



# Universidade do Algarve

“Abordagens para a acumulação de lípidos e coprodutos de elevado valor pela levedura *Rhodosporidium toruloides*”

**Valdemira Lourenço Afonso**

- Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biológica -

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Doutora

Sara Isabel Cacheira Raposo, sraposo@ualg.pt

Faro, 2017

# Universidade do Algarve

“Abordagens para a acumulação de lípidos e coprodutos de elevado valor pela levedura *Rhodosporidium toruloides*”

**Valdemira Lourenço Afonso**

- Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biológica -

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Doutora

Sara Isabel Cacheira Raposo, sraposo@ualg.pt

Faro, 2017

# Abordagens para a acumulação de lípidos e coprodutos de elevado valor pela levedura *Rhodosporidium toruloides*

## Declaração de autoria de trabalho

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

-----  
Valdemira Lourenço Afonso

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

# Agradecimentos

---

Ao longo do meu percurso académico, foram várias as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a sua plena realização, bem como para a concretização da presente dissertação, deixo assim um especial agradecimento:

À Professora Doutora Sara Raposo por toda a orientação, dedicação e paciência com que me guiou ao longo deste percurso, por todos os conhecimentos científicos transmitidos que foram essenciais á concretização deste trabalho, e principalmente pela disponibilidade demonstrada em todos os momentos. Agradeço ainda todos os bons momentos e o excelente ambiente de trabalho que proporcionou no laboratório.

À Mestre e amiga Ana Constantino por toda a ajuda que me deu na minha integração neste laboratório, por todas as dicas laboratoriais e por se mostrar sempre disponível para me ajudar em qualquer situação.

Agradeço também à técnica de Laboratório Teresa Sancho, por estar sempre disponível para ajudar em qualquer situação e também por todo o que me ensinou.

À minha amiga e colega de trabalho Daiana Oliveira, que a sua presença, amizade, carinho, boa disposição e alegria, foram essenciais no meu percurso pelo laboratório e na concretização desta dissertação.

Agradeço à minha mãe por toda a paciência nos momentos em que mais me ausentei, por todo o apoio e suporte, e por todos os valores que me deu, pelos quais me guio e me trouxeram até aqui.

Ao meu pai, que infelizmente não me acompanhou fisicamente nesta etapa, onde estiver quero que saiba que eu consegui, agradeço acima de tudo por ter acreditado...

À minha priminha que com quase cem anos e um coração de uma pureza inigualável, obrigada por me fazer acreditar que ainda existem seres humanos puros de alma e coração, por tudo o resto não há palavras que chegue para agradecer.

A toda a minha família, que sempre me deram força e apoiaram as minhas decisões.

Ao meu companheiro, Vasco Romão, por tudo. Todo o apoio, paciência, compreensão, e acima de tudo por sempre, sempre acreditar em mim, todo o caminho que percorri a seu lado trouxe-me até aqui, e tornou esta dissertação real. Obrigada meu amor.

A ti meu amor...

## Resumo

---

O biodiesel de 3ª geração obtido a partir da reação de transesterificação de óleos microbianos apresenta uma alternativa viável aos combustíveis fósseis. Contudo, os custos de produção são ainda elevados impedindo a sua produção em larga escala. No presente trabalho foram desenvolvidas estratégias de cultura da levedura *Rhodospiridium toruloides* utilizando dois resíduos agroindustriais como fontes de carbono de baixo custo, o extrato de alfarroba e um resíduo rico em ácido acético, com o fim de otimizar a produção de biomassa e acumulação de lípidos indicados para a produção de biodiesel. Numa fase inicial, avaliou-se o crescimento da levedura em meio com o resíduo rico em ácido acético como única fonte de carbono, e definiu-se o melhor rácio C/N para a produção de biomassa e lípidos. Foram testados rácios C/N entre 60 e 70 (3-15 g/L de Ace) tendo-se obtido uma biomassa máxima de 6,41 g/L no rácio de 70. Após a realização de um *fed-batch* com a adição de 10 g/L de glucose obteve-se um incremento de 50% da quantidade de lípidos produzidos atingindo-se 0,49 g/L de lípidos neutros no rácio de 65. Foram comparados os dois resíduos em modo *fed-batch*, tendo-se observado que a produção de biomassa é favorecida no resíduo de alfarroba com 70 g/L onde se obtiveram 7,44 g/L, por outro lado, a produção de lípidos foi potenciada na cultura com resíduo de ácido acético, atingindo-se 0,55 g/L correspondendo a 20% (p/p) de lípidos acumulados. Com base nestes resultados, procedeu-se ao aumento de escala para reator STR de 2L, combinando os dois resíduos como fonte de carbono numa estratégia de *fed-batch* sequencial, onde se iniciou as culturas com o resíduo de alfarroba como fonte de carbono, e numa segunda fase, adicionou-se 15 g/L de resíduo de ácido acético. Conseguiu-se assim, atingir uma produção de biomassa máxima de 15 g/L e uma acumulação lipídica de 40% (p/p). Foi também traçado o perfil lipídico, no qual se observou que a conversão dos resíduos de alfarroba e ácido acético originaram um elevado teor em ácido oleico e palmítico, o que sugere que os óleos obtidos podem ser utilizados na produção de biodiesel de qualidade, com propriedades dentro dos limites estabelecidos pela Norma Europeia de Qualidade EN12412. Realizou-se ainda a extração e determinação do perfil de carotenoides, tendo-se obtido 75,58 mg/L de carotenoides totais com 55,3 % de torulorodina, 20,7% de toruleno e 20,9% de  $\beta$ -toruleno, resultados que indicam a possibilidade de coprodução destes compostos em simultâneo com a produção de lípidos num contexto de biorrefinaria.

## Abstract

---

The third-generation biodiesel, obtained from the transesterification of microbial oil, presents a potential candidate to replace the fossil fuels in near future. However, the production costs are still very high, which is the main reason why large scale is not implemented yet.

In the present work, different culture strategies were developed for the growth of the yeast *R. toruloides*, using two agroindustry wastes as low-cost carbon sources, a carob extract and an acetic acid rich residue, to optimize the production of biomass and lipids, suitable for biodiesel. In a first approach, was evaluated the ability of the yeast to grow in a medium with an acetic acid rich residue (Ace) as a sole carbon source, and the best ration C/N was defined for biomass and lipids production. The ratios between 60 and 70 (3-15 g/L Ace) were tested, and the maximum biomass production of 6.41 g/L was obtained in the ratio of 70. In the same cultures a fed-batch was performed, and an increase of 50 % in the yield of lipids was obtained, reaching a concentration of 0.49 g/L in the medium with a ratio of 65. The two different residues were compared in a fed-batch culture mode. The results showed the production of biomass was favoured in the medium containing 70 g/L of carob extract as the carbon source, with 7.44 g/L of maximum biomass obtained, while the accumulation of lipids was potentiated in using acetic acid residue as the sole carbon source, reaching a production of 0.55 g/L and a yield of 20% (p/p). Based on these results a scale up was performed in a 2L bioreactor (STR), combining the two residues previously tested. The carob extract was used in a first stage, to improve the biomass production, and a 15 g/L of acetic acid residue fed-batch addition was made to promote the lipid accumulation. In this assay was achieved a biomass production of 15 g/L and a lipid accumulation of 40% (p/p). The lipid profile was also evaluated and showed a high production of oleic and palmitic acid, which are known to be suitable for biodiesel production. The obtained results showed that microbial oils produced from residues such as carob and acetic acid, are suitable quality biodiesel production, considering the proprieties limits established by the Quality European Normative EN 12412. Furthermore, the coproduction of carotenoids was evaluated with the extraction and profile analyses. A total of 75.58 mg/L of carotenoids was obtained with a content of 55.3% torulorodine, 20.7% torulene and 20.9%  $\beta$ -carotene. These results suggest that carotenoids can be obtained as a coproduct of biodiesel production in a biorefinery context.

## Publicações resultantes deste trabalho

---

### Comunicação oral

Valdemira Afonso, Laura Tangerino, Daiana Oliveira, Sara Raposo "*Culture strategies for lipid production using low-cost carbon sources by Rhodosporidium toruloides*", que será apresentado no Congresso Internacional Engineering and Sustainability in the XXI Century – INCREaSE 2017, a realizar entre 11-13 de outubro 2017, sob a forma de Comunicação oral, a ser apresentada no dia 12 de outubro 2017.

### Artigo científico

Afonso, V, Tangerino, L, Oliveira, D, Raposo, S (2018) *Culture strategies for lipid production using low-cost carbon sources by Rhodosporidium toruloides*. IN *INCREaSE Proceedings of the 1st International Congress on Engineering and Sustainability in the XXI Century - INCREaSE 2017*, A. Mortal, J. Aníbal, J. Monteiro, C. Sequeira, J. Semião, M. Moreira da Silva, M. Oliveira (Eds.). ISBN 978-3-319-70271-1; eBook ISBN 978-3-319-70272-8. DOI: 10.1007/978-3-319-70272-8

## Lista de abreviações

---

|                |   |
|----------------|---|
| ACC            | Acetil-CoA carboxilase  |
| ACL            | ATP-citrato liase   |
| ADR            | 1-acil-DHAP redutase  |
| AGAT           | 1-acil-G-3-P aciltransferase  |
| AMP            | Adenosina monofosfato   |
| ATP            | Adenosina trifosfato  |
| C/N            | Rácio carbono/azoto   |
| CECT           | Culturas Espanholas de Cultivo Tipo   |
| CIMA           | Centro de Investigação Marinha e Ambiental  |
| DAG            | Diacilglicerol  |
| DAPAT          | DHAP aciltransferase  |
| DHAP           | Dihidroxiacetona-fosfato  |
| DO             | Densidade ótica   |
| DMSO           | Dimetilsulfóxido  |
| FAS            | Complexo ácido gordo sintetase  |
| FCT            | Faculdade de Ciências e Tecnologia  |
| G-3-P          | Glicerol-3-fosfato  |
| GAT            | G-3-P aciltransferase   |
| GEE            | Gases de Efeito de Estufa   |
| HPLC           | Cromatografia Líquida de Alta Performance<br>( <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> ) |
| K <sub>G</sub> | Coefficiente global de transferência de massa na fase gasosa                                |
| LEBA           | Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental   |
| MNO            | Microrganismos não oleaginosos  |
| MO             | Microrganismos oleaginosos  |

## Lista de abreviações

|                   |  |
|-------------------|--|
| NADPH             | Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato                              |
| PA                | Ácido fosfatídico  |
| PBS               | Tampão fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered saline</i> )             |
| PDA               | <i>Potato Dextrose Agar</i>  |
| Prod vol L        | Produtividade volumétrica de lípidos                                   |
| Prod esp L/x      | Produtividade específica de lípidos                                    |
| Rpm               | Rotações por minuto  |
| STR               | Reator biológico mecanicamente agitado ( <i>Stirred Tank Reactor</i> ) |
| TAG               | Triglicerídeos   |
| TR                | Taxa respiratória  |
| TResp             | Taxa respiratória específica   |
| UF                | Unidades de fluorescência  |
| UFC               | Unidade formadora de colónias  |
| VFA               | Ácidos gordos voláteis ( <i>Volatile Fat Acids</i> )                   |
| vvm               | Volume de ar por volume de meio por minuto                             |
| $Y_{L/S}$         | Rendimento de lípidos em função do substrato                           |
| $Y_{L/S}$         | Rendimento de lípidos em função da biomassa                            |
| YPD               | <i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>                                  |
| % dO <sub>2</sub> | Percentagem de oxigénio dissolvido no meio                             |
| $\mu$             | Taxa específica de crescimento   |

# Índice

---

|   |      |
|---|------|
| Agradecimentos .....  | iv   |
| Resumo.....   | vi   |
| Abstract .....  | vii  |
| Publicações resultantes deste trabalho .....  | viii |
| Lista de abreviações .....  | ix   |
| Índice .....  | xi   |
| Índice de figuras .....   | xiv  |
| Índice de Tabelas.....  | xvii |
| 1. Introdução .....   | 1    |
| 1.1 Estado da arte .....  | 1    |
| 1.2 Energias renováveis e biocombustíveis .....   | 2    |
| 1.2.1 A importância da biomassa .....   | 5    |
| 1.2.2 Biodiesel .....   | 6    |
| 1.3 Microrganismos oleaginosos .....  | 9    |
| 1.3.1 A levedura <i>Rhodosporidium toruloides</i> .....                                 | 11   |
| 1.3.2 A acumulação lipídica em microrganismos oleaginosos .....                         | 12   |
| 1.3.3 Síntese de ácidos gordos .....  | 14   |
| 1.3.4 Formação de Triacilglicerídeos (TAG).....   | 16   |
| 1.3.5 Fatores que influenciam a acumulação lipídica em microrganismos oleaginosos ..... | 18   |
| 1.3.5.1 Influência do rácio molar C/N na acumulação lipídica .....                      | 19   |
| 1.3.5.2 Influência do modo de operação da cultura .....                                 | 21   |
| 1.4 Utilização de resíduos como matéria-prima.....                                      | 22   |
| 1.4.1 Extrato de alfarroba como fonte de carbono.....                                   | 23   |
| 1.4.2 Resíduos ricos em ácidos gordos voláteis como fontes de carbono.....              | 24   |
| 1.4.2.1 Metabolismo da síntese de TAG a partir de VFA.....                              | 25   |
| 1.5 Produção integrada em biorrefinaria .....   | 26   |
| 1.5.1 A levedura <i>R. toruloides</i> num contexto de biorrefinaria.....                | 27   |
| 1.5.1.1 Fatores que influenciam a coprodução de TAG e carotenoides .....                | 28   |
| 1.6 Objetivos.....  | 30   |
| 2. Material e métodos .....   | 31   |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.1     | Microrganismo e conservação.....   | 31 |
| 2.2     | Matérias-primas.....   | 31 |
| 2.2.1   | Extração dos açúcares solúveis da alfarroba.....   | 31 |
| 2.3     | Condições de esterilidade.....   | 32 |
| 2.4     | Condições e meios de cultura para o crescimento celular .....  | 32 |
| 2.4.1   | Meio de cultura <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA) .....  | 32 |
| 2.4.2   | Meio de cultura <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> (YPD) .....  | 32 |
| 2.4.3   | Meios de crescimento e de acumulação lipídica.....   | 33 |
| 2.4.4   | Preparação do pré-inóculo .....  | 33 |
| 2.4.5   | Preparação do Inóculo .....  | 34 |
| 2.4.6   | Ensaio experimentais em <i>erlenmeyer</i> .....  | 34 |
| 2.4.7   | Ensaio experimentais em reator biológico STR .....   | 35 |
| 2.5     | Ensaio experimentais .....   | 36 |
| 2.5.1   | Influência do rácio (C/N) usando um meio orgânico e resíduo rico em ácido acético como fonte de carbono.....   | 36 |
| 2.5.2   | Influência do rácio (C/N) usando um meio inorgânico e resíduo rico em ácido acético como fonte de carbono..... | 36 |
| 2.5.3   | Estratégias para o aumento da produção de biomassa e acumulação lipídica .....                                 | 37 |
| 2.5.3.1 | Produção de biomassa em modo <i>batch</i> e <i>fed-batch</i> em <i>erlenmeyer</i> .....                        | 37 |
| 2.5.4   | Ensaio de aumento de escala em reator biológico.....   | 38 |
| 2.6     | Métodos analíticos .....   | 39 |
| 2.6.1   | Leitura da densidade ótica .....   | 39 |
| 2.6.2   | Determinação do peso-seco.....   | 39 |
| 2.6.3   | Quantificação de lípidos neutros.....  | 40 |
| 2.6.4   | Quantificação de unidades formadoras de colónias .....   | 41 |
| 2.6.5   | Quantificação do ião amónio .....  | 42 |
| 2.6.6   | Quantificação dos açúcares solúveis e do ácido acético.....  | 43 |
| 2.6.7   | Extração dos lípidos totais.....   | 44 |
| 2.6.8   | Análise do perfil em ácidos gordos .....   | 45 |
| 2.6.9   | Extração de carotenoides totais.....   | 45 |
| 2.6.10  | Análise do perfil em carotenoides.....   | 46 |
| 2.7     | Parâmetros cinéticos do crescimento celular .....  | 46 |
| 2.7.1   | Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) .....   | 46 |
| 2.7.2   | Produtividade volumétrica de lípidos .....   | 47 |
| 2.7.3   | Produtividade específica de lípidos.....   | 47 |
| 2.7.4   | Rendimento de lípidos em função da biomassa .....  | 47 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.7.5 | Rendimento de lípidos em função do substrato .....   | 47 |
| 2.7.6 | Rendimento de biomassa em função do substrato .....  | 48 |
| 2.7.8 | Tratamento estatístico .....   | 48 |
| 3.    | Resultados e discussão .....   | 49 |
| 3.1   | Determinação do melhor rácio C/N utilizando resíduo em ácido acético como fonte de carbono .....               | 49 |
| 3.1.1 | Determinação do melhor rácio de C/N com resíduo de ácido acético como fonte de carbono em meio inorgânico..... | 49 |
| 3.1.2 | Determinação do melhor rácio de C/N com resíduo de ácido acético como fonte de carbono em meio orgânico.....   | 59 |
| 3.2   | Estratégias de produção com a utilização de dois resíduos agroindustriais como fonte de carbono .....          | 63 |
| 3.2.1 | Cultura da levedura <i>R. toruloides</i> em modo <i>fed-batch</i> .....  | 63 |
| 3.2.2 | Estratégia em STR combinando os dois resíduos agroindustriais como fonte de carbono .                          | 67 |
| 3.3   | Análise do perfil lipídico em ácidos gordos produzidos pela levedura .....                                     | 73 |
| 3.4   | Identificação e quantificação dos carotenoides produzidos pela levedura <i>R. toruloides</i> em STR .....      | 76 |
| 4.    | Conclusão e perspectivas futuras .....   | 81 |
| 4.1   | Conclusão.....   | 81 |
| 4.2.  | Perspetivas futuras .....  | 83 |
|       | Bibliografia .....   | 85 |

## Índice de figuras

---

- Figura 1** - Esquema da utilização dos combustíveis fósseis e biocombustíveis nos transportes (adaptado de Demirbas *et al.*)<sup>11</sup>.....4
- Figura 2** - Esquema representativo da conversão de diferentes fontes de biomassa em diferentes tipos de biocombustíveis (adaptado de HO *et al.*)<sup>3</sup>..... 6
- Figura 3** - Reação de conversão transesterificação de um triacilglicerídeo (TAG) em esteres metílicos de ácidos gordos mais glicerol por transesterificação (adaptado de Meng *et al.*)<sup>15</sup>.. 7
- Figura 4** - Esquema representativo do fluxo celular malato/citrato, como precursores de Acetil-coA e NADPH, essenciais para a produção de TAG em MO. Os enzimas utilizados encontram-se numerados de 1 a 7. 1- Piruvato descarboxilase, 2- malato desidrogenase, 3- enzima málico, 4- piruvato desidrogenase, 5- citrato sintetase, 6- ATP citrato liase, 7- citrato/malato translocase. (Adaptado de Ratledge *et al.*)<sup>46</sup>..... 13
- Figura 5** - Esquema da síntese de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados (adaptado de Ratledge *et al.*)<sup>46</sup>.....16
- Figura 6** - Corpo lipídico (Lipidic Body-LB) com gotas lipídicas no interior (L) (adaptado de Ageitos *et al.*)<sup>19</sup> ..... 17
- Figura 7** - Esquema representativo da síntese de TAG (adaptado de Sorger *et al.*)<sup>53</sup>.....18
- Figura 8** - Estruturas moleculares dos carotenos produzidos pela levedura *R. Toruloides* CECT 1499: torularodina; toruleno; β-caroteno (adaptado de Jie *et al.*)<sup>24</sup>. ..... 27
- Figura 9** - Curva padrão da trioleína; As unidades de fluorescência de trioleína foram obtidas através do método descrito por Kimura *et al.*<sup>78</sup>. Equação da regressão linear obtida: [Unidades de Fluorescência, UF]= $2,274 \times 10^3$ [Concentração g/L];  $R^2=0,9904$ , valores médios (n=3) ± erro padrão. .... 41
- Figura 10** - Curva padrão do íão amónio, obtida pelo método descrito por Weatherburn *et al.*<sup>80</sup>. Equação da regressão linear obtida: Abs =  $0,6151$ [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>g/L]- 0,0036;  $R^2=0,9985$ , valores médios (n=3) ± erro padrão..... 43
- Figura 11** - Perfis de crescimento, acumulação lipídica e consumo de azoto pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em meio inorgânico com diferentes concentrações de ácido acético (Ace): (A) 3 g/L; (B) 6 g/L; (C) 9 g/L; (D) 12 g/L; (E) 15g/L; com rácios de 55, 58, 62, 65 e 70, respetivamente. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer* durante 316h, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores medios (n=3) ± erro padrão..... 50

- Figura 12** - Curva do consumo de substrato ao longo de 316 h de cultura pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes rácios C/N, e fonte de carbono a (A) 3 g/L; (B) 6 g/L; (C) 9 g/L; (D) 12 g/L; (E) 15 g/L de ácido acético; com rácios de 55, 58, 62, 65 e 70, respetivamente. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão..... 51
- Figura 13** - Células viáveis da levedura *R. toruloides* CECT 1499 crescidas em meio com resíduo rico em ácido acético como fonte de carbono, com concentrações de 3, 6, 9, 12 e 15 g/L. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão..... 53
- Figura 14** - Efeito do rácio C/N na produção de biomassa (barras) e lípidos neutros (linha) pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 após o *fed-batch* com adição de glucose a 10 g/L como fonte de carbono. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer*, por 316 h, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão..... 54
- Figura 15** - Perfis de crescimento, acumulação lipídica e consumo de azoto pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes concentrações de ácido acético (Ace): (A) 3 g/L de Ace; (B) 6 g/L de Ace; (C) 9 g/L Ace; (D) 12 g/L Ace; (E) 15 g/L Ace; com rácios de 55, 58, 62, 65 e 70, respetivamente. Às 316 h de cultura foi feito um *fed-batch* com 10 g/L de glucose assinalado com a seta preta. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão..... 56
- Figura 16** - Curva do consumo de substrato ao longo de 316 h de cultura pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes rácios C/N, e fonte de carbono inicial a (A) 3 g/L; (B) 6 g/L; (C) 9 g/L; (D) 12 g/L; (E) 15 g/L de ácido acético; com rácios de 55, 58, 62, 65 e 70, respetivamente; às 316 h de cultura foi feito um *fed-batch* com 10 g/L de glucose assinalado com a seta preta. Os crescimentos foram realizados em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão..... 57
- Figura 17** - Efeito do rácio C/N na produção de biomassa (barras) e lípidos neutros (linha) pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 após o *fed-batch* com adição de glucose a 10 g/L como fonte de carbono. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão..... 58
- Figura 18** - Perfis de crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com concentração inicial de um resíduo à base de ácido acético com concentrações de: (A) 3 g/L; (B) 6 g/L, (C) 9 g/L, (D) 12 g/L e (E) 15 g/L. Os crescimentos foram realizados em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C..... 61
- Figura 19** - Perfis de crescimento (triângulos), acumulação lipídica (quadrados) e consumo de carbono (círculos) pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em meio com 9 g/L de ácido acético como fonte de carbono, em modo *fed-batch*. A seta indica a realização do *fed-Batch* às 216 h. Os crescimentos foram realizados em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão..... 65

## Índice de figuras

- Figura 20** - Perfil de crescimento em STR da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com 70 g/L de resíduo de alfarroba como fonte de carbono, com a realização de um *fed-batch* com 15 g/L de ácido acético às 188 h de cultura (A) e 77 h (B), assinalados com uma seta preta. O crescimento foi realizado em reator STR, a 250 rpm, 1 vvm e  $30 \pm 1$  °C. Valores medios (n=3)  $\pm$  erro padrão. ....69
- Figura 21** - Culturas de levedura *R. toruloides* CECT 1499 em placas com meio sólido YPD; na placa A) as trocas gasosas foram limitadas pelo vácuo criado na placa por se apresentar selada, na cultura da placa B) não houve limitação de trocas gasosas. As culturas foram mantidas a  $30 \pm 1$  °C durante 100h.....70
- Figura 22** - Cromatograma dos carotenoides obtidos da levedura *R. toruloides* CECT 1499. Os picos apresentados correspondem aos compostos: A) torularodina; B) toruleno; C) Y-caroteno e D)  $\beta$ -caroteno..... 76
- Figura 23** - Imagem das culturas em *erlenmeyer* após 400 h de cultura com **A)** 9 g/L de Ace, **B)** 9 g/L alfarroba e **C)** 70 g/L alfarroba..... 79
- Figura 24** - Imagem das culturas em *erlenmeyer* após 400 h de cultura em ácido acético (3-15 g/L) .....79

## Índice de Tabelas

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Propriedades físico-químicas do biodiesel estabelecidas pela Norma Europeia EN14214 <sup>16</sup> . .....   | 8  |
| <b>Tabela 2</b> - Acumulação lipídica máxima de diferentes espécies de leveduras, com diferentes fontes de carbono como substrato. ....   | 11 |
| <b>Tabela 3</b> - Acumulação lipídica por diferentes estirpes da levedura <i>R. toruloides</i> com diferentes rácios C/N, utilizando diferentes fontes de carbono. ....   | 20 |
| <b>Tabela 4</b> - Parâmetros cinéticos do crescimento e acumulação lipídica pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 em diferentes rácios C/N, com ácido acético como fonte de carbono, os crescimentos foram realizados em modo descontínuo, em balão <i>erlenmeyer</i> , durante 316 h a 200 rpm e 30 ± 1 °C. Valores médios (n=3) ± erro padrão.....   | 51 |
| <b>Tabela 5</b> - Parâmetros cinéticos do crescimento e acumulação lipídica pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 em diferentes rácios C/N, com ácido acético como fonte de carbono. Os crescimentos foram realizados em <i>fed-batch</i> , em que às 316 h foram adicionados 10 g/L de glucose. As culturas decorreram em balão <i>erlenmeyer</i> , durante 500 h a 200 rpm e 30 ± 1 °C. Valores médios (n=3) ± erro padrão. .... | 57 |
| <b>Tabela 6</b> - Parâmetros cinéticos do crescimento e acumulação lipídica pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 em diferentes concentrações de ácido acético como fonte de carbono, em meio orgânico. Os crescimentos foram realizados em modo descontínuo, em balão <i>erlenmeyer</i> , durante 200 h a 200 rpm e 30 ± 1°C. Valores médios (n=3) ± erro padrão. ....  | 62 |
| <b>Tabela 7</b> - Parâmetros cinéticos do crescimento e acumulação lipídica pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 em resíduo de ácido acético e resíduo de alfarroba como fontes de carbono. Os crescimentos foram realizados em modo <i>fed-batch</i> , em balão <i>erlenmeyer</i> , durante 500 h a 200 rpm e 30 ± 1 °C. Valores médios (n=3) ± erro padrão. ....  | 64 |
| <b>Tabela 8</b> - Parâmetros cinéticos do crescimento e acumulação lipídica pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 em resíduo de alfarroba como fonte de carbono inicial, com um <i>fed-batch</i> de 15 g/L de ácido acético. Os crescimentos foram realizados em reator STR, durante 400 h a 200 rpm e 30 ± 1 °C. Valores médios (n=3) ± erro padrão.....  | 68 |
| <b>Tabela 9</b> - Perfil de ácidos gordos produzidos pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 crescida em meio com alfarroba como fonte de carbono inicial e <i>fed-batch</i> de ácido acético às 188h e às 70 h de cultura, comparados com os perfis de ácidos gordos de outras estirpes crescidas em diferentes fontes de carbono, e também óleos vegetais usados para a produção de biodiesel. ....                                | 74 |

## Índice de tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 10</b> - Análise cromatográfica dos carotenoides, tempo de retenção e quantidades de carotenoides produzidos pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499 em reator STR. ....                     | 77 |
| <b>Tabela 11</b> - Perfil dos carotenoides produzidos pela levedura <i>R. toruloides</i> CECT 1499, e comparação com resultados obtidos por outros autores, utilizando resíduos como fonte de carbono. .... | 78 |

# 1. Introdução

---

## 1.1 Estado da arte

Nas últimas três décadas, com o aumento da população mundial e o avanço tecnológico a que se tem vindo a assistir, tornou-se inegável o facto dos recursos energéticos não renováveis como os combustíveis fósseis, serem cada vez mais escassos e inviáveis para colmatar as necessidades energéticas da população num futuro próximo<sup>1-3</sup>.

