:0	Behênico ⁽¹⁾	0,42 ± 0,01	-	-	2,10	-
Outros		0,01	6,17	3,20	2,50	9,5
Total quantificado		100,00 ± 0,01	100	100	100	100

* n = 3; ⁽¹⁾Ácidos saturados (somente simples ligações); ⁽²⁾Ácidos monoinsaturados (simples ligações + uma dupla ligação); ⁽³⁾Ácidos poli-insaturados (ligações simples e mais de uma dupla ligação); (1): Presente trabalho – Lipídios obtidos a partir de *R. mucilaginosa* CCT 7688; (2): Enshaeieh et al. (2015) – Lipídios obtidos a partir de *R. mucilaginosa* (cepa sem identificação); (3): Guillén e Ruiz (2003) - Azeite de oliva monovarietal do tipo Manzanilla; (4): Guillén e Ruiz (2003) - Óleo de amendoim; (5): Pereira (2018) – Óleo de soja.

Pela Tabela 25 acima foi possível determinar que os lipídios produzidos pela *R. mucilaginosa* CCT 7688 sob a estratégia BA 4 foram compostos por 26,41 % de ácidos graxos saturados, 69,62 % monoinsaturados e 3,96 % de poli-insaturados, concordando assim com os resultados obtidos através de RMN ¹H. Foi possível observar ainda que, para os perfis de ácidos graxos para os lipídios produzidos a partir do cultivo de *R. mucilaginosa* CCT 7688 sob a estratégia BA 4, houve similaridade com os perfis de lipídios produzidos por Enshaeieh et al. (2015) (lipídios obtidos a partir de *R. mucilaginosa* - cepa sem identificação), com o azeite de oliva monovarietal do tipo Manzanilla, assim como para o óleo de amendoim (Guillén e Ruiz, 2003). No entanto, houve diferença entre os perfis de ácidos graxos para os lipídios do presente trabalho e o óleo de soja, principalmente pelo alto teor de ácido linoleico neste último.

6 CONCLUSÕES

Através deste presente trabalho foi possível viabilizar o uso das cascas de soja, um resíduo agroindustrial, para a produção de lipídios por *R. mucilaginosa* CCT 7688. Após maximização através de planejamento experimental foi obtido $1,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais em meio contendo hidrolisado de cascas de soja concentrado como fonte principal de carbono.

Após avaliação de diferentes estratégias de alimentação utilizando hidrolisado de cascas de soja e glicose, foram produzidos $3,49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lipídios totais pela estratégia BA 4 (hidrolisado $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e posterior adição de glicose $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Sob esta estratégia, os ácidos graxos produzidos foram caracterizados como: 0,9 % mirístico (C14:0), 24,62 % palmítico (C16:0), 0,97 % palmitoleico (C16:1), 0,47 % heptadecanoico (C17:0), 1,73 % elaidico (C18:1t), 66,92 % oleico (C18:1c), 2,01 % linoleico (C18:2c), 1,95 % 11,14-eicosadienoico (C20:2) e 0,42 % behênico (C22:0). Esse perfil de ácidos graxos mostrou semelhança ao perfil presente no azeite de oliva monovarietal do tipo Manzanilla e no óleo de amendoim, por exemplo, indicando a potencialidade do uso dos lipídios produzidos no presente trabalho para os mesmos fins que os óleos tradicionais citados.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a hidrólise enzimática das cascas de soja e comparar resultados com a hidrólise ácida;
- Avaliar a possibilidade de reuso das cascas de soja após a hidrólise em uma nova hidrólise;
- Avaliar a produção de lipídios utilizando o hidrolisado em biorreator;
- Estudar a produção de carotenoides na biomassa produzida a partir do hidrolisado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEITOS J. M.; VALLEJO J. A.; VEIGA-CRESPO P.; VILLA T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1219–1227, 2011.

AGUIAR, C. M. D. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.