Estima-se que a nível mundial cerca de 80% de toda a energia consumida deriva de combustíveis fósseis como o petróleo, o carvão e o gás natural<sup>3-5</sup>. O setor dos transportes por si só constitui uma parte significativa da energia consumida, sendo que, só na União Europeia (UE), representa mais de 30% do consumo energético total<sup>6</sup>.

Além da escassez, acresce-se ainda o fator ambiental, nomeadamente o aumento do efeito de estufa e consequentes alterações climáticas como o aquecimento global, causado pela emissão de gases de efeito de estufa (GEE), como CO<sub>2</sub>, o NO<sub>x</sub>, o SO<sub>2</sub> e outros poluentes atmosféricos, que são gerados na combustão dos produtos derivados dos combustíveis fósseis. Estudos indicam que cerca de 80% de todos os gases responsáveis pelo aumento do efeito de estufa, sejam gerados na transformação energética deste tipo de combustíveis<sup>5,7</sup>.

Com o objetivo de diminuir as emissões de GEE, o Parlamento Europeu e o Conselho da UE criaram a diretiva 2009/28/EC para a promoção do uso de energias renováveis como alternativa aos combustíveis fósseis, onde estabelece que até 2020, 20% de toda a energia consumida na UE deve ser proveniente de fontes renováveis, e que cada estado-membro deve incorporar pelo menos 10% de biocombustíveis nos combustíveis utilizados no setor dos transportes<sup>3,5</sup>.

A esta diretiva junta-se ainda a diretiva 2009/30/EC, onde são definidos padrões de qualidade para os combustíveis e biocombustíveis utilizados na indústria automóvel, tendo sido criado um Comité Europeu de standardização (CEN) comité técnico 19, do qual fazem parte especialistas de diferentes áreas que envolvem o consumo ou produção de energia proveniente de biocombustíveis líquidos<sup>8</sup>.

Com o objetivo de melhorar as diretivas 2009/28/EC e 2009/30/EC foi ainda criada em 2015 a diretiva (EU)2015/1513, onde se dá ênfase à necessidade de regular a produção de biocombustíveis de 1ª geração, produzidos a partir de matérias-primas agrícolas que têm como grande desvantagem o recurso a produtos comestíveis e a utilização de grandes áreas de solos férteis para a agricultura alimentar. Assinalando carência de desenvolvimento de biocombustíveis de 2ª e 3ª geração produzidos a partir de resíduos agroindustriais e urbanos ou biomassa microbiana, os quais não competem com produtos comestíveis.

As diretivas 2009/28/EC e 2009/30/EC foram transpostas pelo Decreto-lei nº 117/2010, posteriormente alterado pelo Decreto-Lei n.º 6/2012. Estes decretos-lei foram posteriormente alterados de forma a ir de encontro aos requisitos da nova Diretiva (EU)2015/1513 estabelecida pela União Europeia, pelo decreto-lei n.º 69/2016 que define assim os critérios de sustentabilidade da produção e utilização dos biocombustíveis visando uma produção não só viável a nível económico, como também sustentável a nível ambiental<sup>9</sup>.

Tendo em vista as diretivas e os decretos-lei criados pela UE, e tendo em conta que cerca de 50% de toda a energia consumida na UE é importada, e que só em Portugal importamos 85% da nossa energia, tornou-se uma prioridade o desenvolvimento de novas formas de produção de energias renováveis, nomeadamente no que diz respeito aos biocombustíveis destinados ao setor dos transportes<sup>5</sup>.

## 1.2 Energias renováveis e biocombustíveis

O termo de Energias Renováveis (ER) engloba qualquer forma de energia proveniente de fonte inesgotável, ou renovável a curto-médio prazo, nomeadamente a energia eólica, energia solar, energia hidroelétrica, energia dos oceanos, energia geotérmica, biomassa e biocombustíveis, onde todas elas constituem alternativas energéticas, criando uma diversificação de fontes de energia, e diminuindo significativamente o recurso aos combustíveis fósseis como o petróleo, o carvão e o gás natural<sup>10</sup>.

No setor dos transportes as energias alternativas renováveis que demonstram ter potencial para substituir de forma eficaz os combustíveis fósseis como a gasolina e o gasóleo são os biocombustíveis líquidos, nomeadamente o bioetanol e o biodiesel<sup>6</sup>. O termo de

biocombustíveis, segundo a portaria nº 8/2012 designa qualquer combustível derivado de fonte biológica ou natural renovável, líquido ou gasoso, utilizados no sector dos transportes e produzidos a partir de biomassa, sendo a biomassa a fração orgânica, biodegradável de produtos ou resíduos agrícolas, animais, industriais e urbanos <sup>7</sup>.

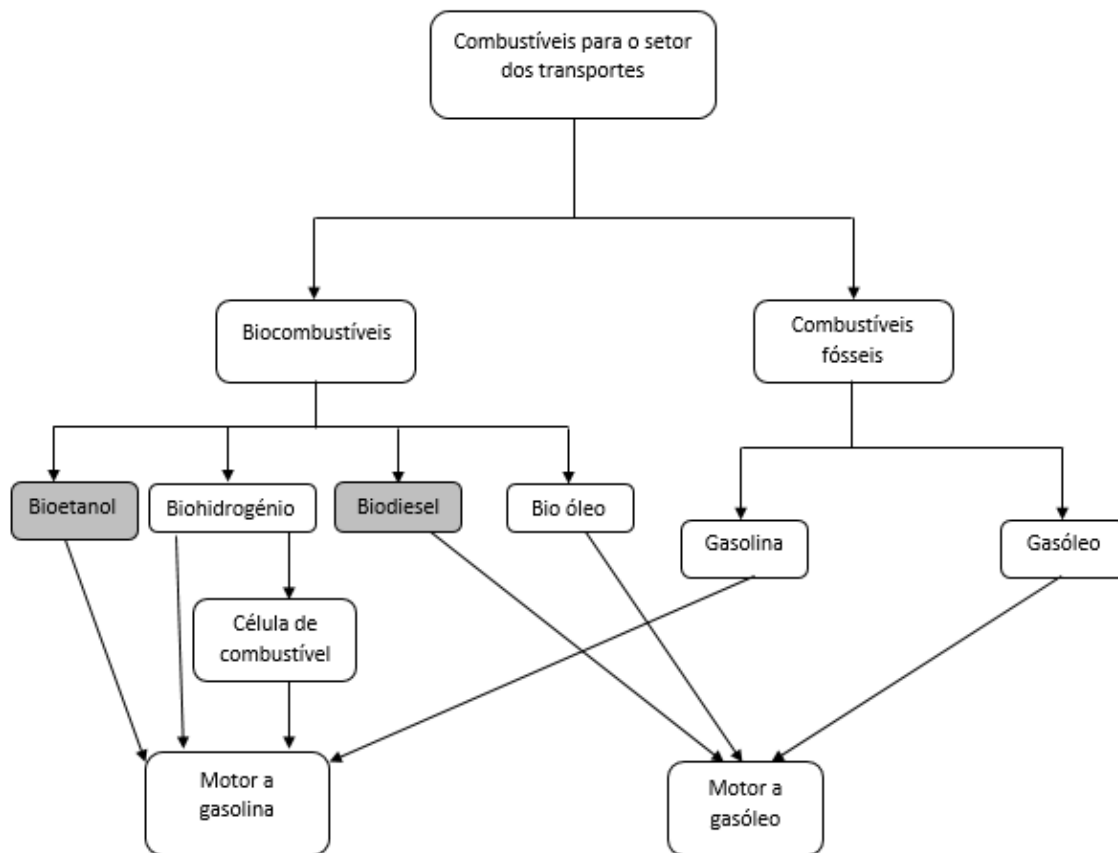
Os biocombustíveis podem ser classificados segundo a sua matéria-prima de origem, como biocombustíveis de 1ª, 2ª ou 3ª geração.

Os biocombustíveis de 1ª geração são obtidos a partir de culturas agrícolas alimentares, como milho, o girassol, a cana de açúcar, entre outros. Já os biocombustíveis de 2ª geração são produzidos a partir de resíduos agroindustriais não comestíveis, como os resíduos florestais lenhocelulósicos e resíduos agrícolas, industriais ou urbanos. Os de 3ª geração são provenientes de biomassa de fonte microbiológica como as leveduras, fungos filamentosos, microalgas e bactérias oleaginosas<sup>3,11</sup>.

Na atualidade mais de dois terços de todas as bioenergias são de 1ª geração, sendo produzidas a partir de biomassa comestível, como o bioetanol obtido a partir do milho e da cana de açúcar, o que torna insustentável a longo prazo a sua produção, devido à competição entre bens alimentares e recursos energéticos<sup>3</sup>. Esta realidade pode ser revertida com a produção de biocombustíveis de 2ª e 3ª geração, que tem vindo a ganhar terreno tanto no campo da investigação científica como na própria legislação a nível mundial<sup>3,12</sup>.

Existem diversos tipos de biocombustíveis, como o bioetanol, isopropanol, biobutanol, biometanol, bioglicerol, biohidrogénio, bioéter, biogás e o biodiesel.

De todos estes os mais promissores são o bioetanol e o biodiesel, quando utilizados como substitutos ou aditivos à gasolina e ao gasóleo, respetivamente, podendo ser incorporados nos meios de transporte sem necessidade de alterar os motores dos veículos<sup>2,4,11</sup>.



**Figura 1** - Esquema da utilização dos combustíveis fósseis e biocombustíveis nos transportes (adaptado de Demirbas *et al.*)<sup>11</sup>.

O bioetanol é o biocombustível mais utilizado na atualidade, sendo produzido a partir da fermentação alcoólica dos açúcares presentes na matéria-prima orgânica, de origem vegetal ou animal, ou ainda por consecutivas hidrólises seguidas de fermentação, no caso do milho rico em amido<sup>3</sup>. A nível mundial estima-se que o consumo de bioetanol no setor dos transportes represente 3,6% de todo o combustível utilizado, sendo o Brasil o maior produtor mundial com uma cota de 20% seguindo-se os Estados Unidos com 4% e a EU com 3%<sup>3</sup>. A produção de bioetanol na presente data é maioritariamente de 1ª geração, o que representa uma competição direta entre bens alimentares e este biocombustível, não só pela matéria-prima que é a mesma, como também pelos terrenos agrícolas férteis para o cultivo culturas alimentares. No entanto diversos esforços têm sido feitos para que haja uma regulação da sua produção, bem como para a implementação de novas formas de produção de bioetanol de 2ª geração obtido a partir de resíduos agroindustriais, animais ou urbanos, que não compitam

com o setor alimentar. Outra alternativa é a produção de biodiesel de 3ª geração, obtido a partir da biomassa de microrganismos oleaginosos, este tipo de biocombustíveis apresenta uma solução mais sustentável a nível económico e ambiental pois não compete nem com os terrenos agrícolas férteis nem com os bens alimentares<sup>3,11,13</sup>.

### 1.2.1 A importância da biomassa

Biomassa é o termo utilizado para descrever material orgânico, não fossilizado, derivado de plantas, animais e microrganismos, incluindo resíduos agroindustriais, animais, florestais e urbanos<sup>5</sup>.

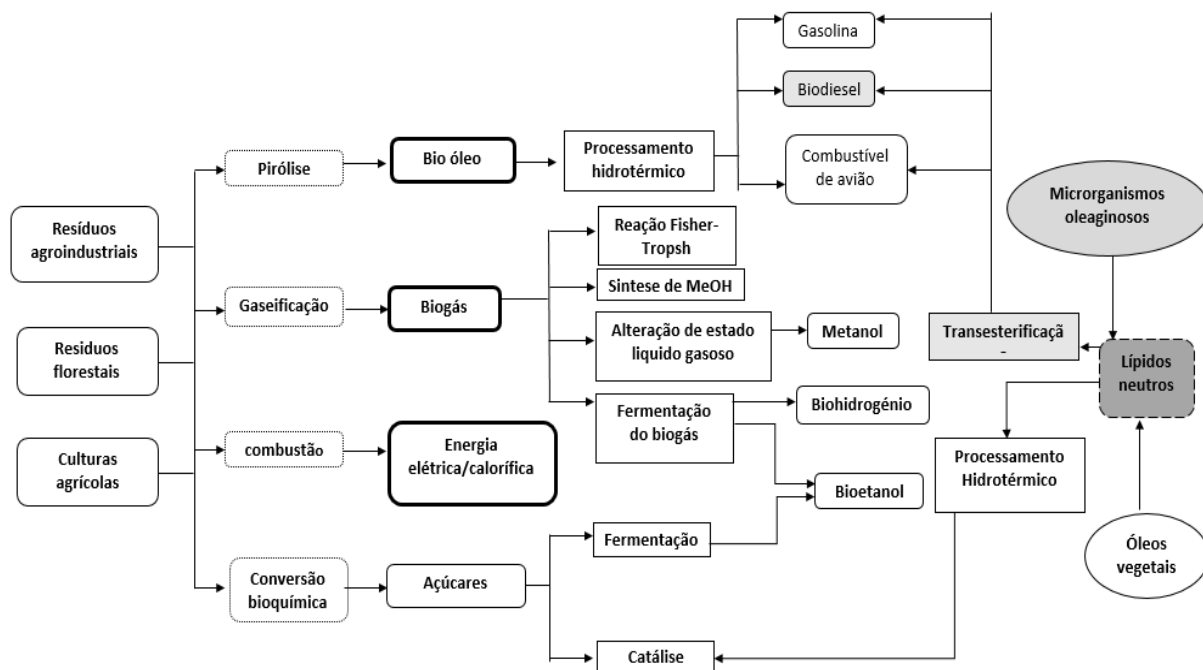
A utilização de biomassa como fonte energética remonta há milénios atrás quando se começou a utilizar a madeira para fazer fogo. Em muitos países, na atualidade a queima do carvão e resíduos florestais representa ainda a principal fonte de energia elétrica para a sua população<sup>5</sup>.

Existem pelo menos três formas de utilizar a biomassa, esta pode ser queimada para a produção de energia elétrica, transformada termoquimicamente em combustíveis gasosos como o metano, o hidrogénio e o monóxido de carbono, e líquidos, como o bioetanol e o biodiesel<sup>11</sup>.

Nas últimas décadas a biomassa tem ganho uma importância acrescida, sendo hoje em dia considerada como uma fonte alternativa, renovável e sustentável de energia.

Isto acontece por três fatores principais: o primeiro é o facto de se utilizarem diversos tipos de resíduos agroindustriais e florestais baixa o custo de produção podendo ser considerada uma fonte renovável, tendo em conta o exponencial crescimento da população mundial que gera cada vez mais este tipo de resíduos, só em Portugal estima-se que sejam produzidas 2,2 mil toneladas de resíduos florestais<sup>5</sup>; o segundo fator é a sua utilização não contribuir para o aumento do nível de GEE; O terceiro é o facto de os processos tecnológicos de obtenção de energia a partir da biomassa estarem cada vez mais avançados, permitindo diminuir os custos de produção e oferecendo assim um potencial concorrente aos combustíveis fósseis não só a nível ambiental como também a nível económico<sup>11</sup>.

Para além dos resíduos florestais e agrícolas, outra fonte renovável e sustentável de biomassa são os microrganismos, nomeadamente as leveduras, microalgas e bactérias. Alguns destes microrganismos têm a capacidade de acumular grandes quantidades de óleos, muito semelhantes aos óleos vegetais, que podem ser transformados em biodiesel, um potencial substituto do gasóleo. A cultura destes microrganismos é renovável pois a sua taxa de crescimento é elevada e têm um ciclo de vida muito curto quando comparados com culturas vegetais, desta forma podem proporcionar uma fonte inesgotável de biomassa para a produção de biodiesel<sup>3,4,14</sup>.

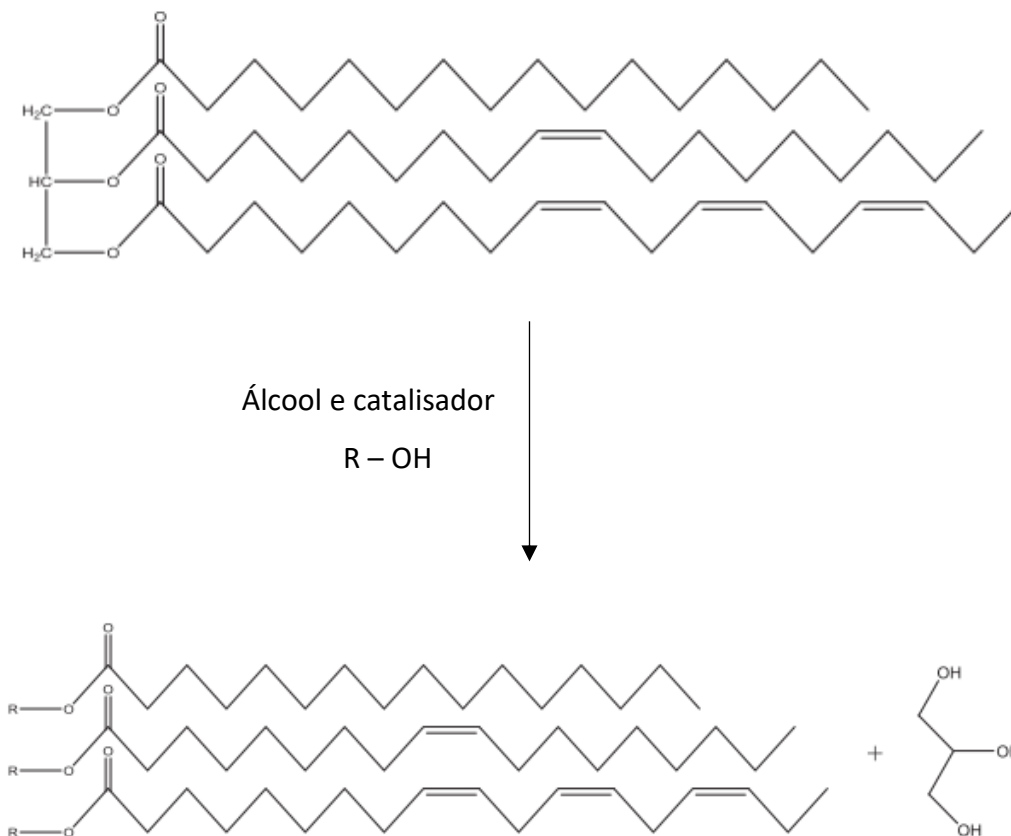


**Figura 2** - Esquema representativo da conversão de diferentes fontes de biomassa em diferentes tipos de biocombustíveis (adaptado de HO *et al.*)<sup>3</sup>.

## 1.2.2 Biodiesel

O biodiesel é um potencial substituto do gasóleo, sendo produzido a partir de uma reação de transesterificação de óleos vegetais, gorduras animais ou óleos de cozinha usados. Esta reação consiste na transformação dos Triacilglicerídeos (TAG), constituintes dos óleos vegetais, com cadeias de carbono entre os 12 e os 22 átomos de carbono, em ésteres metílicos de ácidos gordos (*Fatty acid methyl ester* – *FAME*), precursores do biodiesel. Esta

transformação consegue-se utilizando metanol ou etanol na presença de um catalisador, como o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH) ou enzimas, dando origem a ésteres de metilo e glicerol (figura 3). O produto obtido apresenta assim características semelhantes ao gasóleo convencional, podendo competir com o mesmo em termos de eficiência e pegada ecológica.



**Figura 3** - Reação de conversão transesterificação de um triacilglicerídeo (TAG) em ésteres metílicos de ácidos gordos mais glicerol por transesterificação (adaptado de Meng *et al.*)<sup>15</sup>.

A mistura de ésteres que constituem o biodiesel pode ser caracterizada em relação as suas propriedades, que devem de estar de acordo com a norma Europeia de qualidade EN14214, tais como a densidade, viscosidade, volatilidade, ponto de inflamação, massa específica, ponto de combustão, calor de combustão e o numero de cetano (tabela 1)<sup>16</sup>.

**Tabela 1** - Propriedades físico-químicas do biodiesel estabelecidas pela Norma Europeia EN14214<sup>16</sup>.

| <b>Propriedades</b>           | <b>Valor</b>                |
|-------------------------------|-----------------------------|
| <b>Densidade 15°C</b>         | 860 – 900 Kg/m <sup>3</sup> |
| <b>Viscosidade a 40°C</b>     | 3,5 – 5 mm <sup>2</sup> /s  |
| <b>Ponto de inflamação</b>    | 120 °C                      |
| <b>Número de cetano</b>       | 51                          |
| <b>Estabilidade oxidativa</b> | 6 h                         |
| <b>Conteúdo em esteres</b>    | 96,5% (m/m)                 |
| <b>Conteúdo de água</b>       | 500 mg/Kg                   |

Quando comparado com os combustíveis fósseis, o biodiesel apresenta as vantagens de ser biodegradável, renovável, incorporar menos compostos sulfúricos e aromáticos e consequentemente apresentar menores emissões de GEE, proporcionar uma melhor lubrificação do motor e ainda ser mais seguro o seu transporte. No entanto apresenta também algumas desvantagens, como ter um valor energético mais baixo, uma menor potência de motor, custos de produção mais elevados e uma maior viscosidade<sup>2,3,11,17</sup>.

Os custos de produção do biodiesel são ainda o maior obstáculo à sua sustentabilidade e comercialização no mercado global. Na atualidade o biodiesel representa apenas cerca de 0,2% de todos os combustíveis utilizados nos transportes a nível mundial. Além dos custos de produção, o facto deste ser produzido maioritariamente a partir de culturas que competem com a alimentação humana e animal, como o milho, o girassol ou a soja, torna a sua utilização não sustentável<sup>3,11</sup>.

Tal como o Bioetanol, o biodiesel de 2ª geração, produzido a partir de resíduos agroindustriais ou urbanos, apresenta uma alternativa sustentável e renovável à produção deste tipo de biocombustível, no entanto a sua produção está dependente de diversos tipos de resíduos, sendo uma desvantagem a heterogeneidade das matérias-primas utilizadas, isto é, como provêm de diferentes tipos de resíduos de biomassa, o biodiesel produzido também

será heterogéneo, podendo apresentar diferenças na sua composição em FAME e consequentemente nas suas propriedades.

O biodiesel de 3ª geração, produzido a partir de microrganismos oleaginosos, como microalgas, fungos, leveduras e bactérias, apresenta uma alternativa promissora à produção de biodiesel derivado de culturas vegetais<sup>4,10,11,18,19</sup>.

A utilização de microrganismos para a produção de biodiesel apresenta inúmeras vantagens em relação ao biodiesel de 1ª e 2ª geração, nomeadamente o facto de não ser necessária a utilização de solos férteis, o seu cultivo não depender de sazonalidades, apresentar uma taxa de crescimento muito rápida relativamente às culturas agrícolas, não compete com culturas comestíveis e ainda podem produzir diversos compostos de valor acrescentado, como pigmentos, proteína, ácidos gordos essenciais e enzimas de interesse tecnológico<sup>11,15,19</sup>.

### 1.3 Microrganismos oleaginosos

Os microrganismos oleaginosos (MO), como algumas bactérias, fungos, leveduras ou algas, são caracterizados pela sua capacidade em produzir e acumular mais de 20% do seu peso seco em lípidos neutros intracelulares, sendo que esta percentagem pode ir até aos 80% em algumas espécies e com condições específicas de crescimento. Estes lípidos são maioritariamente compostos por triacilglicerídeos (TAGs), cerca de 90%, e alguns esterés de esterol, constituindo na sua totalidade os lípidos neutros intracelulares<sup>6,20-22</sup>.

Os TAG constituintes dos lípidos neutros intracelulares de MO são na sua maioria compostos por ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido linoleico, tendo assim uma composição similar aos TAG encontrados em óleos vegetais, como óleo de soja ou de girassol<sup>14,23-26</sup>.

Para além da capacidade em acumular lípidos neutros, muitos destes microrganismos produzem ainda outros tipos de compostos orgânicos com elevado valor comercial, como pigmentos naturais, ácidos gordos polinsaturados (PUFA), enzimas com interesse biotecnológico e compostos anti-oxidantes<sup>11,27</sup>. Estes coprodutos podem ser produzidos e extraídos dos microrganismos em simultâneo com a produção de lípidos, num contexto de Biorrefinaria, onde a biomassa gerada na cultura destes microrganismos é sujeita a processos

sequenciais que visam a extração e purificação dos diferentes compostos de interesse. Estes compostos têm um alto valor comercial em diferentes sectores, como as indústrias nutracêuticas, cosmética e alimentar<sup>6,7,26,28,29</sup>.

Entre os diferentes microrganismos referidos, as leveduras apresentam algumas vantagens, tais como, a existência de um maior número de espécies com potencial para a produção de biodiesel e uma melhor composição de TAG do que bactérias ou fungos, em relação às microalgas, possuem um menor tempo de crescimento, um processo de aumento de escala mais simples e não são afetadas pelas condições climáticas<sup>6,14,18,19</sup>.

As leveduras oleaginosas possuem características metabólicas específicas que lhes permitem sintetizar e acumular lípidos (TAG) a partir de substratos ricos em compostos com carbono, como dióxido de carbono, açúcares solúveis e ácidos orgânicos<sup>14,30</sup>. Estes compostos orgânicos ricos em carbono estão presentes em diversos tipos de resíduos agroindustriais e urbanos que podem servir de substrato ao cultivo das leveduras, representando assim uma matéria-prima de baixo custo, ajudando a reduzir os custos de produção do biodiesel, os quais representam ainda o maior entrave à produção e implementação deste tipo de biocombustível no mercado<sup>18,19,30-33</sup>.

De todas as espécies conhecidas de leveduras apenas 5% são consideradas oleaginosas conseguindo acumular mais de 20% do seu peso seco em lípidos. Entre elas as espécies mais estudadas são *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Lipomyces* e *Trichosporon*, tendo sido reportado que conseguem acumular até 80% do seu peso-seco em lípidos neutros<sup>19,22,33</sup>. A composição em TAG varia consoante a fonte de carbono fornecida e constituição do meio de cultura, originando diferentes perfis de ácidos gordos<sup>34</sup>. Na tabela 2 encontram-se alguns exemplos de leveduras e respetivos valores de lípidos acumulados.

**Tabela 2** - Acumulação lipídica máxima de diferentes espécies de leveduras, com diferentes fontes de carbono como substrato.

| Levedura                            | Biomassa (g/L) | Lípidos acumulados % | Fonte de carbono | Referência bibliográfica               |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|------------------|--|
| <i>Yarrowia lipolytica</i>          | 31,2           | 40,0                 | Glicerol + Ace   | Fontanille <i>et al.</i> <sup>35</sup> |
| <i>R. toruloides</i> <b>DSM 444</b> | 23,6           | 65,1                 | Glucose/NaCl     | Storofos <i>et al.</i> <sup>22</sup>   |
| <i>R. toruloides</i> <b>Y4</b>      | 39,6           | 56,5                 | Alcachofra*      | Wang <i>et al.</i> <sup>21</sup>       |
| <i>Trichosporoncutaneum</i>         | 3,2            | 65,0                 | Glucose          | Li <i>et al.</i> <sup>36</sup>         |
| <i>Lipomyces starkeyi</i>           | -----          | 68,0                 | Glucose          | Sitepu <i>et al.</i> <sup>34</sup>     |

\*Hidrolisado de Alcachofra

### 1.3.1 A levedura *Rhodospiridium toruloides*

Uma das leveduras oleaginosas que tem vindo a demonstrar grande potencial para a produção de biodiesel num futuro próximo é a levedura *Rhodospiridium toruloides*, tendo sido amplamente reportada a sua capacidade para sintetizar e acumular lípidos neutros intracelulares entre os 7 e os 79% do seu peso-seco<sup>37-39</sup>.

Esta levedura pertence à ordem *Sporidiobolales*, filo *Basidiomycota* e reino *Fungi*, e é um telemorfo das leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula gracilis*. Foi primeiramente reportada e estudada por Banno em 1967 e isolada a partir de Coníferas<sup>7,22,36,40,41</sup>.

É uma levedura estritamente aeróbia, mesófila e não patogénica. Apresenta uma pigmentação cor-de-rosa ou avermelhada, a qual se deve à produção de carotenoides, na maioria  $\beta$ -caroteno, que pode ser utilizado como precursor da vitamina A, antioxidante ou como pigmento natural. Esta levedura sintetiza ainda enzimas com elevado valor biotecnológico como a cefalosporina esterase, a epóxido hidrólase e a fenilalanina amónio-liase<sup>6,42-44</sup>.

Tem também sido reportada e demonstrada por diversos autores a capacidade de crescimento desta levedura em diferentes tipos de substratos, sendo capaz de assimilar e converter diferentes fontes de carbono em lípidos, nomeadamente resíduos gerados no setor agrícola e urbano, contendo compostos que são inibitórios ao crescimento de outras espécies

de leveduras, o que representa uma vantagem em relação a outras leveduras oleaginosas candidatas à produção de biodiesel<sup>22,32,40,45</sup>.

### 1.3.2 A acumulação lipídica em microrganismos oleaginosos

O mecanismo de biossíntese lipídica está presente em todos os microrganismos, oleaginosos e não oleaginosos, no entanto os microrganismos não oleaginosos (MNO) apenas conseguem acumular até 10% do seu peso-seco em lípidos, enquanto que os MO conseguem acumular até 80% de lípidos como material de reserva energética<sup>18,19,46</sup>.

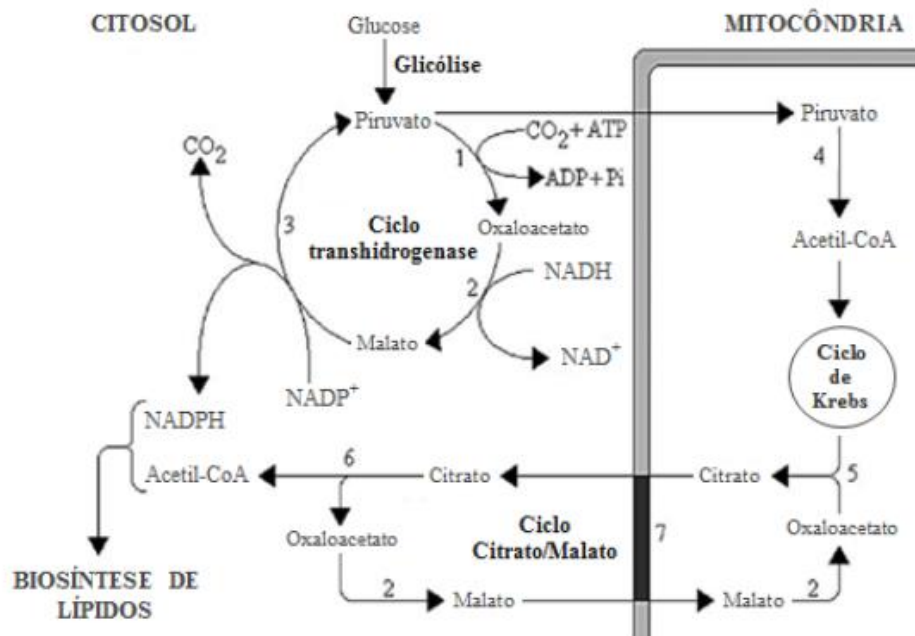
A acumulação lipídica nos microrganismos dá-se quando existe um excesso de carbono no meio e uma limitação nutricional. Geralmente o nutriente limitante é o azoto, o qual é essencial à replicação celular durante a fase exponencial do crescimento. Quando há o esgotamento da fonte de azoto, mas ainda existe fonte de carbono, este é assimilado e metabolizado em TAG, os quais são armazenados em corpos lipídicos no citosol das células. No entanto, como já foi referido, os MNO apenas acumulam até 10% de lípidos neutros, sendo que em situações como a descrita, onde se verifica o esgotamento da fonte de azoto, o excesso de carbono assimilado é convertido em diversos polissacarídeos, como o amido e o  $\beta$ -glucano<sup>19,46,47</sup>.

Sendo assim verifica-se que grande diferença entre os MNO e os MO não reside no mecanismo de biossíntese lipídica, mas sim na contínua disponibilidade de acetil-coenzima A (Acetil-CoA), precursor da síntese de TAG, no citosol das células dos MO. Isto acontece porque os MO produzem uma quantidade três a quatro vezes maior de citrato mitocondrial, precursor da síntese de Acetil-CoA, do que os MNO (figura 4). O excesso de citrato nas mitocôndrias é excretado para o citosol das células pelo ciclo malato/citrato, permitindo uma síntese contínua de Acetil-CoA através da reação 1<sup>18,19,46</sup>.



**(Reação 1)**

Nesta reação dá-se a síntese de Acetil-CoA a partir do citrato e coenzima A (CoA) na presença de ATP. Já nos MNO a reação 1 não se verifica sendo a Acetil-CoA produzida apenas durante a glicólise<sup>46</sup>.



**Figura 4** - Esquema representativo do fluxo celular malato/citrato, como precursores de Acetil-coA e NADPH, essenciais para a produção de TAG em MO. As enzimas utilizados encontram-se numerados de 1 a 7. 1- Piruvato descarboxilase, 2- malato desidrogenase, 3- enzima málico, 4- piruvato desidrogenase, 5- citrato sintetase, 6- ATP citrato liase, 7- citrato/malato translocase. (Adaptado de Ratledge *et al.*)<sup>46</sup>.

A característica que permite aos MO terem uma elevada concentração de citrato nas mitocôndrias é a dependência que a enzima isocitrato desidrogenase, responsável por catalisar a metabolização do isocitrato durante o ciclo de *Krebs*, tem da enzima Adenosina monofosfato (AMP). Por sua vez a concentração da enzima AMP é regulada pela enzima AMP-desaminase (Reação 2)<sup>19,46</sup>.

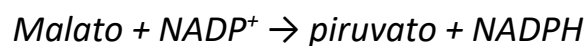


**(Reação 2)**

A enzima *AMP*-desaminase é regulada positivamente pela ausência de azoto no meio nutricional, apresentando até 5 vezes maior atividade a partir do momento em que este se esgota<sup>46</sup>. Com o aumento da atividade da *AMP*-desaminase há uma diminuição da

concentração de AMP, e consequente inatividade da enzima isocitrato desidrogenase que é dependente da AMP, esta inatividade por sua vez leva a uma acumulação de isocitrato não metabolizado na mitocôndria. O isocitrato em excesso é então convertido em citrato pela enzima aconitase que catalisa a sua isomerização. O citrato acumulado é transferido para o citosol pela enzima citrato translocase, entrando assim no ciclo malato/citrato. Uma vez no citosol o citrato é clivado pela ATP-citrato liase dando origem a Acetil-CoA e oxaloacetato (reação 1). O oxaloacetato é ainda convertido em malato pela malato-desidrogenase, o qual é reutilizado no sistema de saída do citrato na membrana da mitocôndria<sup>19,46,48,49</sup>.

Para além da produção contínua de Acetil-coA, os MO são também capazes de produzir elevadas quantidade de NADPH, um redutor essencial na síntese dos TAG. Por cada mol de ácidos gordos com uma cadeia de 18 carbonos produzidos, são necessárias 16 moles de NADPH. O NADPH é produzido a partir do malato pela sua conversão em piruvato através da ação do enzima málico (reação 3)<sup>19,46,50</sup>.



### (Reação 3)

A atividade do enzima málico tem sido reportada até à data apenas em MO, sendo que é sugerido a formação de um complexo enzimático com a enzima ACL e a sintetase de ácidos gordos (*fatty-acid synthase-FAS*), o qual será responsável pela canalização do Acetil-CoA para produção de TAG<sup>46,47</sup>.

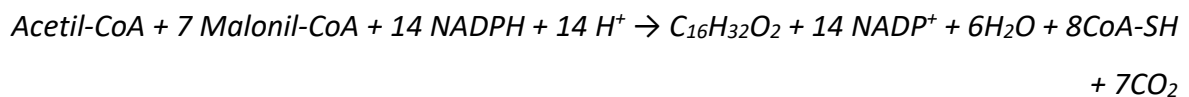
Apesar deste complexo estar presente na maioria dos MO, existem algumas exceções como as leveduras *Lipomyces* sp. ou *Candida* sp., o que sugere a existência de outras enzimas capazes de sintetizar o NADPH, como a enzima isocitrato desidrogenase NADPH-dependente citosólica<sup>46,51</sup>.

### 1.3.3 Síntese de ácidos gordos

A síntese de ácidos gordos acontece no citosol e é conseguida pela ação do complexo enzimático FAS, o qual vai utilizar o Acetil-CoA como unidade iniciadora da síntese de cadeias alifáticas e o malonil-CoA como unidade de alongamento, fornecendo 2 carbonos a cada

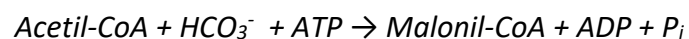
passo. É também essencial a presença de 2 moles de NADPH por cada passo de Alongamento, como referido na secção 1.3.3<sup>46,49,51</sup>.

Assim sendo, para formar um ácido gordo com uma cadeia de 16 carbonos, são necessárias uma mol de Acetil-CoA, 7 de malonil-CoA e 14 de NADPH, como representado na reação 4<sup>52</sup>.



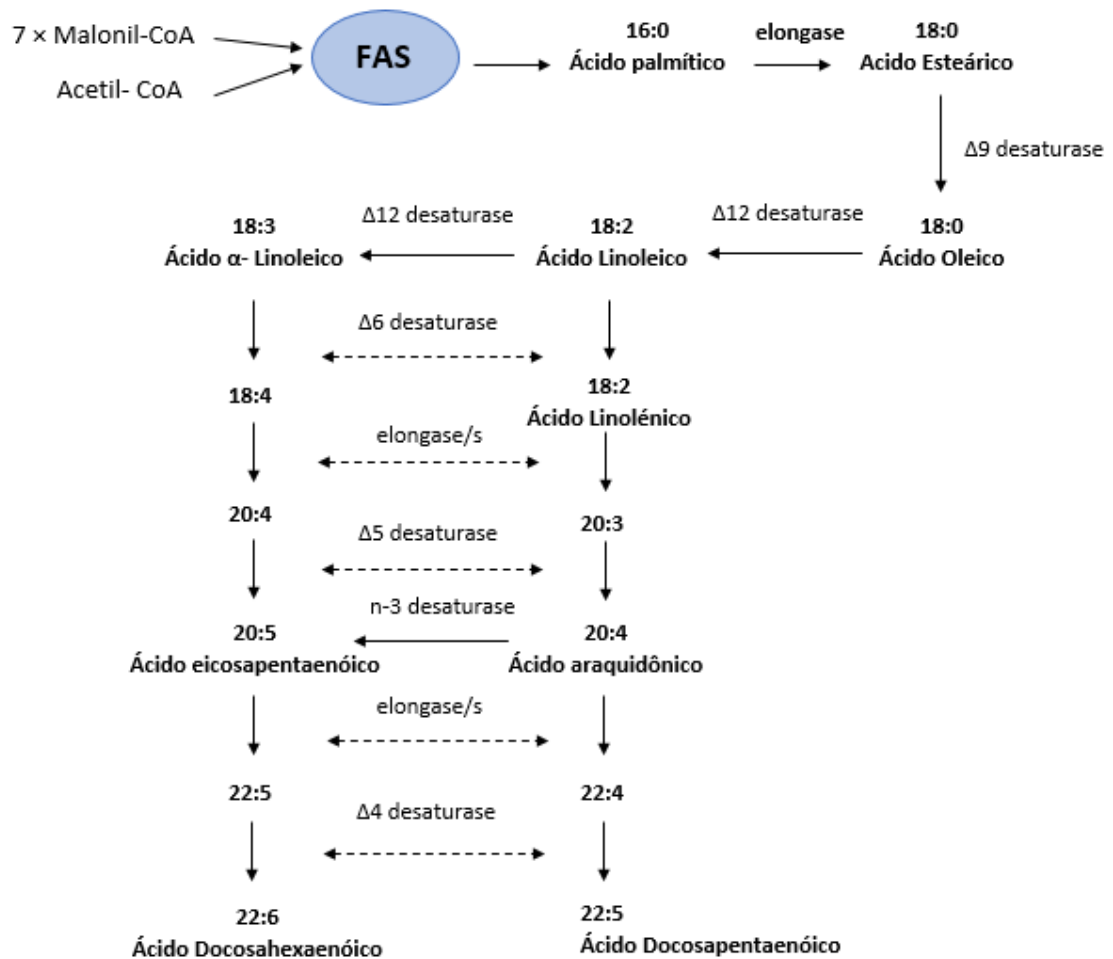
**(reação 4)**

Por sua vez, o malonil-CoA é formado a partir da condensação da Acetil-CoA com um anião bicarbonato (reação 5), reação catalisada pela enzima Acetil-coA carboxilase (ACC), a qual é assim uma das enzimas essenciais à síntese de TAG<sup>51</sup>.



**(Reação 5)**

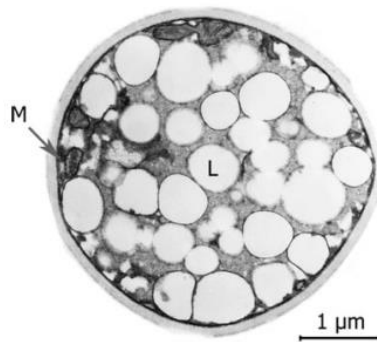
Os ácidos gordos obtidos são saturados e possuem cadeias com 14 a 16 carbonos, estes serão posteriormente alongados e ou desnaturados por enzimas no reticulo endoplasmático, e darão origem a diferentes tipos de ácidos gordos, saturados, insaturados e polinsaturados, com 16 a 18 carbonos<sup>15,19,46</sup>.



**Figura 5** - Esquema da síntese de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados (adaptado de Ratledge *et al.*)<sup>46</sup>.

### 1.3.4 Formação de Triacilglicerídeos (TAG)

Os ácidos gordos obtidos no FAS são modificados através da via metabólica de acumulação lipídica, dando origem aos TAG. Os TAG são lípidos neutros e representam a principal forma de reserva energética em microrganismos eucariotas. Estes são formados no retículo endoplasmático ou nos corpos lipídicos (*lipidic Bodies -LB*) (figura 6) a partir de três acilações consecutivas, catalisadas por aciltransferases, sendo os grupos fosfato eliminados por fosfatases específicas<sup>19,49,53</sup>.



**Figura 6** - Corpo lipídico (*Lipidic Body-LB*) com gotas lipídicas no interior (L) (adaptado de Ageitos *et al.*)<sup>19</sup>.

A produção de TAG envolve ainda a síntese do ácido fosfatídico (*phosphatic acid-PA*) e do diacilglicerol (DAG), principais precursores na via de síntese lipídica.<sup>19,49,53</sup>

A síntese de PA é obtida pela acilação do ácido liso-fosfatídico (LPA) catalisada pela enzima 1-acil-G-3-P aciltransferase (AGAT). Por sua vez o LPA é previamente sintetizado por duas vias alternativas. Numa das vias o G-3-P, originado a partir da ação da enzima glicerol quinase no glicerol, sofre uma acilação pela G-3-P aciltransferase (GAT) originando o LPA. Na outra via o DHAP é acilado pela DHAP aciltransferase (DHAPAT), formando-se o 1-acil-DHAP, que por sua vez é reduzido a LPA pela ação da enzima 1-acil-DHAP redutase (ADR)<sup>19,49,53,54</sup>.

A síntese do DAG dá-se então pela desfosforilação do PA, reação catalisada pela enzima fosfatase do ácido fosfatídico, dando assim origem ao DAG, segundo precursor da via de síntese lipídica<sup>19,53</sup>.

Por fim, os TAG podem ser produzidos por duas vias diferentes de acilação do DAG, uma dependente do Acil-CoA e outra independente. Na primeira, o grupo Acil do Acil-CoA é transferido para o DAG pela enzima diacilglicerol aciltransferase, originando-se o TAG. Na via independente o grupo acilo é obtido a partir dos fosfolípidos, sendo que o DAG sofre uma acilação pela enzima fosfolípido-diacilglicerol aciltransferase, formando-se os TAG<sup>19,38,49,53,54</sup>.

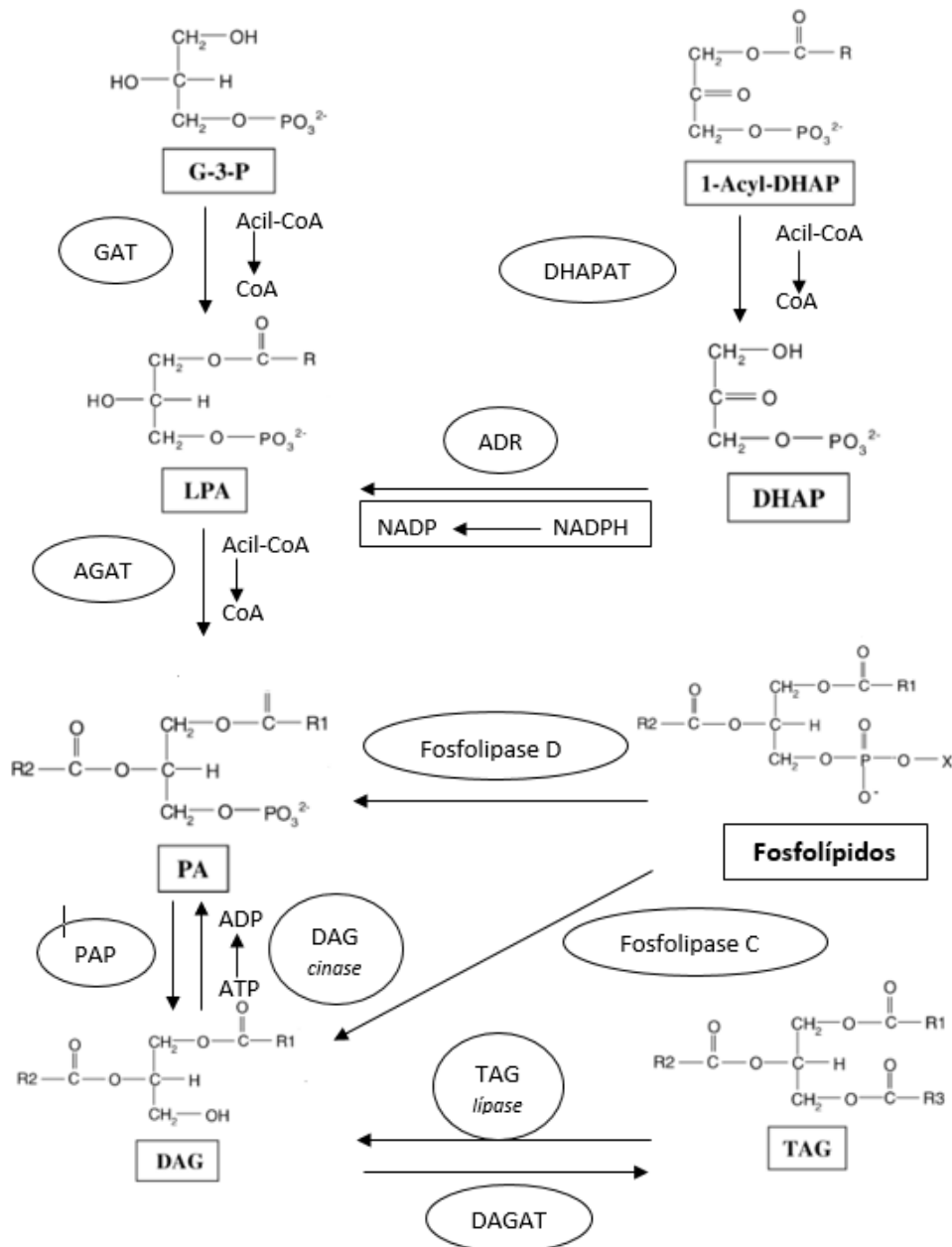


Figura 7 - Esquema representativo da síntese de TAG (adaptado de Sorger *et al.*)<sup>53</sup>.

### 1.3.5 Fatores que influenciam a acumulação lipídica em microrganismos oleaginosos

Existem alguns fatores externos que podem ser controlados de forma a induzir a acumulação lipídica nos microrganismos oleaginosos durante uma cultura, com o intuito de potenciar a produção de biomassa e lípidos neutros. Os fatores mais estudados e reportados

são o pH, a temperatura, a limitação de nutrientes, os parâmetros operacionais, a transferência de oxigênio e a concentração de iões metálicos e sais orgânicos<sup>19,34</sup>.

O valor ótimo de pH depende do MO utilizado, este pode variar entre 3 e 7 sendo que para a levedura *R. toruloides* tem sido reportado estar entre os 5,5 e os 6<sup>34,37,55</sup>.

Quanto à temperatura, para além de influenciar a acumulação lipídica, influencia também a sua composição, sendo que a temperatura ideal deve-se encontrar entre os 25 e os 30 °C. Em grande parte da literatura a temperatura utilizada para o cultivo da *R. toruloides* é de 30 °C<sup>14,34</sup>.

A salinidade do meio de cultura foi recentemente reportada por Stoforos *et al.*<sup>22</sup> como sendo um parâmetro com influência na acumulação lipídica, tendo conseguido uma acumulação de lípidos de 77% em relação ao seu peso-seco, em meio de cultura contendo 0,4% de NaCl e glucose como fonte de carbono<sup>22</sup>.

Apesar dos vários fatores mencionados influenciarem de algum modo a acumulação de lípidos, esta só é iniciada quando se dá o esgotamento de algum nutriente essencial à proliferação celular sem esgotar a fonte de carbono. Diversos estudos reportam que nutriente limitante que mais influência a acumulação lipídica é o azoto (N), sendo que, quando se verifica o esgotamento deste nutriente a cultura cessa a sua proliferação celular, e todo o carbono no meio é canalizado para a produção de TAG. Este parâmetro pode assim ser definido como o rácio C/N<sup>18,19,34,46</sup>.

### 1.3.5.1 Influência do rácio molar C/N na acumulação lipídica

Diversos autores referem a limitação nutricional do azoto como o fator que mais influência tem na acumulação lipídica<sup>15,18,19,41</sup>. Num estudo realizado por Sitepu *et al.*<sup>34</sup>, a 79 espécies diferentes de MO, os investigadores obtiveram uma acumulação lipídica superior a 20%, em relação ao peso seco, em 60% das espécies testadas em condições limitantes de azoto<sup>34</sup>.

Tal como descrito na secção 1.3.2, a escassez de azoto numa cultura de MO desencadeia a ativação da via metabólica que leva à produção e acumulação de TAG em corpos lipídicos

intracelulares. No entanto, a produção de TAG apenas se verifica quando ainda existe fonte de carbono disponível no meio, assim as células param a sua proliferação, e todo o carbono é canalizado para a síntese de TAG<sup>15,19,46</sup>.

Tendo em conta que de uma forma geral os MO apresentam taxas de crescimento relativamente baixas, e dado que o azoto é essencial à sua proliferação celular, há a necessidade de otimizar as concentrações da fonte de carbono e de azoto obtendo rácios de C/N que possibilitem a disponibilidade dos dois nutrientes durante a fase exponencial, com o objetivo de potenciar o crescimento da biomassa. Assim que a fase exponencial terminar o azoto deve já se encontrar esgotado, havendo ainda carbono em excesso, sendo este canalizado para a produção de lípidos neutros. Desta forma pode ser induzida a acumulação durante a fase estacionária de uma cultura<sup>18,19,36,46</sup>.

Para a levedura *R. toruloides* tem sido amplamente reportado o uso de rácios C/N com valores entre os 10 e os 700, este intervalo de valores relativamente grande deve-se à utilização de diferentes fontes de carbono e azoto que originam diferentes rácios molares<sup>19,22,36,37,41,44,56</sup>. Na tabela 3 encontram-se alguns exemplos de diferentes rácios utilizados e as respetivas fontes de carbono em culturas de *R. toruloides*.

**Tabela 3** - Acumulação lipídica por diferentes estirpes da levedura *R. toruloides* com diferentes rácios C/N, utilizando diferentes fontes de carbono.

| Estirpe                                  | Rácio C/N | Fonte de carbono           | Lípidos acumulados<br>%(p/p) | Biomassa máx g/L | Referência bibliográfica             |
|--|-----------|----------------------------|------------------------------|------------------|--------------------------------------|
| <i>R. toruloides</i><br><b>Y4</b>        | 42        | Hidrolisados de alcachofra | 56,0                         | 70,0             | Wang <i>et al.</i> <sup>21</sup>     |
| <i>R. toruloides</i><br><b>DSM 444</b>   | 211       | Glucose                    | 48,0                         | 37,5             | Storofos <i>et al.</i> <sup>22</sup> |
| <i>R. toruloides</i><br><b>AS 2.1389</b> | 200       | Ácido acético              | 48,2                         | 4,35             | Huang <i>et al.</i> <sup>31</sup>    |
| <i>R. toruloides</i><br><b>CB S14</b>    | 100       | Xilose                     | 45,0                         | 8,0              | Wiebe <i>et al.</i> <sup>39</sup>    |
| <i>R. toruloides</i><br><b>AS2.1389</b>  | 300       | Glicerol                   | 47,7                         | 7,96             | Xu <i>et al.</i> <sup>28</sup>       |

### 1.3.5.2 Influência do modo de operação da cultura

A produção de biomassa e acumulação de lípidos também varia consoante o modo de operação das culturas. Os modos de operação mais utilizados são o modo descontínuo (*batch*), o semi-descontínuo (*fed-batch*), o descontínuo de duas fases ou ainda o modo contínuo. O modo descontínuo consiste na adição de todos os nutrientes ao meio de cultura no início do processo fermentativo, sendo que apenas é fornecido o arejamento ao longo da cultura. Já no modo em semi-descontínuo, para além dos nutrientes adicionados no início, são também feitas adições de meio ou nutrientes ao no decorrer do processo fermentativo. O modo semi-descontínuo em duas fases consiste numa primeira fase em que é utilizado um meio com determinados nutrientes, sendo este completamente removido e substituído por outro meio diferente, iniciando assim uma segunda fase do processo fermentativo.