AHMAD, F. B.; ZHANG, Z.; DOHERTY, W. O.; O'HARA, I. M. A multicriteria analysis approach for ranking and selection of microorganisms for the production of oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, n. 190, v. 1, p. 264–273, 2015.

ANP. Agência Nacional de Petróleo. Informações de mercado. 2018. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>>. Acesso em: 19 ago 2018.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington: A.O.A.C., 1995.

ARISTIZÁBAL, R. V. S. **Produção de leveduras oleaginosas em meio de cultura contendo hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2013. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

AZAMBUJA, S. P. H. **Fisiologia e capacidade de acúmulo de lipídeos de diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* e *Rhodosporidium toruloides* em meio contendo glicerol**. 2016. 173 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

BACCIOTTI, F. **Fisiologia e formação de partículas lipídicas durante o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**. 2015. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

BELLOU, S.; TRIANTAPHYLLIDOU, I-E.; AGGELI, D.; ELAZZAZY, A. M.; BAESHEN, M. N.; AGGELIS, G. Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 24-35, 2016.

BENTO, T. F. S. R. **Produção de lipídios microbianos por leveduras empregando glicerol como principal fonte de carbono**. 2017. 143 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2017.

BLASI, D. A.; TITGEMEYER, E. C.; DROUILLARD, J. S.; PAISLEY, S. I.; BROUK, M. J. Composition and feeding value for beef and dairy cattle. **Soybean Hulls**, v. 79, p. 1-18, 2000.

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

BURA, R.; VAJZOVIC, A.; DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1003-1011, 2012.

CARLSON, M. Regulation of glucose utilization in yeast. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 8, n. 5, p. 560–564, 1988.

CASSALES, A. R. **Otimização da hidrólise da casca de soja (*glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado**. 2010. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CASTANHA, R. F. **Utilização de soro de queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas**. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CHANG, Y. H.; CHANG, K. S.; HSU, C. L.; CHUANG, L. T.; CHEN, C. Y.; HUANG, F. Y.; JANG, H. D. A comparative study on batch and fed-batch cultures of

oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corn cob hydrolysate for microbial oil production. **Fuel**, v. 105, n. 1, p. 711–717, 2013.

CHOI, M. H.; PARK, Y. H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, p. 221-226, 2003.

CHRISTOFOLETTI, G. B. **Estudo dos efeitos de etapas de pré-tratamento na hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CORREDOR, D. Y.; SUN, X. S.; SALAZAR, J. M.; HOHN, K. L.; WANG, D. Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2008.

CORTIVO, P. R. D.; HICKERT, L. R.; HECTOR, R.; AYUB, M. A. Z. Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments. **Industrial Crops and Products**, v. 113, n. 1, p. 10–18, 2018.

COSTA, J. O. **Análise dos gases da exaustão em um motor diesel com injeção Common Rail alimentado com diesel, biodiesel e suas misturas**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia dos Materiais) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

DUARTE, S. H.; ANDRADE, C. C. P.; GHISELLI, G.; MAUGERI, F. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 138, n. 1, p. 377-381, 2013.

EMBRAPA. **Dados econômicos**: safra em números. Brasília – DF, Brasil. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 19 ago 2018.

ENSHAEIEH, M.; ABDOLI, A.; MADANI, M. Single cell oil (SCO) production by *Rhodotorula mucilaginosa* and its environmental benefits. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, p. 387-400, 2015.

ESSLINGER, H. M. **Processes technology markets**. 1. ed. Weinheim: Wiley-Vch, 2009. 778p.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. **Lipids**, v. 18, n. 9, p. 923-929, 1983.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. The role of the mitochondrial Nad^+ - isocitrate dehydrogenase in lipid-accumulation by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Cbs-14. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n.9, p. 845-850, 1985.

FABRICIO, M. F. **Produção de ácidos graxos poli-insaturados pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* BI281a utilizando resíduos agro-industriais como substrato**. 2018. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

FURLAN, V. J. M. **Produção de bioetanol a partir de resíduos celulósicos da agroindústria do arroz**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

FURLAN, F. L. **Uso de subprodutos de milho, soja e trigo como adsorvente de ferro e manganês em sistema aquoso**. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2017.