Embora o modo descontínuo seja o mais reportado na literatura, sobretudo devido às vantagens associadas à simplicidade do processo, como menor risco de contaminação e menor tempo de cultivo, vários autores têm sugerido o modo de operação em semi-descontínuo e descontínuo de duas fases como forma de otimizar a produção de biomassa e acumulação de lípidos. Isto acontece porque estes modos de operação permitem um controle do rácio C/N ao longo das culturas, promovendo numa primeira fase a acumulação de biomassa, através de um rácio molar C/N baixo, seguindo-se uma fase com limitação de N, onde é favorecida a acumulação de lípidos, com um rácio C/N elevado<sup>31,41,57</sup>.

Apesar de serem necessários elevados rácios C/N para a acumulação lipídica, estes não são favoráveis à produção de biomassa, pois a concentração de carbono deve ser elevada e a de azoto deve ser baixa. No entanto, tem de haver um compromisso entre as concentrações dos nutrientes C e N, uma vez que concentrações muito elevadas de carbono podem inibir o crescimento celular, e por outro lado, o azoto é essencial ao crescimento celular, devendo este nutriente esgotar assim que o crescimento termine<sup>19,46,47</sup>. O modo descontínuo resolve este problema uma vez que se pode iniciar a cultura com uma concentração de carbono e azoto favorável ao crescimento celular, e assim que se esgota o azoto e a cultura entra em fase estacionária, é adicionada mais fonte de carbono ao meio aumentando o rácio C/N, favorecendo a acumulação de lípidos<sup>31,58</sup>.

Podem ser ainda feitas diferentes estratégias de *fed-batch*, como a adição contínua de fonte de carbono após a fase exponencial de forma a que o aumento do rácio C/N se dê de forma lenta, estudos demonstraram que assim se obtém uma melhor transferência de massa de oxigénio no meio e conseqüente aumento da acumulação lipídica<sup>20</sup>. Outra estratégia é adição de uma fonte de carbono diferente após o crescimento celular, assim podem ser utilizadas diferentes fontes de carbono numa só cultura, o que é uma vantagem quando são utilizados resíduos como matéria-prima de baixo custo<sup>23,28,31</sup>.

O modo *batch* de duas fases, assim como o modo *fed-batch*, possibilitam trabalhar com rácios diferentes e múltiplas fontes de carbono. No entanto neste modo é feita a mudança de meio por completo da cultura, assim pode ser utilizado um meio rico em azoto numa primeira fase, sendo que este é substituído por outro, sem fonte de azoto, mas rico em fonte de carbono para iniciar uma segunda fase da cultura, a fase de acumulação lipídica). Esta estratégia demonstrou em estudos recentes ser eficaz sobretudo quando são utilizados resíduos industriais como fonte de carbono, os quais em alguns casos podem possuir compostos inibitórios ao crescimento celular, mas são eficazes como fonte de carbono para a síntese lipídica<sup>28,31,59</sup>. Por exemplo, um estudo realizado por Huang *et al.* demonstrou ser este o melhor modo de operação utilizando o ácido acético (Ace) como fonte de carbono numa segunda fase após uma primeira fase de produção de biomassa em meio com glucose , atingindo uma acumulação lipídica de 50% em relação ao seu peso seco e uma biomassa de 6,75 g/L<sup>31</sup>.

### 1.4 Utilização de resíduos como matéria-prima

A produção de biodiesel a partir de MO é ainda um processo dispendioso, razão pela qual ainda não é produzido e comercializado em grande escala. Desta forma as linhas de investigação atuais são maioritariamente dirigidas com o intuito de otimizar todo o processo a nível económico<sup>11,15,20,60</sup>.

Um dos fatores que mais contribui para o custo de produção do biodiesel a partir de MO é o custo do substrato utilizado como fonte de carbono para o seu crescimento. Atualmente a

fonte de carbono mais comumente utilizada e também mais eficiente é a glucose, no entanto, estudos realizados estimam que este substrato constitui aproximadamente 79% do custo de produção total do biodiesel, considerando o custo da glucose de 315 €/tonelada e assumindo que o custo total de produção do biodiesel é de 4,34 €/Kg<sup>17,30,61</sup>. Koutinas *et al.*<sup>17</sup> estimam assim que apenas será possível ao biodiesel produzido a partir de MO competir com os biocombustíveis obtidos a partir de culturas vegetais, quando o custo de produção do mesmo for reduzido em 50%<sup>17</sup>.

Uma das grandes vantagens dos MO, e mais concretamente da levedura *R. toruloides*, é o facto destes microrganismos terem a capacidade de proliferar em diferentes meios de cultura e de assimilar diferentes tipos de substratos, nomeadamente soluções de resíduos agroindustriais e/ou urbanos, ricas em compostos de carbono, como açúcares solúveis, celulose, proteínas, glicerol e ácidos orgânicos voláteis (VFA), e mesmo compostos azotados. Esta característica dos MO permite assim a conversão de resíduos de baixo custo em lípidos neutros que podem ser transformados em biodiesel. Desta forma para além de baixar os custos de produção deste biocombustível, são ainda valorizados diversos tipos resíduos que de outra forma seriam descartados, muitos deles com um impacto nocivo para o meio ambiente, devido à sua elevada carga poluente<sup>23,28,31,51,61</sup>.

Em investigações recentes tem sido amplamente explorada a utilização de resíduos como o glicerol, proveniente da indústria do crude, extratos ricos em açúcares solúveis obtidos a partir de resíduos agroindustriais, resíduos lenhocelulósicos e ainda resíduos ricos em ácidos gordos voláteis (VFA) como o ácido acético (Ace)<sup>18,23,28,30,31,33,58,61-63</sup>.

Os resultados obtidos nestes estudos têm vindo a demonstrar o potencial de utilizar resíduos como matéria-prima para a produção de biodiesel de 3ª geração, permitindo viabilizar a produção deste biocombustível, através da diminuição dos custos de forma a competir com os de 1ª e 2ª geração<sup>31,58,62</sup>.

### 1.4.1 Extrato de alfarroba como fonte de carbono

A alfarroba é o fruto da alfarrobeira, *Ceretonia siliqua L*, uma árvore autóctone da zona mediterrânica da Europa e Norte de África, sendo os seus principais produtores a Espanha (41%), Itália (15%), Marrocos (12,5%) e Portugal (10,5%). Com uma produção mundial de 400

mil toneladas/ano de alfarroba, das quais cerca de 50 mil toneladas são produzidas só na região do Algarve<sup>64</sup>.

A vagem da alfarroba é constituída pela popa (90%) e pelas sementes (10%), sendo que as sementes são utilizadas principalmente para a produção de goma de alfarroba e na industria nutracêutica.

A popa da alfarroba possui um elevado conteúdo de açúcares solúveis, entre 48 a 50% do seu conteúdo total, e outros compostos como taninos, sendo os principais açúcares a sacarose (32-38%), a frutose(5-7%) e a glucose (5-6%)<sup>61,64</sup>. Por este motivo é também utilizada para a produção de ração para animais (embora o seu uso seja limitado devido ao baixo teor em gordura e proteína), na produção de farinha de alfarroba muito comum na cozinha Portuguesa, e ainda pode ser fermentada dando origem a licores, aguardentes e cervejas<sup>40,61,65</sup>.

No entanto em Portugal grande parte da popa é considerada um resíduo agroindustrial sendo apenas aproveitados 38% de toda a biomassa gerada na indústria. Desta forma o extrato aquoso destes resíduos pode ser considerado uma matéria-prima de baixo custo que pode ser utilizado como substrato no cultivo de microrganismos oleaginosos (MO) na industria dos biocombustíveis<sup>61,64,65</sup>.

No presente estudo é utilizado um extrato aquoso dos resíduos de popa de alfarroba obtidos a partir de uma industria local, como substrato para o crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides*.

### 1.4.2 Resíduos ricos em ácidos gordos voláteis como fontes de carbono

Os ácidos gordos voláteis (VFA) são pequenas moléculas orgânicas constituídas por 3 a 4 átomos de carbono como a ácido propanoico, o ácido butírico e o ácido acético. Os VFA, principalmente o ácido acético, estão presentes numa grande variedade de resíduos biodegradáveis, como os resíduos agroindustriais da industria vinícola, águas residuais urbanas ou ainda os hidrolisados de resíduos lenhocelulósicos<sup>31,33,59</sup>.

Para a maioria dos microrganismos os VFA são inibidores do seu crescimento, limitando assim o uso de resíduos ricos nestes compostos, no entanto estudos recentes demonstraram

que alguns MO são capazes de crescer em substratos ricos nestes compostos, utilizando assim os VFA como fonte de carbono para a sua proliferação e também para a conversão em lípidos neutros<sup>23,31,33,62</sup>.

Num estudo realizado por Huang *et al.*<sup>31</sup>, o grupo demonstrou a eficácia da conversão do ácido acético (Ace) em TAG pela levedura *R. toruloides* onde obteve uma acumulação lipídica máxima de 48% utilizando um meio de cultura com Ace como única fonte de carbono. No entanto apenas obtiveram uma biomassa máxima de 4,35 g/L, o que é relativamente baixa quando comparada com a quantidade obtida é utilizada a glucose como fonte de carbono<sup>31</sup>.

Com o objetivo de potenciar a produção de biomassa outro estudo realizado por Fontanille *et al.*<sup>35</sup> utiliza o Ace em conjunto com glicerol e glucose como fontes de carbono na cultura de *Yarrowia lipolytica*, que decorre em modo descontínuo de duas fases, onde numa primeira fase usa o glicerol ou a glucose como fonte de carbono para o crescimento da biomassa, e numa segunda fase fazem a adição do ácido acético para favorecer a acumulação lipídica. Desta forma conseguiram obter uma acumulação de 40% de lípidos neutros e 37 g/L de biomassa<sup>35</sup>.

No presente estudo, será feita também a combinação de dois resíduos como fontes de carbono para o crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides*, sendo estes o extrato de alfarroba, obtido a partir de resíduos de popa de alfarroba (*Kibbles*) da industria local, e um resíduo rico em ácido acético, com o intuito de valorização destes resíduos, e uma diminuição dos custos de produção do biodiesel a partir deste MO.

### 1.4.2.1 Metabolismo da síntese de TAG a partir de VFA

Os VFA, nomeadamente o ácido acético, tem como vantagem ter uma taxa de conversão teoricamente mais eficaz do que a glucose ou outras fontes de carbono, por serem pequenas moléculas. Assim, os VFA são facilmente assimilados por alguns MO como fonte de carbono, estes compostos ao penetrarem nas células, são incorporados diretamente no ciclo do ácido cítrico e convertidos em Acetil-CoA pela Acetil-CoA sintetase. A Acetil-CoA, em condições limitantes de azoto, vai ser o principal precursor da síntese de TAG, como descrito na (secção 1.3.4)<sup>31,50</sup>.

### 1.5 Produção integrada em biorrefinaria

A produção de biodiesel no futuro deverá ser integrada num contexto de biorrefinaria. O conceito de biorrefinaria consiste numa unidade sustentável de produção de bicompostíveis a partir de biomassa, com o aproveitamento de todas as frações da mesma, sendo estas consideradas coprodutos do biocombustível, muitas vezes com elevado valor comercial. Desta forma o termo “biorrefinar” implica o fracionamento da biomassa em diferentes subprodutos separados, tal como acontece nas refinarias tradicionais de petróleo. Estes produtos são obtidos por processos químicos, térmicos, biológicos ou mecânicos de separação para posterior uso em diversas indústrias como a farmacêutica, biotecnológica, cosmética e alimentar<sup>11,66</sup>.

Numa biorrefinaria que utilize microrganismos oleaginosos como fonte de biomassa para a produção de biodiesel, podem ser obtidas diversas frações da mesma, tais como, enzimas de interesse, pigmentos, PUFA's, vitaminas, proteínas e outros compostos moleculares com valor no mercado<sup>11,33,67,68</sup>.

Durante os processos de produção são ainda gerados diferentes compostos químicos e orgânicos, de baixo valor comercial por serem gerados em grandes quantidades, que podem ser reutilizados e integrados em diferentes etapas do processo geral. Por exemplo o glicerol, produto que é gerado durante a reação de transesterificação de qualquer MO tem vindo a ser alvo de vários estudos que comprovam poder ser utilizado como fonte de carbono para o cultivo dos MO<sup>58</sup>. Outro exemplo são os ácidos gordos voláteis (VFA) presentes em várias soluções residuais do processamento da biomassa que podem igualmente ser utilizados como fonte de carbono<sup>23,31,62</sup>. Para além de compostos químicos e orgânicos, também a energia térmica gerada no decorrer de alguns processos, pode ser reaproveitada sendo canalizada para outros<sup>11,68</sup>.

Desta forma uma biorrefinaria deve integrar toda uma metodologia que permita uma produção circular sustentável a nível económico e ambiental do biodiesel e dos seus coprodutos com o princípio base de minimizar o desperdício de resíduos e energético<sup>11</sup>.

1.5.1 A levedura *R. toruloides* num contexto de biorrefinaria

A levedura *R. toruloides* apresenta um grande potencial para a produção de biodiesel, não só por ser considerada um microrganismo oleaginoso, com uma elevada acumulação lipídica, mas também por ser capaz de sintetizar compostos de elevado valor comercial, que num contexto de biorrefinaria, permitiriam a redução do preço do biodiesel de forma a conseguir competir com o mercado de combustíveis fósseis atual<sup>25,27</sup>.

Esta levedura tem a capacidade inata de produzir carotenoides de elevado valor, como o  $\beta$ -caroteno, o toruleno e o torularodina (figura 8), estes compostos são reconhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes, anticancerígenas e possuírem coloração<sup>69</sup>. Para além destes compostos a levedura *R. toruloides* pode ainda produzir enzimas de interesse para a biotecnologia como a cefalosporina esterase, a epóxido hidrólase e a fenilalanina amónio-liase, que podem ser extraídas e separadas integrando assim uma cadeia de produção de diferentes coprodutos do biodiesel.<sup>27,44,70</sup>

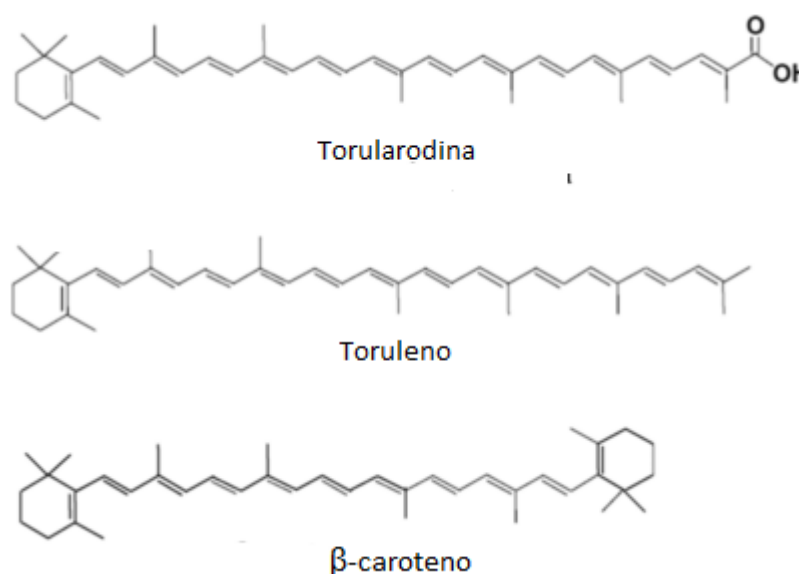


Figura 8 – Estruturas moleculares dos carotenos produzidos pela levedura *R. toruloides*: torularodina; toruleno;  $\beta$ -caroteno (adaptado de Jie *et al.*)<sup>24</sup>.

O principal coproduto que pode ser obtido da Levedura *R. toruloides* é o  $\beta$ -caroteno, este composto é um pigmento precursor da vitamina-A, apresenta uma coloração rosa-alaranjada,

e tem um elevado valor comercial tanto na indústria farmacêutica como na indústria da cosmética e alimentar<sup>27,40,61,71</sup>.

A integração da produção destes compostos com a produção de biomassa para o biodiesel está, no entanto, dependente da maximização da produção dos mesmos pelo microrganismo, bem como da otimização dos processos de extração e purificação necessários. Sendo que estes últimos representam ainda um entrave à criação de uma unidade deste género devido aos elevados custos operacionais envolvidos. Desta forma é necessário desenvolver técnicas de separação e extração menos dispendiosas e que não influam no rendimento da produção<sup>33,40,72,73</sup>.

Quanto à coprodução de lípidos neutros e carotenoides pela levedura *R. toruloides*, diversos estudos apontam para a sua viabilidade, sendo que ainda é necessária a otimização das condições de cultura destas leveduras de forma a maximizar a produção de ambos<sup>27,40,55</sup>.

### 1.5.1.1 Fatores que influenciam a coprodução de TAG e carotenoides

Diversos fatores podem influenciar na produção de carotenoides pelos microrganismos oleaginosos (MO), no entanto alguns podem ser manipulados de forma a aumentar a produtividade quer de carotenoides quer de lípidos neutros. A temperatura, a luminosidade, o arejamento, a fonte de carbono, o pH, stress osmótico e o rácio C/N são os principais fatores que influenciam a acumulação de carotenoides<sup>55,71</sup>.

O rácio C/N é um dos fatores que mais influencia a coprodução de lípidos e carotenoides. Vários autores sugerem que elevados rácios C/N favorecem a produção de ambos, indicando a existência de sincronia na ativação das vias metabólicas dos TAG e dos carotenoides<sup>44,74,75</sup>. Estudos genéticos evidenciam esta hipótese tendo demonstrado que vários genes envolvidos na via metabólica de síntese de carotenoides, como o ERG10, ERG12, ERG20 e BTS1, são regulados positivamente quando as células são sujeitas a condições limitantes de azoto, existindo ainda fonte de carbono disponível. Dando assim ênfase é ideia de que elevados rácios C/N induzem não só a produção de lípidos neutros como também a síntese de carotenoides<sup>69</sup>.

Numa abordagem mais detalhada relativa à influência do rácio C/N na coprodução de TAG e carotenoides, Singh *et al.*<sup>44</sup> realizaram um estudo no qual revelam que a manipulação do rácio C/N tem influência direta na produção de carotenoides e lípidos, sendo que rácios C/N elevados desencadeiam a ativação da via metabólica que canaliza todo o carbono para a produção de lípidos neutros, não havendo quase produção de carotenoides nesta fase. No entanto em fases mais tardias da cultura este rácio diminui e é então iniciada a produção de carotenoides<sup>44</sup>.

Tendo em consideração os estudos realizados até à presente data, pode-se inferir que a coprodução de lípidos neutros e carotenoides em MO, e mais especificamente na levedura *R. toruloides*, é induzida quando são utilizados elevados rácios C/N iniciais, no entanto durante a fase estacionária, a produção de TAG e carotenoides não acontece em simultâneo, havendo uma preferência pela via dos TAG, sendo que só depois é ativada a via dos carotenoides. Tendo em conta que a Acetil-CoA, quando sintetizada em excesso pela limitação do azoto, é a precursora responsável pela ativação de ambas as vias, pode-se supor que existe um fator que numa dada altura da cultura, quando o azoto se esgota e após parte do carbono disponível ser canalizado para a via de síntese de TAG, passa a direcionar a Acetil-coA para a produção de carotenoides.

Pode-se concluir que a criação de uma unidade de biorrefinaria para processamento e obtenção de biomassa a partir de microrganismos oleaginosos é essencial para a produção sustentável de biodiesel, sendo que é uma realidade cada vez mais próxima e com potencial para vir a substituir e competir com grande parte das refinarias tradicionais, bem como com biorrefinarias que utilizem matéria-prima comestível, de 1ª geração como fonte de biomassa.

Atualmente, com os estudos que têm vindo a ser desenvolvidos, a levedura *R. toruloides* apresenta assim um potencial MO candidato à integração da sua biomassa e coprodutos na produção de biodiesel num contexto de biorrefinaria.

## 1.6 Objetivos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Biotecnológica e Ambiental (LEBA) integrado no Centro de Investigação Marinha e Ambiental (CIMA) da Universidade do Algarve (UAlg).

Este trabalho teve como principal objetivo a definição de abordagens que permitam a valorização de dois resíduos agroindustriais, um proveniente da indústria transformadora da alfarroba e um resíduo rico em ácido acético, como matéria-prima de baixo custo para a produção de lípidos e coprodutos de elevado valor, quando usados como fonte de carbono na cultura da levedura *R. toruloides*.

Desta forma, com o intuito de se atingir este objetivo, diferentes objetivos específicos foram traçados:

- Determinação do rácio C/N que potenciase a produção de biomassa e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides*, utilizando um resíduo rico em ácido acético como fonte de carbono.
- Seleção do meio de cultura base, constituído por nutrientes orgânicos ou inorgânicos para a produção de biomassa e acumulação lipídica, com o resíduo de ácido acético como fonte de carbono.
- Efeito da combinação dos dois resíduos no crescimento e produção de lípidos pela levedura *R. toruloides*.
- Definição do modo de cultivo da levedura *R. toruloides*, em reator biológico de 2-L (STR).
- Definição da estratégia de cultura em STR para a produção e acumulação de lípidos, usando os dois resíduos agroindustriais.

## 2. Material e métodos

---

### 2.1 Microrganismo e conservação

O microrganismo usado para a realização deste estudo foi a levedura *Rhodospordium toruloides* CECT 1499, adquirida no banco de Coleções Espanholas de Cultivo Tipo (CECT), pertencente à Universidade de Valência, situada em Espanha.

A cultura foi mantida em placas *Petri* contendo meio sólido *Potato Dextrose Agar* (PDA) (secção 2.4.1.), seguida de incubação em estufa (Selecta, Espanha) por 72 horas a  $30 \pm 1$  °C e armazenada a 4 °C. Para uma conservação a longo prazo, a estirpe foi mantida a  $-80 \pm 1$  °C em tubos criogénicos com 20% (v/v) de glicerol.

### 2.2 Matérias-primas

O extrato de resíduos de alfarroba e o resíduo de ácido acético, foram os substratos escolhidos como fonte de carbono para o crescimento da levedura *R. toruloides* nos ensaios realizados neste trabalho.

O resíduo de ácido acético não foi sujeito a qualquer tratamento antes da sua utilização, já os resíduos de alfarroba foram sujeitos a uma extração dos açúcares solúveis de modo a ser obtido um extrato aquoso.

#### 2.2.1 Extração dos açúcares solúveis da alfarroba

O extrato de alfarroba foi preparado a partir de resíduos de alfarroba denominados por *kibbles*, que foram gentilmente fornecidos pela Empresa Industrial Fareense, Lda.

A extração dos açúcares solúveis da alfarroba foi feita a partir dos *kibbles* segundo o método otimizado por Manso, *et al.*<sup>65</sup> e Lima-Costa, *et al.*<sup>64</sup>. Este método tem por base a extração aquosa a partir de uma farinha fina de alfarroba.

## Material e métodos

Começou-se por secar os *kibbles* numa estufa (Binder FD53, EUA) a  $50 \pm 1$  °C durante a noite. Após se retirar da estufa e deixar arrefecer, os *kibbles* foram moídos num moinho elétrico (IKA-MF 10B, Alemanha) até se obter uma farinha fina. Com a farinha obtida foi preparada uma solução aquosa com um rácio de 30% (P/V) de farinha de alfarroba e água destilada. A solução aquosa foi colocada numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 150rpm e  $30 \pm 1$  °C, durante 1 h. Após a extração, procedeu-se à ultracentrifugação da solução resultante, numa ultracentrifuga (Beckman Coulter J2-MC, EUA) com um rotor JA-14, a 12000rpm, 4 °C, durante 25 min. Os sólidos ainda presentes no sobrenadante obtido foram removidos por filtração a vácuo, com filtros de papel de porosidade de 0,45 µm (Whatman 1).

Normalmente as concentrações de açúcares obtidas no extrato com estas condições encontram-se entre os 100-140 g/L, no entanto todas as extrações foram sujeitas a uma análise por HPLC para confirmar as concentrações de açúcares presentes no extrato.

O extrato final foi armazenado a  $-21 \pm 1$  °C, até à sua posterior utilização.

### 2.3 Condições de esterilidade

Todos os meios utilizados foram sujeitos a uma esterilização por autoclavagem (Uniclave 87, Portugal), com calor húmido a  $121 \pm 1$  °C, durante 20 min.

### 2.4 Condições e meios de cultura para o crescimento celular

#### 2.4.1 Meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA)

O meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA) sólido (HiMedia M096, VWR), constituído por 200 mL de extrato de batata, 20 g/L de glucose e 20 g/L de Agar, foi utilizado nas placas de *Petri* onde as culturas de leveduras de *R. toruloides* foram mantidas e repicadas uma vez por mês. O meio PDA líquido, de igual composição sem a adição de agar, foi usado na preparação de todos os pré-inóculos realizados neste trabalho.

#### 2.4.2 Meio de cultura *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD)

## Material e métodos

Este meio foi utilizado quer na preparação de placas de *Petri* (meio sólido) para a contagem de UFC (secção 2.5.4), quer na preparação do inóculo para os ensaios em meio líquido.

O meio YPD sólido é constituído por 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona, 20 g/L de glucose e 20 g/L de agar bacteriológico.

O meio YPD líquido é constituído por 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona, sendo a glucose substituída pela fonte de carbono utilizada nos diferentes ensaios. Nos ensaios em que seria utilizado o extrato de alfarroba como substrato inicial, adicionou-se ao meio de inóculo 15 g/L de açúcares solúveis de alfarroba, nos ensaios em que seria utilizado o ácido acético foi adicionada uma concentração de 50 mM de ácido acético (Ace), correspondente a 3 g/L de Ace..

### 2.4.3 Meios de crescimento e de acumulação lipídica

Nos diferentes ensaios realizados os meios de crescimento e acumulação lipídica variaram consoante o objetivo das diferentes experiências definidas. Desta forma foram utilizados dois tipos de meios: um meio orgânico, com extrato de levedura e peptona, desenvolvido com base no meio descrito por Li *et al.* (2007)<sup>37</sup> e um meio essencialmente inorgânico baseado no meio descrito por Li *et al.* (2006)<sup>36</sup>.

O meio orgânico foi constituído por 15 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de peptona, sendo ainda adicionada a fonte de carbono, ácido acético com concentrações entre os 50 e 150 mM (3 – 15 g/L).

O meio inorgânico foi constituído por extrato de levedura 0,75 g/L, sulfato de magnésio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 1,5 g/L e o fosfato monopotássico ( $KH_2PO_4$ ) 0,4 g/L, além das fontes de azoto e carbono, em que as concentrações variaram consoante os ensaios.

Nos meios em que foi adicionado ácido acético como fonte de carbono, o pH foi acertado para 5,5 utilizando uma solução a 5 M de NaOH.

### 2.4.4 Preparação do pré-inóculo

Em todos os ensaios realizados preparou-se um pré-inóculo da levedura *R. toruloides* em meio líquido PDA. Inoculou-se a levedura proveniente de meio sólido em 40 ml de meio líquido

## Material e métodos

PDA num erlenmeyer de 100 mL, em triplicado. O pré-inóculo foi mantido numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 200 rpm, a  $30 \pm 1$  °C, durante 72 h. Este tempo de incubação permitiu iniciar os ensaios com uma concentração celular de aproximadamente  $1 \times 10^7$  cel/mL.

### 2.4.5 Preparação do Inóculo

Preparou-se o inóculo em meio líquido YPD, tal como descrito na secção 2.4.2.

A passagem do pré-inóculo para o meio de inóculo foi feita adicionando 10% (v/v) de suspensão celular do meio do pré-inóculo num erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio YPD, em triplicado. Esta passagem permitiu iniciar os inóculos com uma concentração celular de aproximadamente  $1 \times 10^7$  cel/mL. As culturas foram mantidas numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 200 rpm, a  $30 \pm 1$  °C, durante 72 h.

### 2.4.6 Ensaios experimentais em *erlenmeyer*

Para o crescimento em erlenmeyer foram utilizados balões de 500 mL com 200 mL de meio de cultivo. O volume de inóculo necessário foi sempre calculado com base na contagem celular em câmara de *Neubauer* da suspensão celular obtida nas culturas de inóculo, de forma a iniciar todos os ensaios com uma concentração celular de aproximadamente  $1 \times 10^7$  cel/mL. Todas as culturas foram mantidas numa agitadora orbital (IKA-K54000i, Alemanha) a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C.

Após iniciar os ensaios, a amostragem foi feita de 4 em 4 horas, nos primeiros 3 dias, e de 12 em 12 h nos restantes. Todo o processo de recolha de amostra foi realizado em condições de esterilidade numa camara de fluxo laminar (Tesla Bio II A, Espanha) com todo o material necessário previamente esterilizado por autoclavagem (Uniclave 87, Portugal) a  $120 \pm 1$  °C durante 20 minutos.

Com as amostras obtidas foram realizadas análises que permitiram avaliar o perfil de crescimento das culturas, o consumo de nutrientes, a produção de metabolitos e a viabilidade celular. tais como, leitura da densidade ótica por espectrofotometria, determinação do peso seco, quantificação de açúcares totais por HPLC, quantificação de ião amónio pelo método fenol-hipoclorito, quantificação de lípidos neutros intracelulares por espectroscopia de

fluorescência e determinação do número de unidades formadoras de colónias, tal como descrito na secção 2.6.

### 2.4.7 Ensaio experimentais em reator biológico STR

Para além dos ensaios realizados em Erlenmeyer, realizou-se também ensaios em reator biológico mecanicamente agitado (STR) de 2L com um volume útil de 1,5L (Applikon, Holanda).

Após a preparação do reator, foi adicionado o meio de cultura e todo o sistema foi sujeito a uma esterilização por calor húmido por autoclavagem (Uniclave, 87 Portugal).

O reator foi conectado a uma unidade de controlo externa (Bio Controller, ADI 1030 Applikon, Alemanha) permitindo a monitorização de diferentes parâmetros variáveis do processo, tais como a temperatura, o pH e a percentagem de O<sub>2</sub> dissolvido (% dO<sub>2</sub>). O vaso foi equipado com dois dispersores de ar porosos, colocados em paralelo, uma turbina de *Rushton*, uma sonda de oxigénio e uma sonda de pH. A temperatura foi mantida a 30 ± 1 °C por uma camisa externa de água ligada a um termocirculador. O arejamento foi controlado por um fluxímetro ligado a uma bomba de ar, em que o ar foi esterilizado através da sua passagem por um filtro estéril de membrana hidrofóbica (Millipore), com uma porosidade de 0,2 µm. Para minimizar as perdas de líquido do meio, na saída de escape, foram utilizados dois condensadores, cada um equipado com um filtro estéril de modo a garantir a esterilidade do ambiente.

A inoculação foi feita de modo a garantir uma concentração celular inicial de aproximadamente 1x10<sup>7</sup> cel/mL. As culturas foram mantidas até 400h com uma agitação de 200 rpm e um arejamento de 1vvm 30 ± 1°C. Procedeu-se à recolha de amostras, que foi feita em frascos previamente esterilizados, através de um sistema igualmente equipado com filtros estéreis.

Para cada amostra foi realizada a leitura da densidade ótica por espectrofotometria, a determinação do número de UFC, a determinação do peso seco, a quantificação de lípidos neutros por espectroscopia de fluorescência, a quantificação de açúcares totais solúveis por HPLC e a quantificação de ião amónio pelo método fenol-hipoclorito. No final da cultura foi feita a extração dos lípidos totais pelo método de Folch e a caracterização do perfil em ácidos gordos por HPLC. A cultura foi acompanhada com o registo de 2 em 2 h dos valores de % dO<sub>2</sub> e pH.

Durante o crescimento o pH do meio foi ajustado para 5,5 – 6, com a adição manual de NaOH (5M) ou HCl (6M) previamente esterilizados.

### 2.5 Ensaios experimentais

#### 2.5.1 Influência do rácio (C/N) usando um meio orgânico e resíduo rico em ácido acético como fonte de carbono

O primeiro ensaio realizado teve como objetivo determinar o melhor rácio C/N para o crescimento da levedura *R. toruloides* utilizando o resíduo de ácido acético (Ace) como fonte de carbono, e um meio orgânico descrito por Li *et al.* (2007)<sup>37</sup>. Utilizou-se este meio por ter demonstrado grande produção de biomassa<sup>37</sup>.

O ensaio foi realizado em balões *erlenmeyer* de 500 mL, com 200mL de meio composto por 15 g/L de peptona; 15 g/L de extrato de levedura, no qual se fez variar a concentração da fonte de carbono, sendo utilizadas as concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 mM, correspondentes a 3, 6, 9, 12 e 15 g/L de Ace.

As culturas foram mantidas durante 200h, a  $30 \pm 1$  °C e 200 rpm. A amostragem foi feita tal como descrito na secção (2.4.6).

#### 2.5.2 Influência do rácio (C/N) usando um meio inorgânico e resíduo rico em ácido acético como fonte de carbono

Tendo em vista a otimização do processo, utilizou-se neste ensaio um meio inorgânico baseado em Li *et al.* (2006)<sup>41</sup> e em estudos anteriormente realizados no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA/CIMA), com extrato de alfarroba e glucose como fontes de carbono<sup>70,76</sup>. Este meio inorgânico apresenta-se menos dispendioso, sendo constituído por uma baixa concentração de extrato de levedura (0,75 g/L), comparativamente com o meio orgânico (15 g/L). Assim, realizou-se um ensaio em *erlenmeyer* para escolha do melhor rácio (C/N) utilizando o resíduo rico em ácido acético como fonte de carbono.

O ensaio foi realizado igualmente em balões *erlenmeyer* de 500 mL com 200 mL de meio inorgânico, com uma concentração limitante de 0,1 g/L de sulfato de amónio, variando a

## Material e métodos

concentração de Ace entre 50 e 150 mM, tal como no ensaio em meio orgânico (secção 2.4.1) com os respetivos rácios (C/N) a variarem entre 55 e 70.

As culturas foram mantidas por 300h, a  $30 \pm 1$  °C e 200 rpm.

Com o intuito de aumentar o rácio C/N de forma a induzir a acumulação lipídica, realizou-se um *fed-batch*, às 316h de cultura onde se procedeu à adição de glucose de forma a que a concentração no meio ficasse a 10 g/L. Após a adição de glucose as culturas foram novamente mantidas por mais 200h a  $30 \pm 1$  °C e 200 rpm.

### 2.5.3 Estratégias para o aumento da produção de biomassa e acumulação lipídica

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios descritos em 2.5.1 e 2.5.2, bem como os resultados previamente obtidos no LEBA com o extrato de alfarroba como fonte de carbono, procedeu-se ao planeamento dos ensaios seguintes com o objetivo de se aumentar a produção de biomassa e acumulação de lípidos pela levedura *R. toruloides*. Para tal, foram realizados ensaios em modo descontínuo (*batch*) e semi-descontínuo (*fed-batch*), nos quais se conjugaram os dois resíduos, o extrato de alfarroba e o ácido acético, quer em *erlenmeyer* quer em reator STR de 2L.

Estas estratégias permitiram explorar as diferentes potencialidades destes dois substratos na cultura de *R. toruloides*. Nos resultados obtidos previamente observou-se que o extrato de alfarroba, devido à elevada quantidade de açúcares presentes (70 % sacarose, 15,5 % glucose e 14,5 % de frutose)<sup>64</sup> potencia a produção de biomassa<sup>70</sup>, enquanto que, o ácido acético, devido a ter uma estrutura simples de 2 carbonos e ser facilmente assimilável pela levedura, é convertido em Acetil-CoA, principal precursor da síntese de lípidos, promovendo consequentemente a acumulação de lípidos<sup>77</sup>.

#### 2.5.3.1 Produção de biomassa em modo *batch* e *fed-batch* em *erlenmeyer*

Com o intuito de promover a produção de biomassa, delineou-se um ensaio em semi-descontínuo (*fed-batch*) para comparar o desempenho de ambos os resíduos utilizados neste trabalho como fontes de carbono. Assim, realizou-se um ensaio no qual foram testadas as concentrações de 9 e 70 g/L de açúcares de alfarroba solúveis e 9 g/L de Ace (150mM).

## Material e métodos

Foram definidas estas concentrações de forma a ser possível comparar os diferentes parâmetros cinéticos das culturas com concentrações iguais de fonte de carbono. Com base em resultados de trabalhos anteriores, sabe-se que a melhor concentração de extrato de alfarroba para o crescimento da levedura *R. toruloides* é de 70 g/L<sup>70</sup> enquanto que a de ácido acético é de 9 g/L (150 mM), resultado obtido neste trabalho.

Os ensaios foram realizados em *erlenmeyer* de 500 mL com 200 mL de meio de acumulação lipídica inorgânico (secção 2.4.3), em que a fonte de azoto foi o sulfato de amónio numa concentração não limitante de 0,5 g/L.

Mais uma vez as culturas foram mantidas durante 200 h a  $30 \pm 1$  °C e 200 rpm.

Após as 200 h de cultura, foi realizado um *fed-batch* às diferentes culturas com concentrações de 9 g/L de extrato de alfarroba e de ácido acético, de forma a que a concentração final nos balões fosse novamente as 9 g/L. Na cultura com 70 g/L de extrato de alfarroba, não foi feita nenhuma adição, uma vez que a concentração de açúcares ainda se encontrava elevada (dados obtidos pela análise dos açúcares solúveis em HPLC; secção 2.5.6).

As culturas foram mantidas nas mesmas condições por mais 300 h.

### 2.5.4 Ensaios de aumento de escala em reator biológico

Procedeu-se ao aumento de escala em reator biológico STR de 2-L, do ensaio em semi-descontínuo (*fed-batch*). Este estudo decorreu em duas fases, nas quais se conjugaram as duas fontes de carbono, uma primeira de produção de biomassa, num meio inorgânico com 70 g/L de extrato de alfarroba e 0,1 g/L de sulfato de amónio, seguida de uma fase de acumulação de lípidos, com a adição de resíduo de ácido acético, de forma a que a concentração no seio do reator fosse de 15 g/L (250 mM). Com base nesta estratégia, foram realizados dois ensaios, que diferiram no tempo de adição da segunda fonte de carbono, o resíduo de ácido acético.

Num primeiro ensaio, foi feita a adição de ácido acético às 188h de crescimento, de forma a obter uma concentração de 15 g/L (250 mM) no meio de cultura.

Num segundo ensaio, a adição foi feita às 77h de cultivo, com ácido acético em meio inorgânico sem fonte de azoto. Em ambos foram retiradas amostras antes e depois da adição.

## Material e métodos

As culturas foram mantidas durante de 400 h. As culturas foram mantidas com um arejamento de 1 vvm, a  $30 \pm 1$  °C e uma agitação de 200 rpm.

### 2.6 Métodos analíticos

As amostras recolhidas ao longo dos ensaios, quer em balão *erlenmeyer*, quer em reator biológico STR, foram sujeitas a vários métodos analíticos que permitiram a determinação dos parâmetros relevantes a este estudo e o acompanhamento da cultura, tais como a leitura da densidade ótica por espectrofotometria, a determinação do peso-seco, a quantificação dos lípidos neutros por fluorimetria, a determinação das unidades formadoras de colónias (UFC), a quantificação do ião amónio pelo método fenol-hipoclorito; quantificação dos açúcares por HPLC, extração e quantificação dos lípidos totais; e a análise do perfil lipídico por HPLC, quantificação e identificação dos carotenoides por HPLC.

#### 2.6.1 Leitura da densidade ótica

O acompanhamento do crescimento celular foi feito através da leitura da densidade ótica (DO) das amostras recolhidas. Para tal, procedeu-se à diluição de 1:20 da amostra a analisar, em triplicado, as leituras foram feitas num espectrofotómetro (Cintra 202 GBC, Inglaterra), com o *software GBC Spectral*, a um comprimento de onda de 590 nm. Os brancos utilizados, são o meio de cultura e foram recolhidos no início de cada ensaio, antes de cada inoculação.

#### 2.6.2 Determinação do peso-seco

Para a determinação do peso-seco (PS) em ensaios feitos em balão *erlenmeyer* foram recolhidas amostras de 1,2 mL para tubos *de Eppendorf* de 1,5 mL, em triplicado. Os tubos de *Eppendorf* foram previamente secos numa estufa (Binder FD53, EUA), a  $50 \pm 1$  °C, durante 24 h, após as quais foram arrefecidos à temperatura ambiente e pesados numa balança analítica de precisão (XB 120A Precisa, Suíça).

## Material e métodos

Após recolha da amostra nestes tubos, foram sujeitos a uma centrifugação (Eppendorf AG, Centrifuge 5415 D, Alemanha) a 13000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e realizou-se mais uma centrifugação por impulso de modo a permitir retirar de sobrenadante residual dos *pellets*.

Em ensaios em reator biológico STR 2-L procedeu-se de modo semelhante, apenas variando o volume das amostras, tendo sido retiradas amostras em triplicado de 5 ml para tubos *Falcon* de 15 mL, as quais foram centrifugadas (Hettich Zentrifugen Universal 320, Alemanha) a 5000 rpm por 20 min.

Em ambos os casos, os *pellets* obtidos foram secos durante 72 horas numa estufa (Binder FD53, EUA), a  $50 \pm 1$  °C, e seguidamente pesados numa balança analítica de precisão (XB 120A Precisa, Suíça). O peso-seco corresponderá à diferença entre o peso do tubo com biomassa e o peso do tubo sem biomassa.

O sobrenadante obtido no processo de centrifugação é também reservado a  $-20 \pm 1$  °C para posterior quantificação do ião amónio e açúcares/ ácido acético presentes no meio (secções 2.6.5 e 2.6.6 respetivamente).

### 2.6.3 Quantificação de lípidos neutros

O procedimento utilizado para a quantificação de lípidos neutros teve por base o método descrito por Kimura *et al.*<sup>78</sup>, em que usa a espectroscopia de fluorescência e as propriedades da fluorescência emitidas pelo complexo molecular formado quando um corante lipofílico, como o vermelho de Nilo, se liga aos lípidos neutros de uma suspensão celular. Esta técnica é assim uma forma rápida de seguir em tempo real a produção e acumulação de lípidos pela levedura *R. toruloides* durante o decorrer de um ensaio experimental, sem ter que recorrer a técnicas de extração lipídica.

Começou-se por preparar a solução de vermelho de Nilo, diluído em acetona com uma concentração de 0,1 mg/mL.

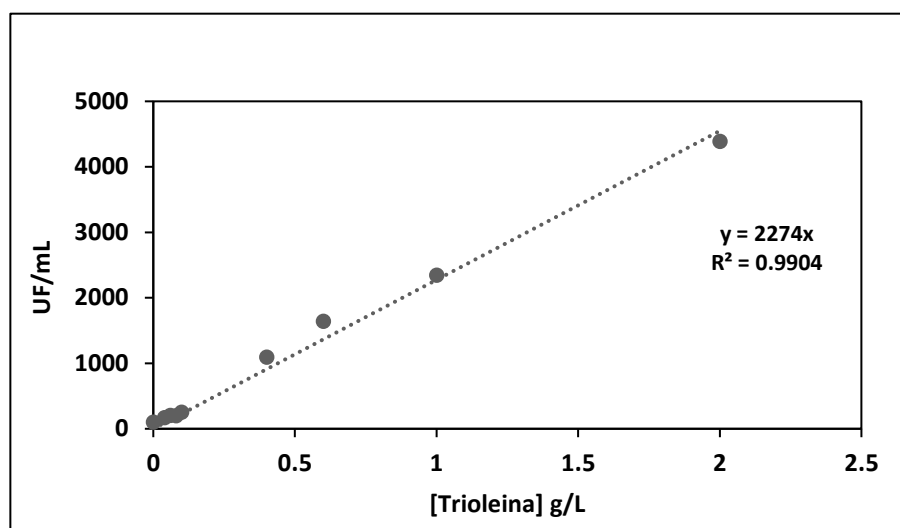
As amostras recolhidas foram analisadas num fluorímetro (F-4500, Hitachi), com um comprimento de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão ente 400 e 700 nm, através do *software FL solutions v2.0*.

As medições foram feitas em duplicado, em que se adicionou 100 µL de amostra em 2 mL de PBS 0,15M KCl numa célula de quartzo, onde se registou o espectro. Em seguida adicionou-

## Material e métodos

se 10  $\mu\text{L}$  de corante vermelho de Nilo e deixou-se incubar durante 5 min, com agitação. Após a incubação, registou-se um segundo espectro da amostra. A fluorescência emitida pelos lípidos neutros da amostra vai corresponder à diferença entre os dois espectros obtidos, em que o espectro sem adição de corante é subtraído ao espectro com adição de corante, sendo esta realizada com o *software FL solutions v2.0*. O valor obtido é expresso em unidades de fluorescência (UF) e corresponde ao máximo do pico entre os comprimentos de 565 e 585 nm.

Para calcular a concentração de lípidos neutros em g/L utilizou-se uma curva padrão (Figura 9) realizada com diferentes concentrações de trioleína, entre 0 e 2,0 g/L, Utilizou-se a trioleína por ser um TAG constituído por uma molécula de glicerol e três moléculas de ácido oleico<sup>79</sup>.



**Figura 9** – Curva padrão da trioleína; As unidades de fluorescência de trioleína foram obtidas através do método descrito por Kimura *et al.*<sup>78</sup>. Equação da regressão linear obtida: [Unidades de Fluorescência, UF]= $2,274 \times 10^3$ [Concentração g/L];  $R^2=0,9904$ , valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão

### 2.6.4 Quantificação de unidades formadoras de colónias

A determinação das unidades formadoras de colónias (UFC) permitiu fazer uma estimativa do número de células viáveis nas culturas durante os diferentes ensaios.

Para tal utilizou-se 100  $\mu\text{L}$  de suspensão celular que foram sucessivamente diluídos em tubos de ensaio contendo PBS (13,6 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 17,4 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), previamente esterilizados por calor húmido em autoclave (Uniclave, 87 Portugal). As diluições foram feitas adicionando 100  $\mu\text{L}$  de amostra em 9,9 mL de PBS, obtendo-se uma diluição de  $1:10^2$ , homogeneizou-se a

## Material e métodos

solução num *vortex* (VELP Scientifica, Itália), e em seguida retirou-se 1 mL e adicionou-se a outro tubo de ensaio com 9 mL de PBS, e assim sucessivamente, até se obter diluições de  $1:10^3$ ,  $1:10^4$  e  $1:10^5$ . No final fica-se com quatro diluições, em que se divide uma placa de *Petri* com meio YPD sólido em quatro partes iguais, e coloca-se 20  $\mu$ L de cada diluição, em triplicado, em cada quarto da placa. Para cada amostra o procedimento foi feito em duplicado obtendo-se duas placas de cada. Todo o processo foi realizado numa câmara de fluxo laminar (Telstar Bio II A, Espanha) garantido as condições de esterilidade. Após incubação durante 72h à temperatura ambiente, as colónias foram contabilizadas, sendo que as diluições escolhidas para contagem foram aquelas que apresentavam um número médio de colónias superior a 10.

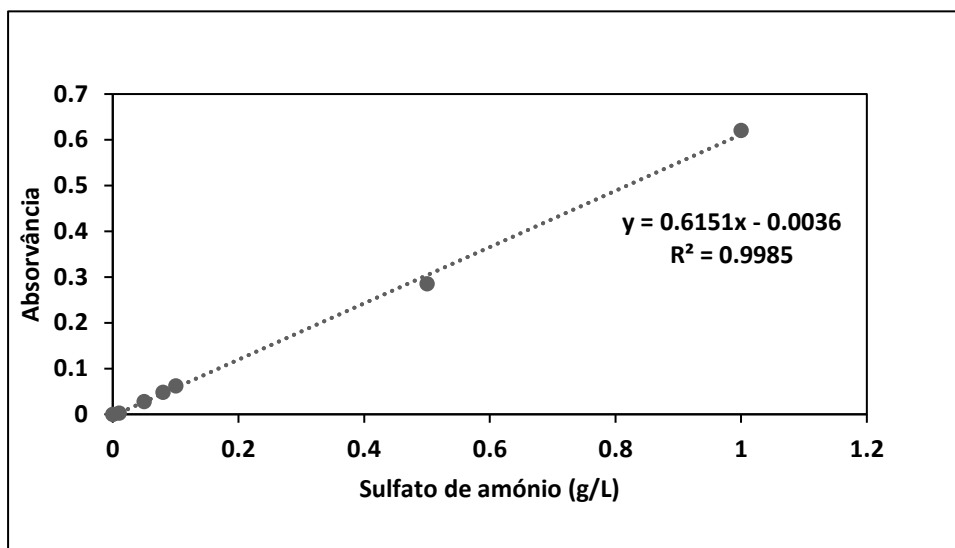
### 2.6.5 Quantificação do ião amónio

A quantificação do ião amónio realizada teve por base o método colorimétrico descrito por Weatherburn *et al.*<sup>80</sup>, o qual tira partido do facto de que, na presença do ião amónio, a mistura de uma solução alcalina com uma solução de fenol e nitroprussiato altera a cor solução que passa de incolor a azul, sendo que a intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração do ião amónio na solução.

Desta forma, para proceder à quantificação começou-se por se preparar duas soluções. A solução de fenol e nitroprussiato (solução A) foi preparada com a diluição de 10 g de fenol e 50 mg de nitroprussiato para 1L de água MiliQ. A solução de hipoclorito alcalino (solução B) foi preparada com a adição de 5 g de NaOH e 8,2 mL de hipoclorito, para 1 L de água destilada.

Uma vez preparadas as soluções, procedeu-se à reação em tubo de ensaio, adicionando-se 5mL de solução A seguida da adição de 50  $\mu$ L de amostra de meio de cultura e mais 5 mL da solução B. Entre cada adição homogeneizou-se a mistura num *vortex* (VELP Scientifica, Itália). Para cada amostra foram feitos triplicados. Em seguida as soluções foram incubadas durante 20 minutos em banho-maria a  $37 \pm 1$  °C. Após arrefecimento, procedeu-se à leitura da densidade ótica a 625 nm.

A concentração do ião amónio nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão realizada com soluções padrão de sulfato de amónio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  com concentrações entre 0 e 2g/L.



**Figura 10** - Curva padrão do íon amónio, obtida pelo método descrito por Weatherburn *et al.*<sup>80</sup>. Equação da regressão linear obtida:  $Abs = 0,6151[NH_4^+g/L] - 0,0036$ ;  $R^2=0,9985$ , valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

### 2.6.6 Quantificação dos açúcares solúveis e do ácido acético

Os açúcares solúveis presentes no meio, no extrato aquoso de alfarroba (frutose, glucose e sacarose) e do ácido acético foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), permitindo uma monitorização do consumo de substrato ao longo de todo o processo de crescimento celular.

Para tal utilizou-se o sobrenadante obtido com a centrifugação para o peso-seco (secção 2.6.2), que foi filtrado com filtro de membrana hidrofóbica (Millipore), com uma porosidade de 0,2  $\mu m$ , para *vials*, frascos específicos para o equipamento de HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom). Este equipamento é constituído por uma coluna cromatográfica (Sugar-pack Biorad) ligada a uma pré-coluna (Carbo-P Biorad) e a um forno externo (L-2300). O aparelho é também composto por uma bomba (L-2130), um auto-injetor (L-2200) e um detetor (IR L-2490).

Para a fase móvel foi utilizado um eluente com 50 mg/L de  $CA^{2+}$ -EDTA em água Milli-Q, previamente desgaseificado num banho de ultrassons (Ultrason - Salecta) durante 30 min, para a remoção de todas as bolhas de ar. As análises de quantificação de açúcares e do ácido acético foram realizadas a 83 °C, com um fluxo de 0,5 mL/min, durante 20 min. Para a determinação da concentração de cada açúcar solúvel foram determinadas curvas padrão

com sacarose (0 - 110 g/L), frutose (0 – 40 g/L), glucose (0 – 40 g/L) e ácido acético (0-250 mM) para cada um dos ensaios realizados.

### 2.6.7 Extração dos lípidos totais

No final dos ensaios em reator procedeu-se à extração de lípidos totais, a partir da biomassa obtida na respetiva cultura. O processo foi realizado com base no método descrito por Folch *et al.*<sup>81</sup> o qual tem por base a solubilidade dos TAG em solventes orgânicos como o clorofórmio.

Previamente à extração propriamente dita é necessário romper e fragilizar toda a membrana celular permitindo a libertação dos TAG das estruturas celulares. Para tal sujeitou-se a suspensão celular a sucessivos choques térmicos, congelando e descongelando, três vezes. Em seguida, procedeu-se á rutura celular de cada amostra num sonicador de ponta (VC600 VibraCell Ultrasonic Processor, EUA), durante 5 min, com pulsos de 30 segundos, repetindo o procedimento 3 vezes. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Hettrich Zentrifugen Universal 320, Alemanha) a 5000 rpm durante 20 minutos, e descartou-se o sobrenadante. Preparou-se uma solução de clorofórmio/metanol 2:1 (v/v), a qual se adicionou ao obtido numa proporção de 20 mL por cada grama de biomassa. Para se obter o peso da biomassa pesou-se os falcons vazios, e após centrifugação. Após adição da solução, o *pellet* foi ressuspendido e homogeneizado num *vortex* (VELP Scientifica, Itália) durante 5 min e centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos (Hettrich Zentrifugen Universal 320, Alemanha) em seguida adicionou-se ao sobrenadante uma solução de NaCl a 0,1% (P/V). Centrifugou-se mais 5 minutos a 5000 rpm para garantir uma boa separação de fases. No final descartou-se a fração superior e recolheu-se a inferior que foi transferida para um balão de vidro, previamente pesado, de forma a se proceder à evaporação total do clorofórmio da solução. Os lípidos obtidos ficam assim solidificados no fundo do balão, que é então seco na estufa a  $50 \pm 1$  °C.