GARZÓN, C. S. L. **Produção microbiana de lipídios**. 2009. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GRASSI, T. L. M. **Biomassas microbianas na alimentação de tilápias**. 2018. 124 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A. Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 11, p.688-696, 2003.

HEINZE, T; SEOUD, O. A.; KOSCHELLA, A. **Cellulose derivatives: synthesis, structure and properties**. 1. ed. New York: Springer, 2018. 531 p.

HENBEST, S.; GIANNAKOPOULOU, E.; KIMMEL, M.; GRACE, A.; ROOZE, J.; LU, S.; HARRIES, T.; CHASE, J.; GOLDIE-SCOT, L.; CHATTERTON, R.; TURNER, A. **New Energy Outlook**. Disponível em: < <https://about.bnef.com/new-energy-outlook>>. Acesso em: 19 ago. 2018.

HIJAZIN, C. A. H.; SIMÕES, A. T.; SILVEIRA, D. R. Hidrólise ácida, alcalina e enzimática. **Revista Atitude**, v. 4, n. 7, p. 89-93, 2010.

IRICK, T. J.; WEST, K.; BROWNELL, H. H.; SCHWALD, W.; SADDLER, J. N. Comparison of colorimetric and HPLC techniques for quantitating the carbohydrate components of steam-treated wood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 37-149, 1988.

KAAR, W. E.; COOL, L. G.; MERRIMAN, M. M.; BRINK, D. L. The complete analysis of wood polysaccharides using HPLC. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 11, n. 4, p. 447-463, 1991.

LACERDA, A. L. M.; BRITO, J. N. Estudo do nível de vibração de um motor ciclo diesel monocilíndrico na combustão do diesel e biodiesel através da análise de wavelet. **Acta Mechanica et Mobilitatem**, v. 2, n. 3, p. 41-51, 2017.

LADEIRA, B. L. **Cultivo de *Meyerozyma guilliermondii* em batelada e batelada alimentada para produção de lipídios a partir de glicerol bruto**. 2016. 86 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 336 p.

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

MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 1365-1391, 2015.

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatography analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, p. 514-515, 1966.

MIELLENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3532-3539, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

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

MOTA, D. A. **Fontes proteicas em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhas leiteiras**. 2011. 107 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2011.

MOURO, A. **Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

NUNES, J. L. D. S. **Características da soja (*glycine max*)**. Agrolink. [S.I.] 2016. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/culturas/soja/informacoes/caracteristicas_361509.html>. Acesso em 19 ago 2018.

OLIVEIRA, J. S. S.; KRZYZANIAK, S. R.; PICOLOTO, R. S.; BOLZAN, R. C.; MELLO, P. A. Determination of inorganic contaminants in electrical and electronic equipment after digestion using microwave-assisted single reaction chamber. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 9, p. 1657-1664, 2017.

OTERO, D. M. **Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides**. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

PAN, L-X.; YANG, D-F.; LI, S.; LI, W.; CHEN, G-G.; LIANG, Z-Q. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing capacities. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 215–220, 2009.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 8, p. 1031-1051, 2011.

PAUL, T.; BASKARAN, D.; PAKSHIRAJAN, K.; PUGAZHENTHI, G. Continuous bioreactor with cell recycle using tubular ceramic membrane for simultaneous wastewater

treatment and bio-oil production by oleaginous *Rhodococcus opacus*. **Chemical Engineering Journal**. No prelo 2019.

PEREIRA, R. N. **Produção de lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa* em batelada alimentada a parti do glicerol bruto**. 2018. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2018.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 179 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807-815, 2004.

RAU, M. R. **Desenvolvimento de estratégia de produção de óleo microbiano a partir de resíduos industriais e aplicações na síntese de biodiesel**. 2015. 72 f. Monografia (Bacharel em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

ROCHA, G. J. M.; MARTÍN, C.; SILVA, V. F. N.; GÓMEZ, E. O.; GONÇALVES, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, n. 1, p. 447–452, 2012.

RODRIGUES, K. C. S. **Estudo da influência do pH e da temperatura na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator convencional**. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável) – Universidade Federal de São João Del-Rei, Ouro Branco, 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design process optimization**. 1^a ed. New York: CRC Press, 2014. 336 p.

ROSA, P. D. **Otimização da biossíntese de óleo microbiano pela levedura *Candida zeylanoides*** QU 33. 2014. 127 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

ROSSI, M.; AMARETTI, A.; RAIMONDI, S.; LEONARDI, A. Getting lipids for biodiesel production from oleaginous fungi. **Biodiesel Feedstocks and Processing Technologies**, v. 1, p. 72-74, 2011.

SANNIGRAHI, P.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. Cellulosic biorefineries - unleashing lignin opportunities. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 2, n. 5-6, p. 383-393, 2010.

SANTOS, E. O. **Aproveitamento do glicerol gerado na síntese de biodiesel para produção de biomassa de leveduras**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

SANTOS, E. O.; MICHELON, M.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Evaluation of the composition of culture medium for yeast biomass production using raw glycerol from biodiesel synthesis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 432-440, 2012.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial. Engenharia bioquímica**. 1ª ed. Vol. 2. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 541 p.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLORES, S. H.; HERTZ, P. F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2898-2904, 2008.

SILVA, J.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; RIBEIRO, J. E. S.; MEDEIROS, L. L.; FERREIRA, A. L. O. Produção de biomassa de lipídios pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando a manipueira como substrato. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2018.

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

SPIER, F. **Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto gerado na síntese de biodiesel**. 2014. 189 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

TEIXEIRA, K. S. **Produção de lipídeos e ácido cítrico por levedura selvagem crescida em glicerol**. 2013. 87 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

THEVENIEAU, F.; NICAUD, J. M. Microorganisms as sources of oils. **Oilseeds and Fats Crops and Lipids**, v. 20, n. 6, p. D603, 2013.

TRIVEDI, T.; JAIN, D.; MULLA, N. S. S.; MAMATHA, S. S.; DAMARE, S. R.; SREEPADA, R. A.; KUMAR, S. GUPTA, V. Improvement in biomass, lipid production and biodiesel properties of a euryhaline *Chlorella vulgaris* NIOCCV on mixotrophic cultivation in wastewater from a fish processing plant. **Renewable Energy**. No prelo 2019.

TSIGIE, Y. A.; WANG, C-Y.; TRUONG, C-T.; JU, Y-H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9216-9222, 2011.

VANNUCCHI, H.; CUNHA, S. F. C. Vitaminas do complexo B: Tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, biotina e ácido pantotênico. **International Life Sciences Institute**, v. 9, n. 1, p. 01-36, 2009.

VIEIRA, J. P. F. **Biotransformação de carboidratos da cana-de-açúcar em lipídios e avaliação técnica-econômica**. 2016. 252 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016

WAHLEN, B. D.; MORGAN, M. R.; MCCURDY, A. T.; WILLIS, R. M.; MORGAN, M. D.; DYE, D. J.; BUGBEE, B.; WOOD, B. D.; SEEFELDT, L. C. Biodiesel from microalgae, yeast, and bacteria: Engine performance and exhaust emissions. **Energy & Fuels**, v. 27, n. 1, p. 220-228, 2012.