O peso dos lípidos obtidos na extração é calculado pela diferença do peso do balão com e sem lípidos. O rendimento da extração é obtido tendo em conta a biomassa inicial e a quantidade final de lípidos totais obtida, e é expresso pela seguinte equação:

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

Eq. 1

### 2.6.8 Análise do perfil em ácidos gordos

Para ser feita a análise do perfil lipídico por HPLC é necessário previamente proceder à hidrólise dos TAG extraídos, segundo o método descrito por Hein *et al*<sup>82</sup>.

Começou-se por diluir a amostra de lípidos extraídos numa solução de KOH 0,5M em etanol a 96%, numa proporção de 25 mL para 1 grama de amostra. A solução resultante foi colocada em ebulição num sistema de aquecimento por refluxo durante 1h. Em seguida, adicionou-se 25 mL de água destilada à mistura, deixou-se arrefecer, e acertou-se o pH para 5 com uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5M. A mistura resultante foi transferida para uma coluna de decantação onde se adicionou 20 mL de clorofórmio, obtendo-se uma mistura com separação de fases, da qual se recolheu a fase inferior. A amostra obtida foi concentrada num evaporador rotativo (Heidolph 94200, Alemanha) e filtrada para um *vial* com um filtro de membrana hidrofóbica (Millipore) e uma porosidade de 0,2 µm.

A análise por HPLC para a deteção dos ácidos gordos presentes nas amostras foi realizada no equipamento HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom), com uma coluna Alltima Alltech Hi-Load C18 (Grace), ligada a um forno (L-2300), um auto injetor (L-2200), um detetor (IR L-2490) e uma bomba (L-2130). Foi usado um eluente constituído por água/acetoneitrilo (1:99) previamente desgaseificado, por sonicação durante 30 min (Ultrason - Salecta). O fluxo de trabalho foi de 1,2 mL/min com o forno a uma temperatura de 35 °C.

Foram também preparados e analisados padrões de ácidos gordos, nomeadamente o ácido oleico, ácido palmítico, ácido linoleico e o ácido esteárico, com concentrações entre 2 e 10 g/L.

### 2.6.9 Extração de carotenoides totais

A extração dos carotenoides totais foi realizada tendo por base o método descrito por Buzzini *et al* (2005)<sup>83</sup>. As células foram recolhidas por centrifugação a 12 000 rpm, durante 20 minutos a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com água destilada. De seguida ressuspenderam-se as células em 3 mL de DMSO e incubou-se a 50 °C durante 1h. A

## Material e métodos

suspensões foram novamente centrifugadas, como referido acima, e reservou-se o sobrenadante (com cor), sendo este processo de extração por DMSO repetida 3 vezes. O *pellet* foi novamente ressuspendido em 3mL de acetona, sendo agitado no *vortex* até a solução ficar incolor. Juntaram-se as duas fases líquidas obtidas, as quais foram de seguida diluídas em água destilada até 15 mL. Os carotenoides foram extraídos com a adição de 5 mL de éter de petróleo até não haver nenhuma pigmentação na fase inferior, por um processo de decantação. A fase orgânica obtida foi então lavada repetidamente com água destilada, seca em NaSO<sub>4</sub>, filtrada e evaporada sob baixa pressão. Todos os passos anteriores foram realizados num ambiente de luminosidade reduzida, de forma a diminuir o risco de degradação dos pigmentos pela ação da luz.

### 2.6.10 Análise do perfil em carotenoides

A separação e análise cromatográfica dos carotenoides foi realizada num aparelho de HPLC (Merck Hitachi LaCrom Elite HPLC, Darmstadt, Alemanha) equipado com um detetor DAD, tal como descrito por Couso *et al*<sup>84</sup>. Utilizou-se ainda uma coluna cromatográfica RP-18, com um fluxo de trabalho de 1 mL/min. Na fase móvel foi utilizado acetato de etilo como solvente A, e uma solução de acetonitrilo:água (9:1), como solvente B. A programação para o gradiente aplicada foi: 0-16 min, 0-60% A; 16-30min, 60% A; 30-35 min, 100% A. O volume de injeção foi de 100 µL. A deteção dos pigmentos foi feita a um comprimento de onda de 450 nm. Os padrões de pigmentos utilizados foram fornecidos pela *Sigma*.

## 2.7 Parâmetros cinéticos do crescimento celular

### 2.7.1 Taxa específica de crescimento ( $\mu$ )

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

### 2.7.2 Produtividade volumétrica de lípidos

A produtividade volumétrica de lípidos ( $Prod Vol_L$ ) é calculada pela razão entre a concentração máxima de lípidos produzidos e o tempo necessário para a atingir. Desta forma, a  $Prod Vol_L$  é expressa em mg/ (L.h).

$$Prod Vol_L (mg/L.h) = [L]_{máx} / t$$

**Eq. 3**

### 2.7.3 Produtividade específica de lípidos

Por sua vez, a produtividade específica de lípidos ( $Prod Esp_L$ ) é calculada da mesma forma que a  $Prod Vol_L$ , mas tendo em conta a quantidade de biomassa existente no tempo em que foi atingida a concentração máxima de lípidos. Assim a  $Prod Esp_L$  é expressa em mg lípidos produzidos/(mg biomassa produzida.dia), e calculada através da Equação 4.

$$Prod Esp_L (mg/m.dia) = [L]_{máx} / ( [X] - [X]_i ) . t$$

**Eq. 4**

### 2.7.4 Rendimento de lípidos em função da biomassa

O rendimento de lípidos produzidos em função da biomassa ( $Y_{L/X}$ ) é calculado pela razão entre a massa de lípidos máxima produzida ( $L_{máx}$ ) e a massa de biomassa produzida ( $X$ ) no tempo ( $t$ ) correspondente, sendo expresso por g lípidos produzidos/ g Biomassa produzida, como representado pela equação 5.

$$Y_{L/X} (g/g) = ([L]_{máx} - [L]_i) / ([X] - [X]_i)$$

**Eq. 5**

### 2.7.5 Rendimento de lípidos em função do substrato

## Material e métodos

Por sua vez, o rendimento de lípidos produzidos (L) em função do substrato (S) consumido  $Y_{L/S}$ , expresso em g lípidos produzidos / g substrato consumido, pode ser determinado através da Equação 6.

$$Y_{L/S} (g/g) = ([L]_{máx} - [L]_i) / ([S]_f - [S]_i)$$

**Eq.6**

### 2.7.6 Rendimento de biomassa em função do substrato

O rendimento da biomassa (X) em função do substrato (S) é igualmente expresso em g biomassa produzida/ g substrato consumido, e pode ser calculado através da equação 7.

$$Y_{X/S} (g/g) = ([X]_{máx} - [X]_i) / ([S]_f - [S]_i)$$

**Eq. 7**

### 2.7.8 Tratamento estatístico

A todos os dados obtidos foi feito o tratamento estatístico em *software Microsoft Office Excel 2016*, bem como todas regressões lineares realizadas, as análises de variância foram realizadas através do teste *Student-Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) com o *software SigmaPlot versão 14*.

## 3. Resultados e discussão

---

### 3.1 Determinação do melhor rácio C/N utilizando resíduo em ácido acético como fonte de carbono

Neste estudo procedeu-se ao cultivo da levedura *R. toruloides* usando resíduos ricos em ácido acético como fonte de carbono de baixo custo, sendo avaliada a sua capacidade para a produção de biomassa e na acumulação lipídica. O rácio C/N tem sido amplamente reportado como o fator que mais influência tem na acumulação lipídica. Vários autores têm demonstrado que a levedura *R. toruloides* é capaz de acumular uma maior quantidade de lípidos neutros quando cresce em meio de cultura com elevados rácios C/N iniciais<sup>15,19,36,37,39,70,74,85</sup>. No entanto em todos estes estudos a fonte de carbono utilizada foi a glucose, ou açúcares solúveis de hidrolisados, desta forma o presente ensaio teve como objetivo determinar o melhor rácio C/N no crescimento e acumulação lipídica pela levedura, utilizando um resíduo rico em ácido acético como única fonte de carbono.

Foram assim realizados dois ensaios nos quais se testaram diferentes concentrações de resíduo rico em ácido acético (Ace) e correspondentes rácios C/N, em meios de cultura base com diferentes composições. Um ensaio foi realizado num meio de baixo custo constituído essencialmente por compostos inorgânicos baseado em Li *et al.* (2006)<sup>36</sup>, e um segundo ensaio foi realizado num meio mais nutritivo, constituído por compostos orgânicos, baseado em Li *et al.* (2007)<sup>37</sup>, tal como descrito na secção 2.4.3.

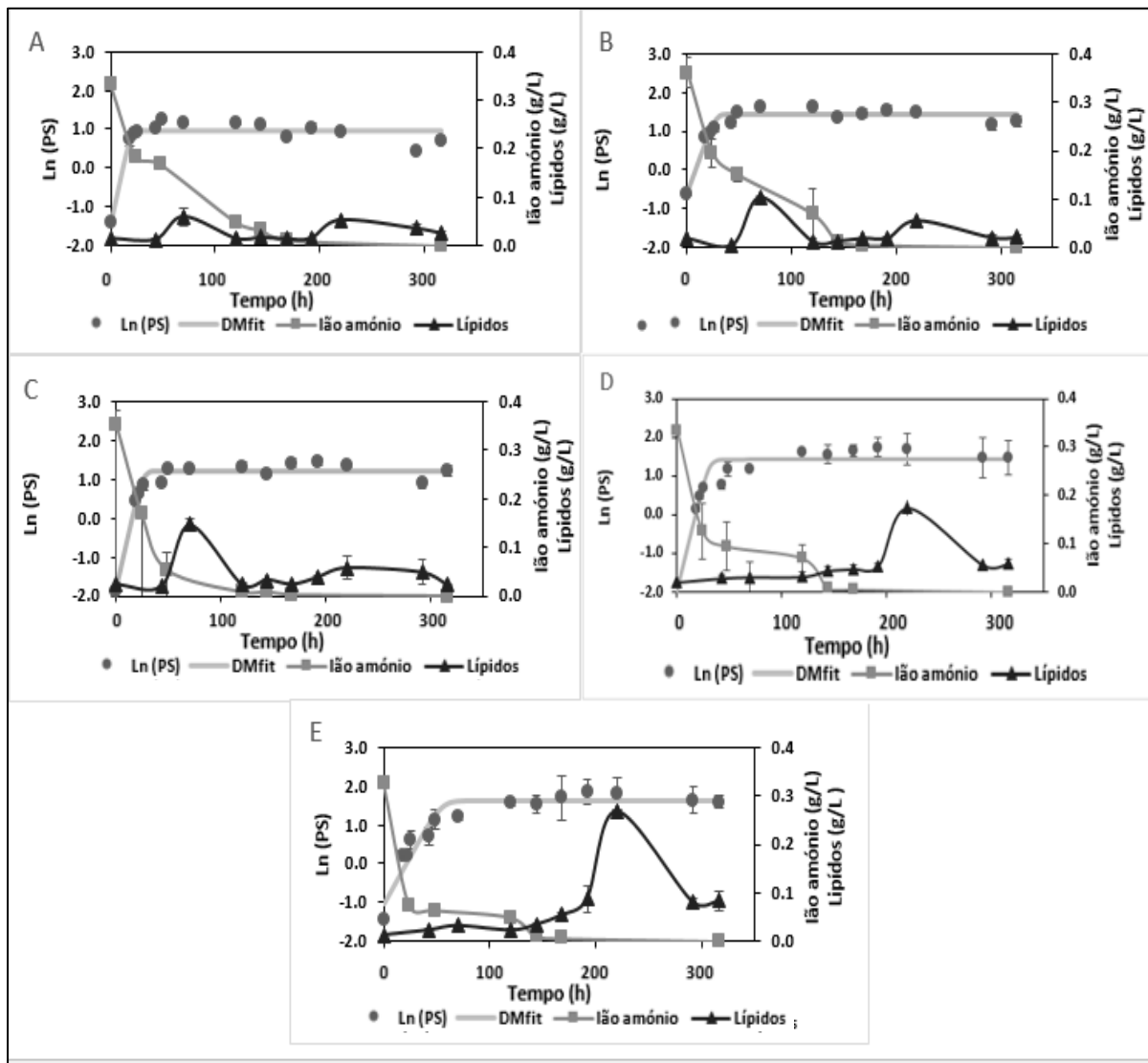
#### 3.1.1 Determinação do melhor rácio de C/N com resíduo de ácido acético como fonte de carbono em meio inorgânico

Num primeiro ensaio foram testadas as concentrações de Ace, 3, 6, 9, 12 e 15 g/L com rácios C/N a variar entre 55 e 70. Neste ensaio foi utilizado um meio de cultura base essencialmente inorgânico (secção 2.4.3), sendo o nutriente limitante o sulfato de amónio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) com uma concentração inicial de 0,1 g/L.

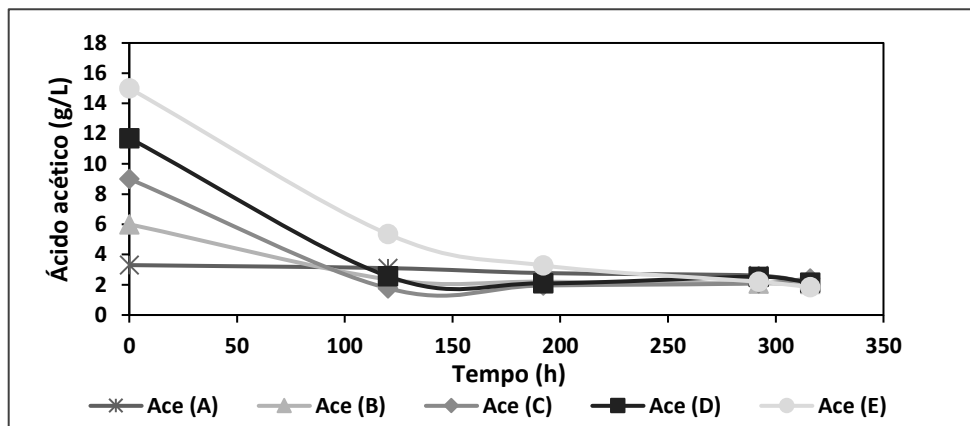
## Resultados e discussão

O objetivo principal deste ensaio foi avaliar o crescimento da levedura *R. toruloides* em Ace, e determinar o rácio C/N mais indicado para a produção de biomassa e lípidos neutros. Para avaliar o estado fisiológico da cultura, determinou-se também a viabilidade celular ao longo da cultura.

Desta forma traçou-se o perfil de crescimento das culturas, bem como o consumo da fonte de azoto e de Ace e produção de lípidos neutros, ao longo das 316 h de cultura (figura 11 e 12). Os parâmetros cinéticos foram igualmente calculados, encontram-se representados na tabela 4.



**Figura 11** - Perfis de crescimento, acumulação lipídica e consumo de azoto pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em meio inorgânico com diferentes concentrações de ácido acético (Ace): (A) 3 g/L; (B) 6 g/L; (C) 9 g/L; (D) 12 g/L; (E) 15g/L; com rácios de 55, 58, 62, 65 e 70, respetivamente. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer* durante 316h, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores medios (n=3)  $\pm$  erro padrão.



**Figura 12** - Curva do consumo de substrato ao longo de 316 h de cultura pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes rácios C/N, e fonte de carbono a (A) 3 g/L; (B) 6 g/L; (C) 9 g/L; (D) 12 g/L; (E) 15 g/L de ácido acético; com rácios de 55, 58, 62, 65 e 70, respetivamente. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e 30 ± 1  C. Valores médios (n=3) ± erro padrão.

**Tabela 4** - Parâmetros cinéticos do crescimento e acumula o lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em diferentes rácios C/N, com ácido acético como fonte de carbono, os crescimentos foram realizados em modo descontínuo, em balão *erlenmeyer*, durante 316 h a 200 rpm e 30 ± 1  C. Valores médios (n=3) ± erro padrão.

| Rácio C/N                       | 55                       | 58                       | 62                       | 65                       | 70                       |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| [Ace] (g/L)                     | 3                        | 6                        | 9                        | 12                       | 15                       |
| $\mu$ (h <sup>-1</sup> )        | 0,99 ± 0,06 <sup>a</sup> | 0,08 ± 0,01 <sup>b</sup> | 0,07 ± 0,00 <sup>c</sup> | 0,04 ± 0,00 <sup>d</sup> | 0,04 ± 0,00 <sup>d</sup> |
| X <sub>m x</sub> (g/L)          | 3,53 ± 0,04 <sup>d</sup> | 5,15 ± 0,92 <sup>b</sup> | 4,29 ± 0,10 <sup>c</sup> | 5,75 ± 0,25 <sup>b</sup> | 6,41 ± 0,30 <sup>a</sup> |
| Lip <sub>m x</sub> (g/L)        | 0,07 ± 0,02 <sup>c</sup> | 0,11 ± 0,01 <sup>b</sup> | 0,15 ± 0,01 <sup>b</sup> | 0,25 ± 0,08 <sup>a</sup> | 0,27 ± 0,00 <sup>a</sup> |
| Prod <sub>L</sub> (mg/L.h)      | 0,69 ± 0,46 <sup>c</sup> | 1,50 ± 0,07 <sup>b</sup> | 2,07 ± 0,21 <sup>a</sup> | 1,14 ± 0,36 <sup>b</sup> | 1,23 ± 0,00 <sup>b</sup> |
| Prod esp. <sub>L</sub> (mg/g.h) | 0,20 ± 0,06 <sup>c</sup> | 0,28 ± 0,07 <sup>b</sup> | 0,48 ± 0,06 <sup>a</sup> | 0,13 ± 0,06 <sup>c</sup> | 0,20 ± 0,01 <sup>c</sup> |
| Y <sub>L/x</sub> (g/g)          | 0,02 ± 0,01 <sup>c</sup> | 0,02 ± 0,01 <sup>c</sup> | 0,03 ± 0,00 <sup>b</sup> | 0,03 ± 0,01 <sup>b</sup> | 0,04 ± 0,00 <sup>a</sup> |
| Y <sub>x/s</sub> (g/g)          | 1,18 ± 0,00 <sup>a</sup> | 0,86 ± 0,15 <sup>b</sup> | 0,48 ± 0,01 <sup>c</sup> | 0,48 ± 0,02 <sup>c</sup> | 0,43 ± 0,02 <sup>c</sup> |
| Y <sub>L/s</sub> (g/g)          | 0,03 ± 0,00 <sup>a</sup> | 0,05 ± 0,01 <sup>a</sup> | 0,06 ± 0,01 <sup>a</sup> | 0,08 ± 0,01 <sup>a</sup> | 0,15 ± 0,03 <sup>b</sup> |

Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), Concentra o de biomassa máxima (X<sub>máx</sub>), concentra o máxima de lípidos neutros acumulados (Lip<sub>máx</sub>), Produtividade lipídica volumétrica (Prod<sub>L</sub>), Produtividade lipídica específica (Prod esp.<sub>L</sub>), rendimento lipídico em fun o da biomassa (Y<sub>L/x</sub>), rendimento da biomassa em fun o do substrato Y<sub>x/s</sub> (g/g), rendimento lipídico em fun o do substrato Y<sub>L/s</sub> (g/g) Valores médios (n = 3) ± erro padrão, valores com a mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste Student-Newman-Keul test (P <0.05).

## Resultados e discussão

Numa primeira abordagem ao presente ensaio, com base na figura 11 e na tabela 4, é possível observar que a levedura *R. toruloides* tem a capacidade de crescer num meio com resíduo rico em ácido acético como única fonte de carbono. Analisando o perfil de crescimento das diferentes culturas, verifica-se que quanto menor for o rácio C/N do meio, mais rapidamente é atingida a fase estacionária do crescimento celular, sendo a fase exponencial mais pronunciada. Este facto está relacionado com o consumo do substrato, o qual esgota mais rapidamente nas culturas com menor concentração de ácido acético, nomeadamente nas de 6 e 9 g/L de Ace (figura 12). De notar ainda que na menor concentração de ácido acético, 3 g/L, quase não houve consumo de substrato, atingindo a fase estacionária mais cedo, e uma baixa produção de biomassa,  $3,53 \pm 0,04$  g/L. Na figura 11 é possível observar que no menor rácio C/N, 3 g/L Ace (figura 11A), a fase exponencial termina às 24 h enquanto que no rácio mais elevado com 15 g/L Ace (figura 11E) só termina às 70 h de cultura. Este facto é corroborado pelas taxas específicas de crescimento, dado que diminuem à medida que o rácio C/N do meio aumenta (tabela 4), embora a duração da fase ativa de crescimento tenha uma maior duração, a velocidade a que se dá o crescimento é menor. Por outro lado a produção de biomassa é potenciada com rácios C/N maiores, tendo-se conseguido obter uma produção de biomassa entre  $3,53 \pm 0,04$  g/L no menor rácio, e  $6,41 \pm 0,30$  g/L no rácio de 70, valores que estão de acordo com o estudo realizado por Huang *et al.*<sup>31</sup> no qual obtiveram uma biomassa máxima de 4,17 g/L, utilizando uma concentração de Ace de 20 g/L. Estes resultados demonstram que a levedura *R. toruloides* tem a capacidade de crescer em meio com resíduo de ácido acético como única fonte de carbono, no entanto quanto maior for a concentração deste resíduo, mais tempo leva a sua adaptação ao meio onde se encontra, daí a sua fase exponencial ser mais longa e ter uma menor taxa específica de crescimento. Por outro lado, como tem uma maior quantidade de carbono disponível no meio, o seu crescimento embora mais lento, é maior, obtendo-se assim concentrações celulares mais elevadas, isto é, uma maior produção de biomassa. Também, a questão de ser um resíduo, e as elevadas concentrações de Ace, poderão ter um efeito inibitório no crescimento celular. Analisando o rendimento  $Y_{x/s}$  (g/g), verifica-se que com o aumento da concentração de Ace, o  $Y_{x/s}$  diminui, embora haja maior disponibilidade de fonte de carbono no sistema, parte deste é canalizado para outras vias, diminuindo a produção de biomassa. Emoras os valores do rendimento lipídico em função do substrato  $Y_{L/s}$  (g/g) sejam baixos, estes aumentam com o a

## Resultados e discussão

concentração de Ace. O Ace poderá potencializar a acumulação de lípidos, sendo canalizado para esta via em deterioramento da produção de biomassa.

Tendo em conta que o ácido acético tem um efeito inibitório ao crescimento celular, tendo sido reportado por Huang *et al.*<sup>31</sup> que não existe crescimento com concentrações acima das 20 g/L, realizou-se um estudo à viabilidade celular da cultura de forma a avaliar a influência do ácido acético na capacidade de culturabilidade das células.

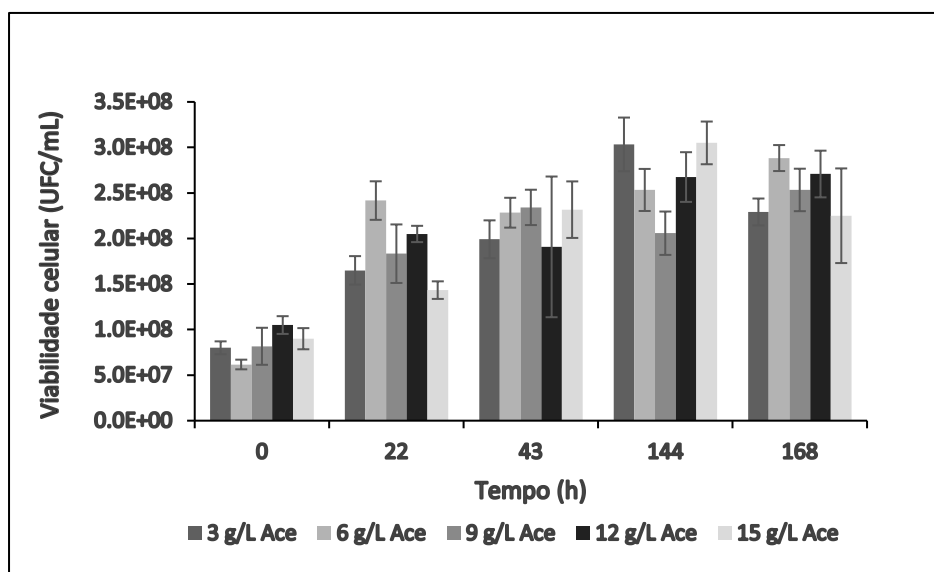


Figura 13 - Células viáveis da levedura *R. toruloides* CECT 1499 crescidas em meio com resíduo rico em ácido acético como fonte de carbono, com concentrações de 3, 6, 9, 12 e 15 g/L. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

O resíduo rico em ácido acético não aparenta ter um efeito inibitório para estas concentrações, uma vez que as leveduras se apresentaram viáveis durante pelo menos 170h de cultivo (figura 13), embora se tenha observado uma diminuição das taxas específicas de crescimento (Tabela 4). Comparando estes valores de viabilidade, da ordem dos  $10^8$ , com os obtidos por Martins<sup>70</sup>, da ordem  $10^7$ , em que usou resíduo de alfarroba como fonte de carbono, estes apresentaram ser de uma ordem de magnitude superior. Esta diferença revela o potencial de adaptação e resistência fisiológica da levedura *R. toruloides* em meios de cultura ricos em VFA, nomeadamente o ácido acético, confirmando assim resultados obtidos por outros autores como Huang *et al.*<sup>31</sup>, Bélingon *et al.*<sup>23</sup> e Christophe *et al.*<sup>62</sup>. Estes autores sugerem o seu uso para a conversão de resíduos ricos em VFA em TAG, permitindo assim a

## Resultados e discussão

valorização deste tipo de resíduos, e ainda minimizando o impacto da sua libertação para o meio ambiente, visto serem considerados nocivos e de elevada carga poluente.