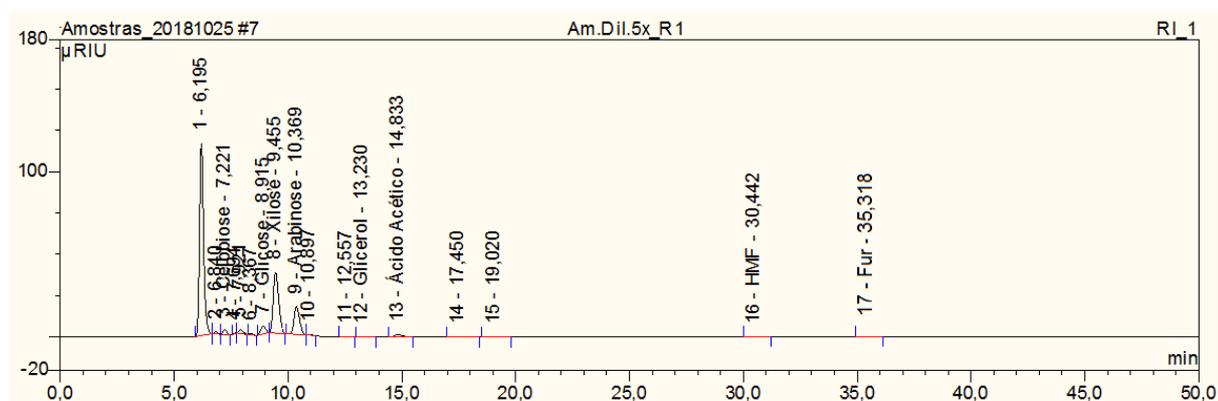
XAVIER, M. C. A. **Lipid production from hemicellulosic hydrolysate of sugarcane bagasse and metabolic engineering of yeast *Lipomyces starkeyi***. 2016. 175 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

ZHAO, C.; ZHANG, T.; LI, M.; CHI, Z. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1121–1126, 2010.

ZHAO, X.; KONG, X.; HUA, Y.; FENG, B.; ZHAO, Z. K. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 405–412, 2008.

APÊNDICE 1

Cromatograma para caracterização da casca de soja após procedimento conforme Gouveia et al. (2009) e Rocha et al. (2012).



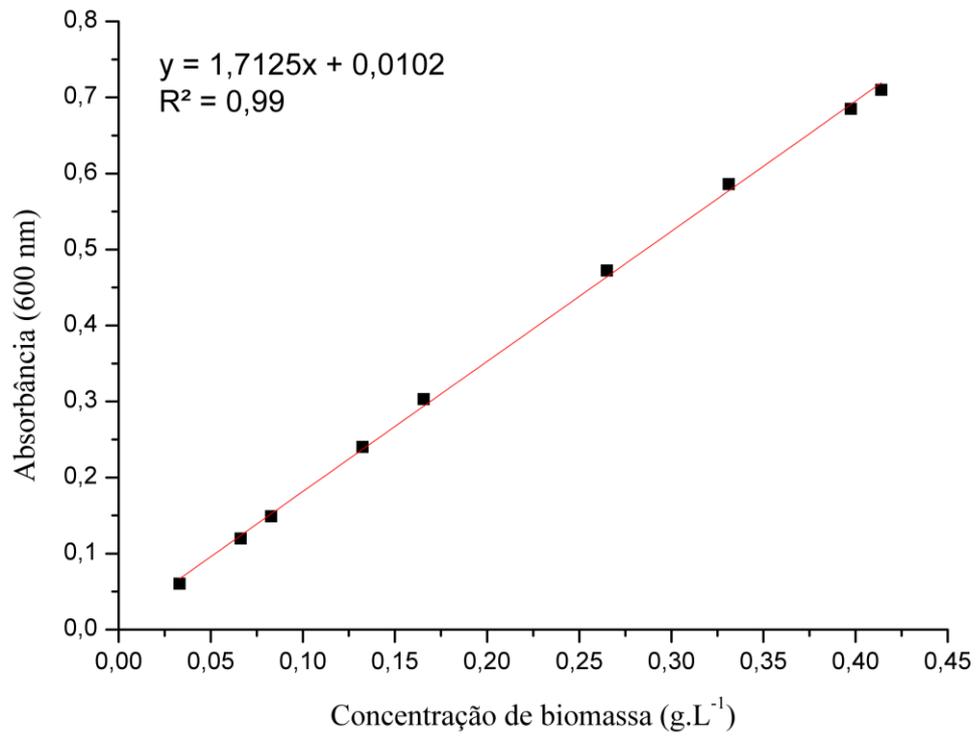
Interpretação do cromatograma de caracterização das cascas de soja após procedimentos conforme metodologia de Gouveia et al. (2009) e Rocha et al. (2012).

Carboidratos e produtos de degradação (%) ⁽¹⁾	
Glicose	37,90
Xilose	20,55
Arabinose	5,25
Celobiose	2,50
Furfural	0,60
Ácido acético	0,60
Hidroximetilfurfural	0,30

⁽¹⁾ n= 1

APÊNDICE 2

Curva padrão de biomassa



APÊNDICE 3

Concentração de carboidratos remanescentes (residual) ao final dos cultivos

Cultivo	Concentração dos carboidratos residuais (g·L ⁻¹) *			
	Xilose	Arabinose	Glicose	Celobiose
Preliminar Xilose (item 5.3.1)	14,82	-	-	-
Preliminar Arabinose (item 5.3.1)	-	26,70	-	-
Preliminar Glicose (item 5.3.1)	-	-	0,00	-
Mistura de carboidratos (item 5.3.1)	1,39	0,84	0,00	0,43
Preliminar HCS concentrado (item 5.3.2)	0,64	0,22	0,00	0,40

* Determinada por CLAE ao final do cultivo.

APÊNDICE 4

Concentração dos carboidratos presentes no HCS antes e após concentração em rotavapor

Carboidratos	Concentração (g·L ⁻¹) ⁽¹⁾	
	HCS puro	HCS concentrado
Xilose	11,59	19,85
Arabinose	4,37	7,44
Glicose	1,24	2,25
Celobiose	0,60	0,97
Soma	17,80	30,51

⁽¹⁾ Determinada por CLAE. O volume evaporado no evaporador rotativo foi estimado segundo a equação geral:
 $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