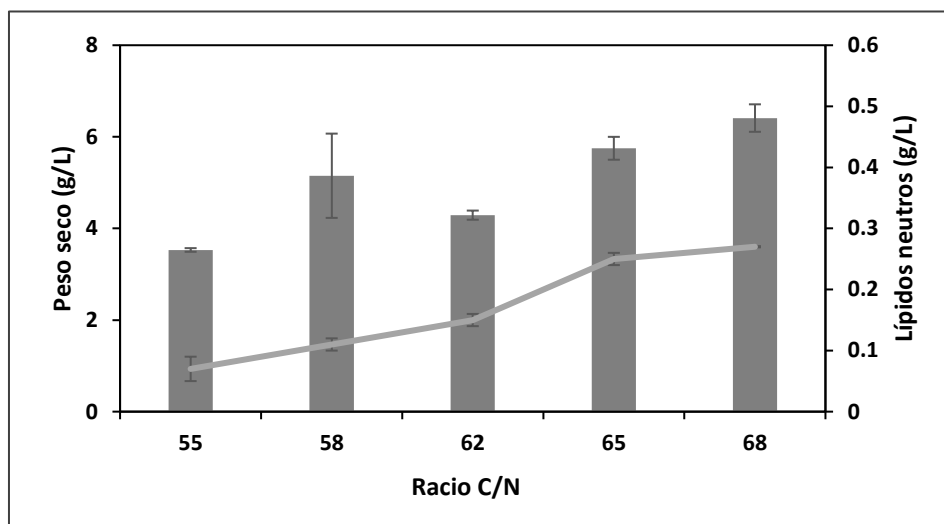


Figura 14 - Efeito do rácio C/N na produção de biomassa (barras) e lípidos neutros (linha) pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 após o *fed-batch* com adição de glucose a 10 g/L como fonte de carbono. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer*, por 316 h, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

A acumulação de lípidos tem início logo após o esgotamento do azoto no meio, efeito que se torna mais evidente com o aumento do rácio C/N nas culturas. Este facto é referido na literatura<sup>15,19,46,47</sup> e foi já verificado em estudos prévios realizados por Martins<sup>70</sup>. Observa-se também uma maior produção lipídica pela levedura *R. toruloides* com o aumento do rácio C/N (figura14), tendo-se atingido produções entre  $0,07 \pm 0,02$  g/L e  $0,27 \pm 0,00$  g/L, nos rácios entre 55 e 70, respetivamente. Estes resultados sugerem que o rácio C/N tem uma influência direta na produção de lípidos pela levedura *R. toruloides* em meio de cultura com resíduo rico em ácido acético como fonte de carbono, tal como foi observado e reportado anteriormente por vários autores utilizando a glucose ou o extrato de alfarroba como fontes de carbono<sup>70,74</sup>. Analisando ainda o consumo do azoto ao longo da cultura observa-se um perfil semelhante em todas as condições, esgotando por volta das 120 h de cultura, à exceção das condições com 9 g/L e 15 g/L (figuras 11C e 11E) que atingiram concentrações muito baixas às 70 e 24 h, respetivamente. Observa-se que a velocidade de consumo da fonte de azoto é relativamente lenta quando comparado com estudos realizados utilizando glucose ou extrato de alfarroba como fontes de carbono, nos quais o azoto se esgota entre as 24 e as 48 h<sup>70,76</sup>. Este

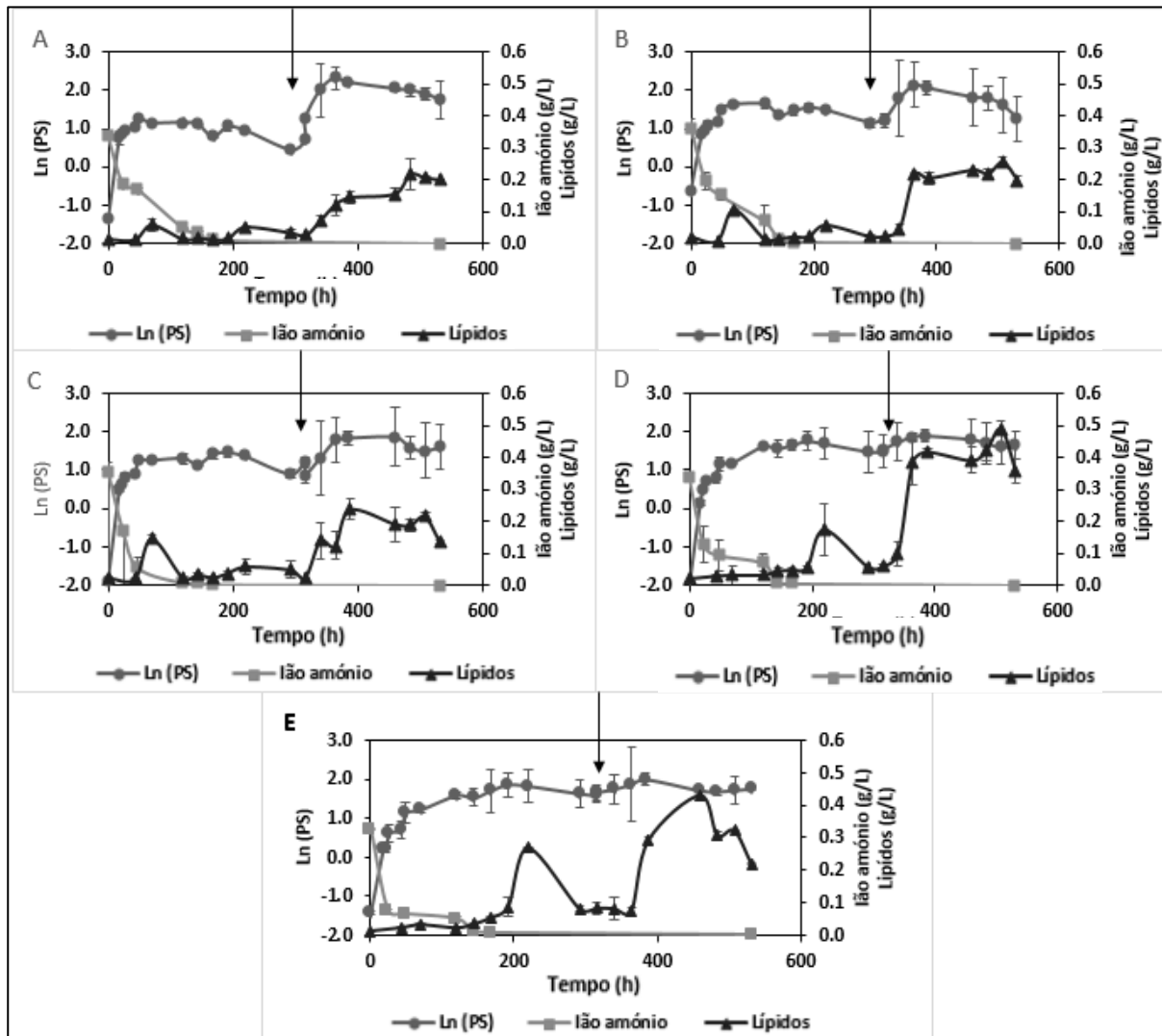
## Resultados e discussão

retardamento no consumo do azoto pode ser devido possivelmente ao crescimento ser mais lento.

Por outro lado, em termos de produtividades, volumétrica e específica, verifica-se que foram mais elevadas com um rácio C/N de 62, sendo significativamente diferentes das obtidas com um rácio de 65 ou de 70 (tabela 4). Isto acontece porque apesar de ter uma menor produção de lípidos, esta teve início mais cedo tendo sido atingido o pico máximo no rácio C/N de 62 às 70 h de cultura, enquanto que, no rácio de 70 o máximo de lípidos produzido foi atingido já depois das 200 h de cultura (figura 11E e 11C). Supõe-se que esta diferença entre a quantidade de lípidos produzidos e a produtividade das culturas, seja devida ao facto de a levedura já se encontrar adaptada ao meio com concentrações mais baixas de ácido acético, atingindo assim a fase estacionária mais cedo pela limitação da fonte de azoto, e consequentemente, dando início à produção lipídica mais cedo (figura 11C).

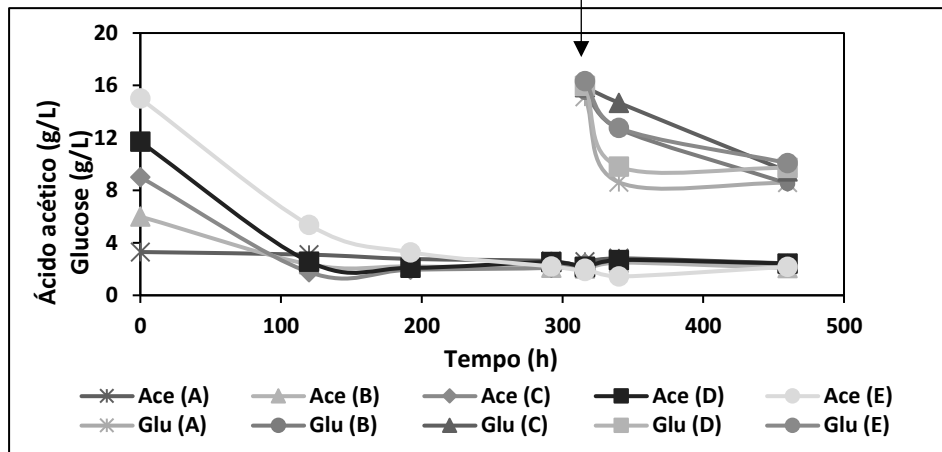
Tendo em consideração o baixo rendimento lipídico obtido neste ensaio até às 316 h de cultura, foi realizado *um fed-batch* com o intuito de se aumentar o rácio C/N, uma vez que os rácios com acético nunca são muito elevados, devido ao acético ser uma molécula com baixo número em C ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), apenas 2. Assim, adicionou-se a glucose, que é uma fonte de carbono para a qual a levedura tem elevada afinidade e rica em C, com o objetivo de se obter um rácio C/N elevado ( $\text{C/N} > 900$ ), que potencie a produção de lípidos. Neste sentido, procedeu-se à adição de 10 g/L de glucose, após as 316 h de cultura, limitando a cultura em azoto, sem qualquer adição de fonte de azoto.

Na figura 15 observa-se o perfil de crescimento da levedura *R. toruloides* ao longo de 550 h de cultura, o consumo da fonte de azoto, nutriente limitante, e ainda os lípidos neutros acumulados pela levedura. Na tabela 5 encontram-se apresentados os parâmetros cinéticos tendo em conta o *fed-batch* realizado.



**Figura 15** - Perfis de crescimento, acumulação lipídica e consumo de azoto pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes concentrações de ácido acético (Ace): **(A)** 3 g/L de Ace; **(B)** 6 g/L de Ace; **(C)** 9 g/L Ace; **(D)** 12 g/L Ace; **(E)** 15 g/L Ace; com rácios de 55, 58,62,65 e 70, respetivamente. Às 316 h de cultura foi feito um *fed-batch* com 10 g/L de glucose assinalado com a seta preta. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

## Resultados e discussão



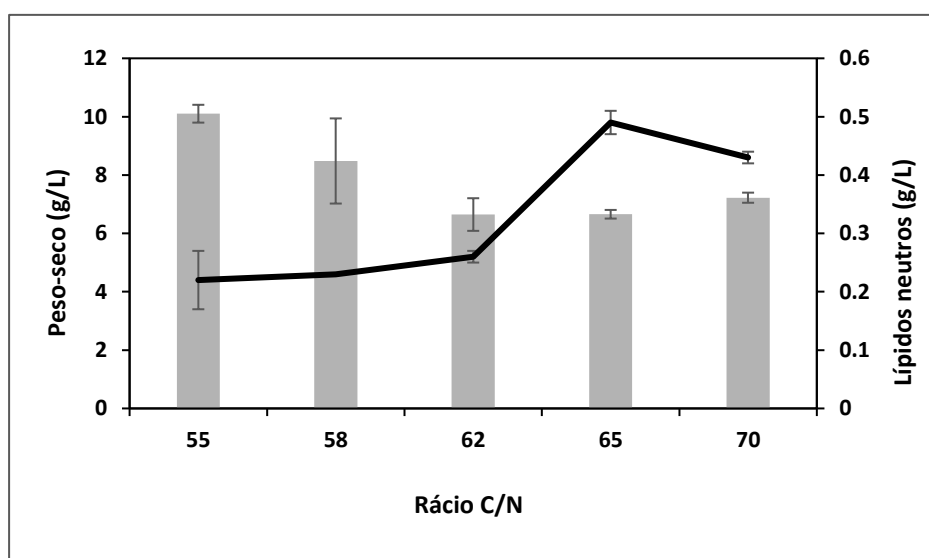
**Figura 16-** Curva do consumo de substrato ao longo de 316 h de cultura pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com diferentes rácios C/N, e fonte de carbono inicial a (A) 3 g/L; (B) 6 g/L; (C) 9 g/L; (D) 12 g/L; (E) 15 g/L de ácido acético; com rácios de 55, 58, 62, 65 e 70, respetivamente; às 316 h de cultura foi feito um *fed-batch* com 10 g/L de glucose assinalado com a seta preta. Os crescimentos foram realizados em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$   C. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão

**Tabela 5** – Parâmetros cinéticos do crescimento e acumula o lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em diferentes rácios C/N, com ácido acético como fonte de carbono. Os crescimentos foram realizados em *fed-batch*, em que às 316 h foram adicionados 10 g/L de glucose. As culturas decorreram em balão *erlenmeyer*, durante 500 h a 200 rpm e  $30 \pm 1$   C. Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

| Rácio C/N                | 55                 | 58                | 62                | 65                | 70                |
|--------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| [Ace] (g/L)              | 3                  | 6                 | 9                 | 12                | 15                |
| $\mu$ (h <sup>-1</sup> ) | $0,99 \pm 0,06^a$  | $0,08 \pm 0,01^b$ | $0,07 \pm 0,00^c$ | $0,04 \pm 0,00^d$ | $0,04 \pm 0,00^d$ |
| $X_{máx}$ (g/L)          | $10,10 \pm 0,31^a$ | $8,48 \pm 1,46^b$ | $6,65 \pm 0,56^b$ | $6,66 \pm 0,15^b$ | $7,22 \pm 0,30^b$ |
| $Lip_{máx}$ (g/L)        | $0,22 \pm 0,05^b$  | $0,23 \pm 0,00^b$ | $0,26 \pm 0,01^b$ | $0,49 \pm 0,02^a$ | $0,43 \pm 0,00^a$ |
| t (h) lip. máx           | $484 \pm 0,00^a$   | $460 \pm 0,00^a$  | $424 \pm 36,00^a$ | $508 \pm 0,00^a$  | $460 \pm 0,00^a$  |
| $Prod_L$ (mg/L.h)        | $0,45 \pm 0,10^b$  | $0,50 \pm 0,00^b$ | $0,62 \pm 0,08^b$ | $0,96 \pm 0,04^a$ | $0,93 \pm 0,02^a$ |
| $Prod_{esp. L}$ (mg/g.h) | $0,05 \pm 0,01^b$  | $0,04 \pm 0,01^b$ | $0,09 \pm 0,02^b$ | $0,18 \pm 0,04^a$ | $0,18 \pm 0,00^a$ |
| $Y_{x/s}$ (g/g)          | $0,03 \pm 0,00^c$  | $0,11 \pm 0,01^b$ | $0,11 \pm 0,02^b$ | $0,20 \pm 0,01^a$ | $0,20 \pm 0,04^a$ |
| $Y_{L/s}$ (g/g)          | $0,03 \pm 0,00^a$  | $0,03 \pm 0,00^a$ | $0,03 \pm 0,00^a$ | $0,05 \pm 0,01^a$ | $0,04 \pm 0,01^a$ |
| $\Delta Lip$ (%)         | 68                 | 52                | 42                | 49                | 37                |

Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), Concentra o de biomassa máxima ( $X_{máx}$ ), concentra o máxima de lípidos neutros acumulados ( $Lip_{máx}$ ), Produtividade lipídica volumétrica ( $Prod_L$ ), Produtividade lipídica específica ( $Prod_{esp. L}$ ), rendimento da biomassa em fun o do substrato  $Y_{x/s}$  (g/g), rendimento lipídico em fun o do substrato  $Y_{L/s}$  (g/g), Incremento no teor em lípidos antes e depois do *fed-batch* ( $\Delta Lip$ ). Valores médios ( $n = 3$ )  $\pm$  erro padrão, valores com a mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste Student-Newman-Keul test ( $P < 0.05$ ).

Após o *fed-batch* com a adição de glucose a biomassa produzida duplicou nos rácios de 55 e 58, observando-se igualmente um incremento de praticamente 70 % e 52 %, respetivamente, no teor de lípidos produzidos. Nos restantes rácios, o incremento lipídico também foi sendo elevado, observando-se com o rácio C/N 65 um aumento de 50 % na concentração de lípidos. A produção de lípidos seguiu a mesma tendência anterior ao *fed-batch*, sendo favorecida com o aumento do rácio C/N (figura 17), atingindo-se  $0,49 \pm 0,02$  g/L de lípidos neutros no rácio de 65 (figura 15.D). Na figura 16 observa-se que a glucose adicionada foi consumida maioritariamente nas primeiras 24 horas após a adição, sendo que o consumo foi mais rápido no menor rácio de 55, e nos mais elevados, 65 e 70. Sugere-se que o carbono adicionado, foi utilizado pelas células para a produção de biomassa nos rácios C/N mais baixos, tendo-se atingido  $10,10 \pm 0,31$  g/L no rácio de 55, enquanto que, nos rácios mais elevados o carbono terá sido canalizado para a síntese lipídica, atingindo-se  $0,49 \pm 0,02$  g/L de lípidos no rácio C/N de 65. Estes resultados reforçam a observação anterior, em que as culturas com rácio C/N mais elevado, embora tenham aumentado ligeiramente a biomassa produzida, canalizaram o carbono consumido para a produção de lípidos neutros.



**Figura 17** – Efeito do rácio C/N na produção de biomassa (barras) e lípidos neutros (linha) pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 após o *fed-batch* com adição de glucose a 10 g/L como fonte de carbono. As culturas foram mantidas em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão.

## Resultados e discussão

Analisando ainda o rendimento  $Y_{L/S}$  (g/g) verifica-se que tal como antes do *fed-batch*, concentrações superiores de substrato apresentam um maior rendimento lipídico em função do substrato, tendo o rácio de 65 apresentado o maior rendimento,  $0,05 \pm 0,01$ , corroborando as observações anteriores de que este rácio foi o que apresentou uma maior eficiência da conversão do substrato em lípidos neutros.

As produtividades volumétrica e específica lipídicas sofreram uma diminuição em comparação com os valores obtidos antes do *fed-batch*, uma vez que a eficiência de produção diminuiu devido à fase tardia em que se foram atingidos os valores máximos de lípidos produzidos, próximos das 500 h de cultura.

Com este ensaio foi possível demonstrar a capacidade da levedura *R. toruloides* de crescer em meio com resíduo rico em ácido acético como única fonte de carbono. Ficou também reforçada a influência do rácio C/N na acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides*, sendo esta mais elevada quanto maior for o rácio C/N da cultura, tal como foi observado nas duas fases do ensaio, antes e depois do *fed-batch*.

Este ensaio antevê potencial numa estratégia em que possa combinar o uso de duas fontes de carbono.

### 3.1.2 Determinação do melhor rácio de C/N com resíduo de ácido acético como fonte de carbono em meio orgânico

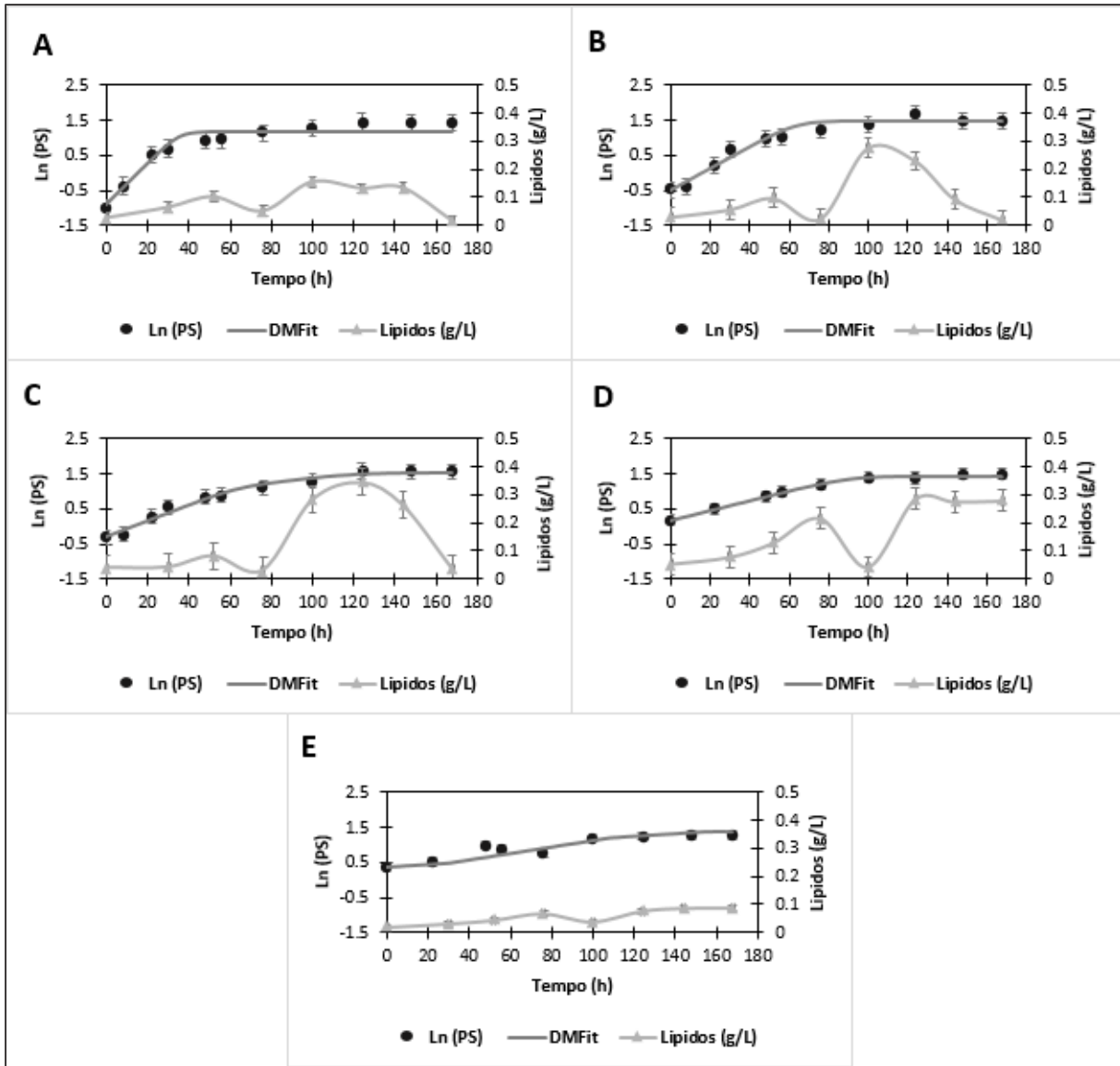
Como observado nos resultados obtidos no ensaio anterior, a produção de biomassa é limitada quando são utilizados resíduos ricos em VFA, sendo que em concentrações mais elevadas de ácido acético, acima de 20 g/L têm sido reportadas como inibitórias ao crescimento celular<sup>31</sup>. Desta forma foi desenvolvido um ensaio em modo descontínuo no qual foram testadas as mesmas concentrações de ácido acético, entre 3 e 15 g/L, num meio base orgânico, constituído por peptona e extrato de levedura a uma concentração de 15 g/L cada, como fontes de azoto e nutrientes base. Este meio foi selecionado com base no meio descrito por Li *et al.*<sup>37</sup>, no qual os autores conseguiram obter quantidades elevadas de biomassa na ordem de 70 g/L, usando a glucose como fonte de carbono.

## Resultados e discussão

O ensaio decorreu em condições idênticas ao anterior, em que a cultura foi crescida em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C, durante 180 h (Figura 18).

Observando os gráficos da figura 18 pode-se verificar que fase exponencial do crescimento celular é mais pronunciada nas concentrações de 3 e 6 g/L de Ace. Observa-se assim, o retardar do início da fase exponencial com o aumento da concentração do ácido acético, sugerindo-se uma pequena fase de latência. Embora no ensaio anterior, em meio de cultura inorgânico (secção 3.1), as fases exponenciais também se apresentassem longas, não se verificou o período de latência antes do início das mesmas, sendo que no presente ensaio praticamente não se observa uma fase exponencial nas concentrações de 12 e 15 g/L de Ace. Este facto poderá ser devido possivelmente a uma maior osmolaridade do meio orgânico quando comparado com o meio inorgânico.

Por outro lado, com o aumento da concentração do ácido acético, assiste-se à diminuição da taxa específica de crescimento máxima (tabela 6), sendo bastante baixa, para a concentração de 15 g/L, tal como se verificou no ensaio em meio inorgânico. No entanto, apenas se observa uma diferença significativa entre a taxa específica de crescimento máxima das culturas com a concentração de Ace mais baixa, comparada com as restantes, facto corroborado pela análise dos gráficos da figura 18, onde é possível verificar que apenas na concentração mais baixa de Ace (figura18.A), a fase estacionária é atingida perto das 40h de cultura, sendo que nas restantes condições esta fase apenas se torna evidente já após as 100h de cultura.



**Figura 18** - Perfis de crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 com concentração inicial de um resíduo à base de ácido acético com concentrações de: (A) 3 g/L; (B) 6 g/L, (C) 9 g/L, (D) 12 g/L e (E) 15 g/L. Os crescimentos foram realizados em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C

**Tabela 6** - Parâmetros cinéticos do crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em diferentes concentrações de ácido acético como fonte de carbono, em meio orgânico. Os crescimentos foram realizados em modo descontínuo, em balão *erlenmeyer*, durante 200 h a 200 rpm e  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Valores médios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

| [Ace] g/L                       | 3                 | 6                 | 9                 | 12                | 15                |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $\mu(\text{h}^{-1})$            | $0,06 \pm 0,01^a$ | $0,03 \pm 0,00^b$ | $0,02 \pm 0,00^b$ | $0,02 \pm 0,01^b$ | $0,01 \pm 0,00^b$ |
| $X_{\text{máx}}$ (g/L)          | $4,32 \pm 0,18^a$ | $5,48 \pm 1,12^a$ | $4,92 \pm 0,55^a$ | $4,47 \pm 0,07^a$ | $3,57 \pm 0,03^a$ |
| $\text{Lip}_{\text{máx}}$ (g/L) | $0,15 \pm 0,02^c$ | $0,28 \pm 0,06^b$ | $0,35 \pm 0,07^a$ | $0,29 \pm 0,02^b$ | $0,09 \pm 0,01^d$ |
| t (h) lip. máx                  | $100 \pm 0,00^c$  | $100 \pm 0,00^c$  | $124 \pm 0,00^b$  | $124 \pm 0,00^b$  | $168 \pm 0,00^a$  |
| $\text{Prod}_L$ (mg/L.h)        | $1,53 \pm 0,20^b$ | $2,76 \pm 0,55^a$ | $2,79 \pm 0,52^a$ | $2,30 \pm 0,12^a$ | $0,52 \pm 0,03^c$ |
| $\text{Prod esp.}_L$ (mg/g.h)   | $0,47 \pm 0,11^b$ | $0,81 \pm 0,25^b$ | $0,67 \pm 0,07^b$ | $1,10 \pm 0,16^a$ | $0,31 \pm 0,02^c$ |
| $\text{Prod X}$ (g/L.h)         | $0,03 \pm 0,00^a$ | $0,04 \pm 0,01^a$ | $0,04 \pm 0,00^a$ | $0,03 \pm 0,00^a$ | $0,13 \pm 0,10^a$ |
| $Y_{L/x}$ (g/g)                 | $0,04 \pm 0,01^b$ | $0,07 \pm 0,02^b$ | $0,07 \pm 0,01^b$ | $0,11 \pm 0,01^a$ | $0,04 \pm 0,00^b$ |

Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), Concentração de biomassa máxima ( $X_{\text{máx}}$ ), concentração máxima de lípidos neutros acumulados ( $\text{Lip}_{\text{máx}}$ ), Produtividade lipídica volumétrica ( $\text{Prod}_L$ ), Produtividade lipídica específica ( $\text{Prod esp.}_L$ ), rendimento lipídico em função da biomassa ( $Y_{L/x}$ ). Valores médios ( $n = 3$ )  $\pm$  erro padrão, valores com a mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste *Student-Newman-Keul test* ( $P < 0.05$ ).