APÊNDICE 5

Parâmetros para o cálculo da razão C/N

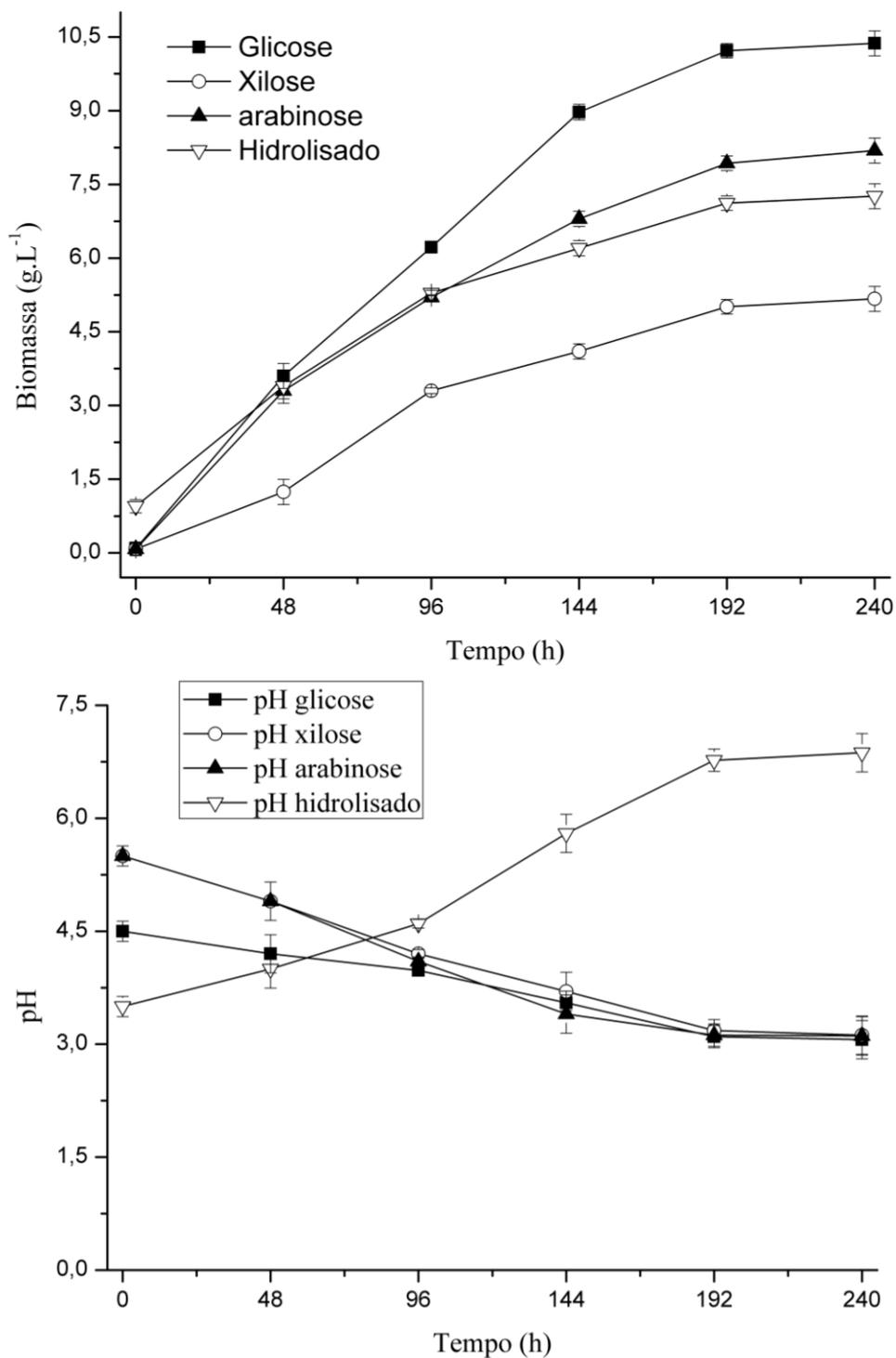
Cultivo	Concentração (g·L ⁻¹)				Razão C/N ⁽¹⁾
	C _C	C _{EL}	N _{NH4Cl}	N _{EL}	
Preliminar Xilose	12,000	0,567	0,130	0,184	40
Preliminar Glicose	12,000	0,567	0,130	0,184	40
Preliminar Arabinose	12,000	0,567	0,130	0,184	40
Meio sintético ⁽²⁾	13,260	0,567	0,130	0,184	44
HCS concentrado	20,400	0,567	0,216 ⁽³⁾	0,184	52

Composto	Composição (%) ⁽⁴⁾	
	Carbono	Nitrogênio
HCS concentrado	68,00	0,72
Extrato de levedura	37,79	12,25

C_C: Concentração de carbono no carboidrato (g·L⁻¹); C_{EL}: concentração de carbono no extrato de levedura (g·L⁻¹); N_{NH4Cl}: Concentração de nitrogênio no NH₄Cl (g·L⁻¹); N_{EL}: Concentração de nitrogênio no extrato de levedura. ⁽¹⁾ Razão C/N = $\frac{C_C + C_{EL}}{N_{NH4Cl} + N_{EL}}$; ⁽²⁾ Soma das concentrações de carbono de cada carboidrato que compôs a mistura (g·L⁻¹): xilose (8,62), glicose (0,92), arabinose (3,25) e celobiose (0,47). ⁽³⁾ Não houve acréscimo de NH₄Cl pois o próprio HCS já continha nitrogênio (0,216 g·L⁻¹); ⁽⁴⁾ Determinado por análise elementar.

APÊNDICE 6

Acompanhamento cinético e de pH para os melhores ensaios* de cada planejamento experimental.



*Glucose = ensaio 6; xilose = ensaio 7; arabinose = ensaio 8; HCS concentrado = ensaio 2

APÊNDICE 7

Cromatograma dos padrões de ácidos graxos