Quanto à produção de lípidos, a concentração de ácido acético de 9 g/L foi a que apresentou uma maior quantidade,  $0,35 \pm 0,07$  g/L, correspondendo a uma percentagem de 7% de lípidos acumulados. Por outro lado, a concentração de 12 g/L de Ace foi a que induziu uma maior acumulação lipídica, com 11 % (p/p) relativamente à biomassa produzida. Considerando as produtividades específica e volumétrica, observa-se que estas foram mais elevadas quando comparadas com o ensaio em meio inorgânico, devido ao menor tempo de cultura necessário para que se atingisse o pico de máxima acumulação lipídica. No entanto a biomassa produzida foi ligeiramente mais baixa, com um máximo de  $5,48 \pm 1,12$  g/L no presente ensaio, e  $6,41 \pm 0,30$  g/L no ensaio em meio inorgânico.

Tendo em conta que o objetivo deste ensaio era avaliar a produção de biomassa em relação um meio essencialmente inorgânico, comparando os valores obtidos de biomassa e de lípidos, conclui-se que não existe vantagem na utilização de um meio constituído por compostos como a peptona e o extrato de levedura, que o tornam mais dispendioso em relação ao meio utilizado no ensaio anterior.

Isto evidencia a ideia de que a levedura *R. toruloides* tem a capacidade de crescer em meios menos nutritivos como o meio inorgânico e com um substrato pobre em carbono, como o resíduo de ácido acético, utilizado como fonte de carbono.

Dado que o meio inorgânico é menos dispendioso que o meio do presente ensaio, todos os ensaios realizados posteriormente foram feitos no meio inorgânico. Assim, para além da utilização de resíduos como fonte de carbono, ainda é utilizado um meio nutritivo de baixo custo, contribuindo desta forma com mais um fator para a redução do preço de produção de lípidos indicados na produção de biodiesel microbiano.

### 3.2 Estratégias de produção com a utilização de dois resíduos agroindustriais como fonte de carbono

Sempre com o intuito de aumentar a produção de biomassa e acumulação lipídica, desenvolveram-se diferentes estratégias de produção recorrendo a dois resíduos agroindustriais, um de extrato de alfarroba rico em açúcares solúveis como a glucose, frutose e a sacarose, e o outro rico em ácido acético.

#### 3.2.1 Cultura da levedura *R. toruloides* em modo *fed-batch*

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios anteriores, desenvolveu-se um ensaio onde se testaram concentrações iguais dos resíduos de ácido acético e extrato de alfarroba, sendo que desta vez a fonte de azoto não foi limitada com o objetivo de aumentar a produção de biomassa, e ainda comparar a eficiência da conversão de cada resíduo em lípidos neutros.

## Resultados e discussão

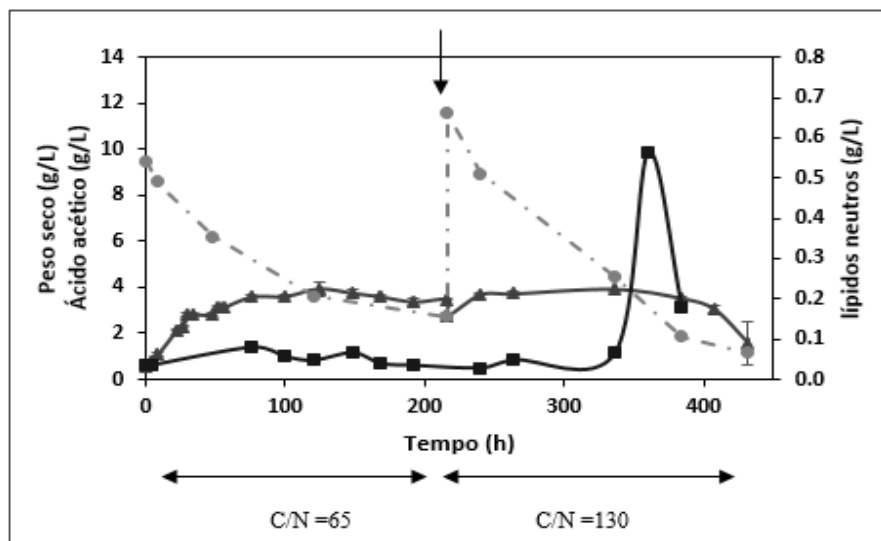
Com base na concentração de ácido acético que apresentou melhores resultados na produção de biomassa e acumulação lipídica, foi planejado um ensaio onde foram testadas três condições diferentes em *erlenmeyer*. Assim, foram testadas as concentrações de 9 g/L de Ace e 9 g/L de extrato de alfarroba. Foi também testada concentração de 70 g/L de resíduo de alfarroba, concentração ótima para ao crescimento e acumulação lipídica por esta levedura, segundo estudos prévios realizados no LEBA por Martins<sup>70</sup>. Após as 216 h de cultivo, procedeu-se a uma nova adição de meio, com as respectivas fontes de carbono, de forma a que a concentração no vaso fosse a inicial, 9 g/L.

Na Tabela 7 estão apresentados os parâmetros cinéticos e de crescimento das três condições testadas, e na figura 19 está representado o perfil de crescimento em *fed-batch* da levedura, crescida em meio rico em acético.

**Tabela 7** - Parâmetros cinéticos do crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em resíduo de ácido acético e resíduo de alfarroba como fontes de carbono. Os crescimentos foram realizados em modo *fed-batch*, em balão *erlenmeyer*, durante 500 h a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão.

| Fonte de carbono                | Ácido acético<br>9 g/L         | Açúcares de<br>Alfarroba<br>70g/L | Açúcares de<br>Alfarroba 9 g/L |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| $\mu$ (h <sup>-1</sup> )        | 0,04 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>   | 0,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>      | 0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
| X <sub>máx</sub> (g/L)          | 4,68 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>   | 7,44 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup>      | 6,01 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>   |
| Lip <sub>máx</sub> (g/L)        | 0,55 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>   | 0,10 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>      | 0,07 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>   |
| t (h) lip. máx                  | 360 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>    | 228 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>       | 138 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>    |
| Prod <sub>l</sub> (mg/L.h)      | 1,06 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>   | 0,54 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>      | 0,52 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>   |
| Prod esp. <sub>l</sub> (mg/g.h) | 0,45 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   | 0,07 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>      | 0,02 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>   |
| Y <sub>L/x</sub> (g/g)          | 0,19 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>   | 0,03 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>      | 0,07 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>   |
| Y <sub>x/s</sub> (g/g)          | 0,50 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>   | 0,14 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>      | 0,67 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>   |
| Y <sub>L/s</sub> (g/g)          | 0,052 $\pm$ 0,014 <sup>a</sup> | 0,007 $\pm$ 0,000 <sup>b</sup>    | 0,007 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup> |

Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), Concentração de biomassa máxima (X<sub>máx</sub>), concentração máxima de lípidos neutros acumulados (Lip<sub>máx</sub>), Produtividade lipídica volumétrica (Prod<sub>l</sub>), Produtividade lipídica específica (Prod esp.<sub>l</sub>), rendimento lipídico em função da biomassa (Y<sub>L/x</sub>), rendimento da biomassa em função do substrato Y<sub>x/s</sub> (g/g), rendimento lipídico em função do substrato Y<sub>L/s</sub> (g/g), Valores médios (n = 3)  $\pm$  erro padrão, valores com a mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste Student-Newman-Keul test (P < 0.05).



**Figura 19** - Perfis de crescimento (triângulos), acumulação lipídica (quadrados) e consumo de carbono (círculos) pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em meio com 9 g/L de ácido acético como fonte de carbono, em modo *fed-batch*. A seta indica a realização do *fed-Batch* á 216 h. Os crescimentos foram realizados em balão *erlenmeyer*, a 200 rpm e  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Valores medios ( $n=3$ )  $\pm$  erro padrão.

A cultura de *R. toruloides* teve a duração de 430 h, com um máximo de biomassa de  $4,68 \pm 0,02$  g/L e de lípidos neutros de  $0,55 \pm 0,02$  g/L, correspondendo a cerca de 20 % de lípidos acumulados em relação ao seu peso seco. O máximo de lípidos ocorreu às 360 h, num estágio tardio do crescimento, após esgotamento da fonte de azoto, às 340 h.

Estes resultados são semelhantes aos resultados obtidos no ensaio dos rácios em meio inorgânico, no entanto observou-se um aumento significativo da produção de lípidos, visto que a acumulação lipídica duplicou para a mesma concentração de Ace, 9 g/L. Tendo em conta que a única diferença entre os dois ensaios foi a fonte de carbono adicionada no *fed-batch*, é seguro assumir que o *fed-batch* com ácido acético é mais eficaz do que a adição de glucose como fonte de carbono numa fase avançada da cultura. De notar também, que a adição de uma maior concentração da fonte de azoto inicial não alterou a biomassa produzida em ácido acético, com a diferença de que nos ensaios anteriores o seu consumo foi mais rápido, tendo esgotado por volta das 100 h de cultura, já no presente ensaio tal só se verificou após as 300 h de cultura. Neste caso, a limitação em azoto deu-se numa fase mais tardia, retardando a acumulação lipídica.

## Resultados e discussão

Habitualmente, as concentrações de resíduos derivados de soluções de ácidos gordos voláteis (VFA) são inferiores a 50 g/L, o que faz com que os rácios C/N não sejam elevados. Neste ensaio, procedeu-se à adição da fonte de carbono, após 216 h, sem que tenha sido adicionada a fonte de azoto, com o intuito de aumentar a quantidade de carbono no meio e consequentemente o rácio C/N, de forma a promover o aumento da acumulação de lipídica. Neste caso, o aumento do rácio C/N não teve efeito na produção de biomassa, no entanto teve uma influencia no aumento da acumulação lipídica. O aumento da biomassa ocorreu no início da cultura com um rácio C/N de 65, mantendo-se constante após o aumento do rácio para 130. A acumulação lipídica ocorreu após o *fed-batch*, quando o rácio aumentou para 130. Verificou-se novamente o efeito reportado por vários autores, o aumento da acumulação lipídica para rácios C/N superiores, que pode ser explicado, a nível metabólico, pela acumulação do ácido cítrico, e consequente diminuição da atividade do ciclo de *Krebs*, induzindo a canalização desse ácido cítrico para a síntese lipídica <sup>46</sup>.

O rendimento lipídico ( $Y_{L/x}$ ) obtido nesta cultura foi de 20% em relação ao peso seco, com uma produtividade específica de  $0,45 \pm 0,01$  mg/g.h, valor mais elevado do que os valores obtidos com 9 e 70 g/L de resíduo de alfarroba,  $0,07 \pm 0,04$  mg/g.h e  $0,02 \pm 0,01$  mg/g.h respetivamente. Igualmente, o  $Y_{L/s}$  foi significativamente superior em relação às culturas com extrato de alfarroba, tendo-se obtido um rendimento de  $0,052 \pm 0,014$  g/g. Estes resultados evidenciam a eficiência da conversão do resíduo de ácido acético em lípidos neutros pela levedura *R. toruloides*. No caso dos crescimentos com resíduo de alfarroba, o  $Y_{L/x}$  em ambas as concentrações (9 e 70 g/L) foram idênticos, indicando que a eficiência da conversão dos açúcares da alfarroba em lípidos não se altera com o aumento da sua concentração no meio, dado que, mesmo após a adição de mais fonte de carbono nestas culturas, não se verificou acumulação lipídica. O contrário se observa com o ácido acético, visto que o aumento da sua concentração no meio se traduz num aumento do rendimento lipídico em função do substrato, dado observado nos ensaios anteriores com diferentes rácios C/N (secção 3.1).

Por outro lado, a produção de biomassa foi potenciada nas culturas com resíduo de alfarroba como fonte de carbono, com um máximo de biomassa obtida de  $7,44 \pm 1,92$  g/L nas culturas com uma concentração de 70 g/L.

Estes resultados sugerem uma nova abordagem que combine os dois resíduos, de forma a potenciar a produção de biomassa com extrato de alfarroba como fonte de carbono, numa

primeira fase de cultura e numa segunda fase, adicionar-se-ia o resíduo rico em ácido acético, de forma a induzir a acumulação lipídica. Com base no exposto, delineou-se uma estratégia de cultura de combinar os dois resíduos como fontes de carbono para o crescimento celular e a produção de lípidos.

### 3.2.2 Estratégia em STR combinando os dois resíduos agroindustriais como fonte de carbono

Os resultados obtidos nos ensaios anteriores demonstraram uma baixa eficiência na produção de biomassa utilizando o ácido acético como fonte de carbono, contudo este resíduo apresentou capacidade para potenciar a produção de lípidos.

Observou-se que a produção de biomassa duplica quando é utilizado o resíduo de alfarroba como fonte de carbono. Com base nestas constatações, definiu-se uma nova abordagem em reator biológico agitado mecanicamente (STR 2-L) em que foram combinados os dois resíduos. Assim, foi testado em STR uma estratégia sequencial em que as duas fontes de carbono, o extrato de alfarroba e o resíduo de ácido acético, foram adicionadas sequencialmente. A cultura de *R. toruloides* foi iniciada com 70 g/L de açúcares totais do resíduo de alfarroba e após um período de tempo, adicionou-se o resíduo rico em ácido acético na concentração de 15 g/L (Figura 20), com o intuito de aumentar a produção de biomassa numa primeira fase e, promover a acumulação lipídica, numa segunda fase. A cultura foi mantida em STR, com o pH controlado a 5,5, a 30 °C, 250 rpm e arejamento de 1 vvm.

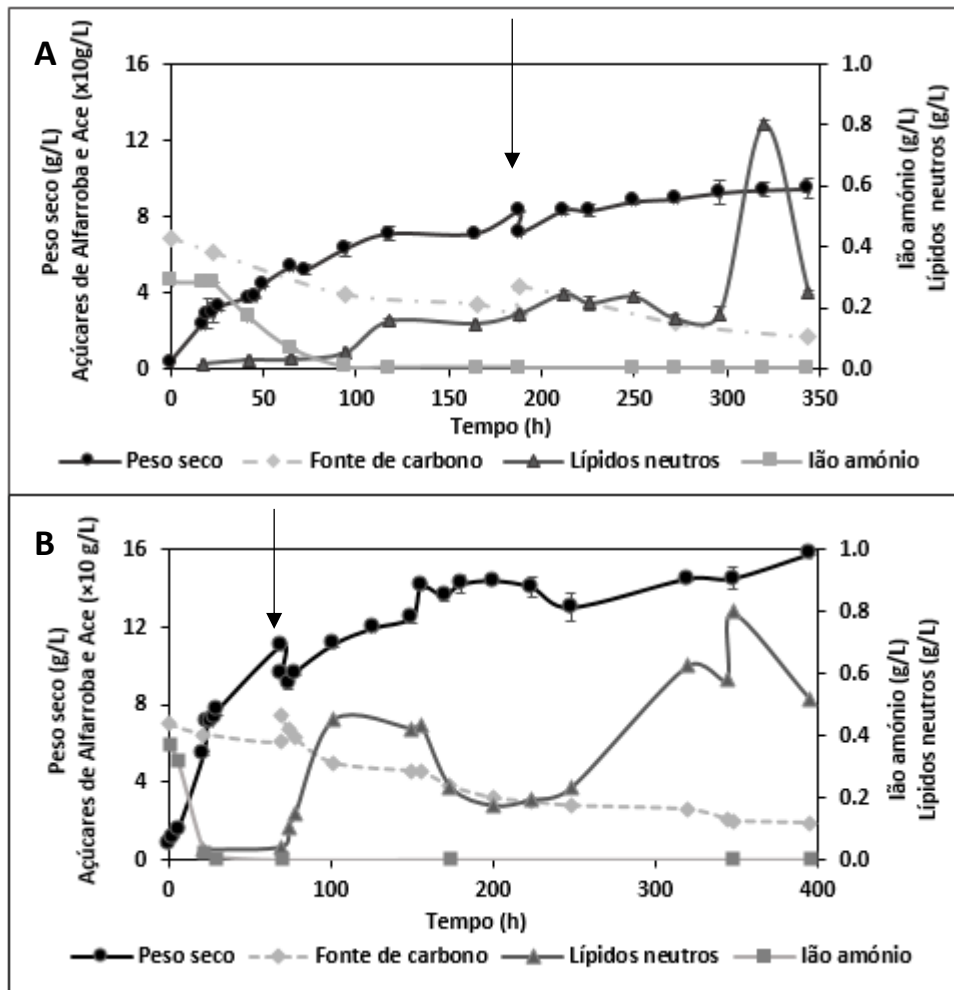
Foram realizados dois ensaios em reator STR nos quais se iniciou a cultura com 70 g/L de extrato de alfarroba como fonte de carbono e uma concentração de fonte de azoto limitante com 0,1 g/L de sulfato de amónio, com um rácio C/N correspondente de 180. As condições iniciais dos dois ensaios foram iguais, sendo que a diferença entre ambos residu no tempo em que se realizou a adição do ácido acético. Assim, no primeiro ensaio o *fed-batch* foi feito às 188 h, sendo que no segundo foi realizado às 77 h de cultura, a adição deu-se mais cedo. Os parâmetros cinéticos e de crescimento são apresentados na tabela 8.

**Tabela 8** - Parâmetros cinéticos do crescimento e acumulação lipídica pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em resíduo de alfarroba como fonte de carbono inicial, com um *fed-batch* de 15 g/L de ácido acético. Os crescimentos foram realizados em reator STR, durante 400 h a 200 rpm e  $30 \pm 1$  °C. Valores médios (n=3)  $\pm$  erro padrão.

|                                 | <i>Fed-batch</i> | <i>Fed-batch</i> |
|---------------------------------|------------------|------------------|
|                                 | 188 h            | 70 h             |
| $\mu$ (h <sup>-1</sup> )        | 0,05 $\pm$ 0,01  | 0,03 $\pm$ 0,02  |
| $X_{\text{máx}}$ (g/L)          | 9,51 $\pm$ 0,38  | 15,72 $\pm$ 0,10 |
| Lip <sub>máx</sub> (g/L)        | 0,80 $\pm$ 0,01  | 0,80 $\pm$ 0,01  |
| t (h) lip. máx                  | 320 $\pm$ 0,00   | 348 $\pm$ 0,00   |
| Prod <sub>L</sub> (mg/L.h)      | 2,16 $\pm$ 0,03  | 2,30 $\pm$ 0,03  |
| Prod esp. <sub>L</sub> (mg/g.h) | 0,23 $\pm$ 0,00  | 0,15 $\pm$ 0,00  |
| $Y_{L/x}$ (g/g)                 | 0,40 $\pm$ 0,01  | 0,27 $\pm$ 0,01  |
| $Y_{x/s}$ (g/g)                 | 0,19 $\pm$ 0,03  | 0,26 $\pm$ 0,13  |
| $Y_{L/s}$ (g/g)                 | 0,20 $\pm$ 0,08  | 0,05 $\pm$ 0,02  |

Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ), Concentração de biomassa máxima ( $X_{\text{máx}}$ ), concentração máxima de lípidos neutros acumulados (Lip<sub>máx</sub>), Produtividade lipídica volumétrica (Prod<sub>L</sub>), Produtividade lipídica específica (Prod esp.<sub>L</sub>), rendimento lipídico em função da biomassa ( $Y_{L/x}$ ). Valores médios (n = 3)  $\pm$  erro padrão.

A figura 20 apresentam o perfil de crescimento celular, o consumo da fonte de azoto e de carbono e a quantidade de lípidos produzida pela levedura *R. toruloides* em cada um dos ensaios.



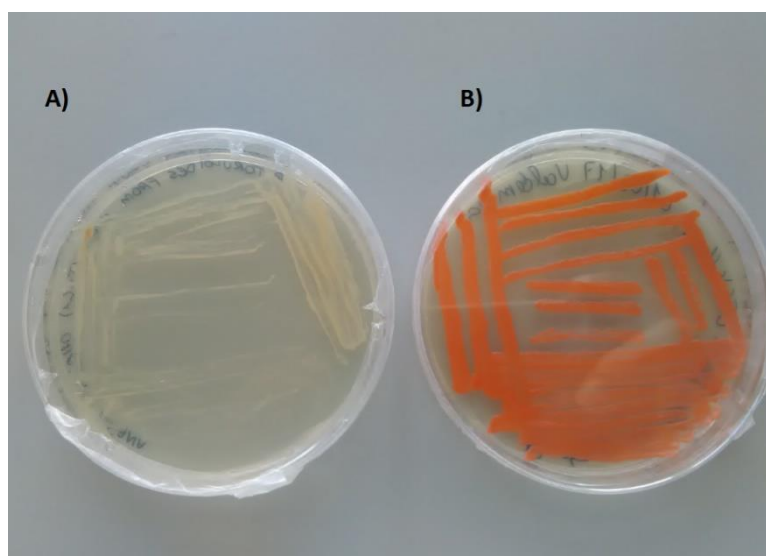
**Figura 20-** Perfil de crescimento em STR da levedura *R. toruloides* CECT 1499 com 70 g/L de resíduo de alfarroba como fonte de carbono, com a realização de um *fed-batch* com 15 g/L de ácido acético às 188 h de cultura (A) e 77 h (B), assinalados com uma seta preta. O crescimento foi realizado em reator STR, a 250 rpm, 1 vvm e 30 ± 1 °C. Valores medios (n=3) ± erro padrão.

O crescimento em reator biológico (STR) proporcionou um aumento da produção de biomassa e lípidos neutros pela levedura *R. toruloides* em relação ao crescimento em balão *erlenmeyer*. A biomassa máxima produzida no presente ensaio, em que o *fed-batch* foi às 188 h, foi de 9,51 ± 0,38 g/L, sendo que no ensaio em *erlenmeyer* obteve-se um máximo de 7,44 ± 1,92 g/L, para a cultura com 70 g/L (tabela 7), já a quantidade de lípidos neutros máxima produzida subiu das 0,55 ± 0,02, para 0,80 ± 0,01 g/L. Também a taxa específica de crescimento aumentou em relação aos ensaios anteriores em balão *erlenmeyer*, quer com ácido acético, quer com resíduo de alfarroba como fontes de carbono iniciais, tendo-se obtido uma taxa de 0,05 ± 0,01 h<sup>-1</sup>. A esta taxa específica apenas se igualou no ensaio dos rácios em

## Resultados e discussão

meio orgânico com 3 g/L de Ace como fonte de carbono (tabela 6). Os rendimentos da biomassa e de lípidos em função do substrato,  $Y_{X/S}$  e  $Y_{L/S}$  respectivamente, sofreram igualmente um incremento, sendo este mais evidente no rendimento lipídico, indicando que a estratégia delineada permitiu uma conversão eficiente do ácido acético em lípidos. Um dos fatores que mais pode ter contribuído diretamente para este aumento poderá ter sido o arejamento mais eficiente da cultura, visto que em STR 2-L o arejamento foi realizado utilizando-se dois dispersores porosos e um caudal de 1 vvm, parâmetros otimizados por Guerreiro<sup>76</sup> e por Martins<sup>70</sup>, enquanto que em *erlenmeyer*, a agitação permite as trocas gasosas, mas a renovação do oxigênio no seu interior, apenas ocorre quando os balões são abertos para amostragem. Um arejamento contínuo e uma melhor eficiência da transferência de massa do oxigênio no meio de cultura proporcionada pelos dispersores porosos, tenham contribuído para um melhor crescimento celular e uma maior produção de lípidos. Sabe-se que a levedura *R. toruloides* é um microrganismo estritamente aeróbio, com elevadas necessidades energéticas para produção de biomassa e para o metabolismo lipídico, que são proporcionadas por um eficiente arejamento do meio<sup>71</sup>.

A influencia do oxigênio na cultura, pode ser observada experimentalmente em placas de cultura apresentadas na figura 21.



**Figura 21** - Culturas de levedura *R. toruloides* CECT 1499 em placas com meio sólido YPD; na placa **A)** as trocas gasosas foram limitadas pelo vácuo criado na placa por se apresentar selada, na cultura da placa **B)** não houve limitação de trocas gasosas. As culturas foram mantidas a  $30 \pm 1$  °C durante 100h.

## Resultados e discussão

A placa da figura 21.A sofreu uma limitação de oxigénio, pois encontrava-se selada e sob vácuo, de forma que o fornecimento de oxigénio foi limitado, apresentando a cultura uma coloração esbranquiçada e um menor crescimento. Enquanto que a placa da figura 21.B que não foi selada, permitiu as trocas gasosas, pelo que não sofreu limitação de oxigénio, possibilitando assim que a cultura ganhasse uma coloração alaranjada, típica da produção de carotenoides e um crescimento mais acentuado. Esta diferença é bem visível na coloração das culturas crescidas em placa.

Neste ensaio em STR, a fase exponencial do crescimento é mais acentuada nas primeiras 28 h de cultura, no entanto continuou a haver algum crescimento celular até às 100 h de cultura, altura em que o azoto do meio é totalmente consumido.

O aumento da biomassa ocorreu durante a primeira fase da cultura, na qual a fonte de carbono foi o extrato de alfarroba, rica em glucose, frutose e sacarose. Nesta fase torna-se evidente que o metabolismo celular está a ser canalizado para a produção de biomassa, tendo sido produzidas 8 g/L nas primeiras 180 h de cultura. Na segunda fase da cultura em *fed-batch*, foi adicionado o resíduo rico em ácido acético a 15 g/L, promovendo um excesso em carbono e assim, alterando o rácio C/N, e conseqüentemente, induzindo a acumulação de lipídica. Foram produzidos 0,8 g/L de lípidos neutros, com uma produtividade de 2,16 mg/L.h. O total de lípidos extraídos foi de 40 % (p/p), apresentando um aumento relativamente às estratégias anteriores.

Embora os resultados obtidos tenham sido bastante promissores, uma vez que o rendimento em lípidos é elevado, verificou-se que possivelmente a adição da segunda fonte de carbono tenha sido um pouco tardia, uma vez que o crescimento praticamente entrou em fase estacionária por volta das 100 h. Na perspetiva de melhorar o sistema em *fed-batch*, procedeu-se a um novo ensaio em que o tempo da adição do resíduo rico em ácido acético em meio fresco foi feita às 70 h, sem adição de fonte de azoto, o sulfato de amónio. Esta adição teve também como objetivo o fornecimento de todos os nutrientes necessários ao bom funcionamento fisiológico celular, mantendo a limitação em azoto (figura 20.B).

Neste ensaio (figura 20.B) a biomassa foi potenciada, atingindo 15,72 g/L, sendo maioritariamente produzida nas primeiras 100 h de cultura. Após a adição do resíduo rico em ácido acético observou-se um aumento da produção de lípidos até às 102 h de cultura,

## Resultados e discussão

atingindo o seu máximo às 348 h, contudo a acumulação lipídica não ultrapassou os 27 % (p/p), um valor menor que no ensaio anterior onde se obteve 40 % (p/p). Após o esgotamento do azoto no meio, às 30 h, a fase exponencial do crescimento desacelera, sendo que a produção de lípidos só é efetivamente iniciada quando é feita a adição do resíduo de ácido acético, a partir das 70 h de cultura.

Tal como nos ensaios anteriores, também se verificou uma forte relação entre o início da síntese lipídica e a concentração do ião amónio presente no meio, sendo que esta ocorre na fase estacionária do crescimento, após o esgotamento do mesmo. Nesta fase há consumo de carbono, o qual é canalizado maioritariamente para a produção de lípidos. Nestes ensaios em STR, o azoto das culturas esgotou por volta das 100h (Figura 20.A) e 30 h (Figura 20.B), impondo uma limitação nutricional, que em conjunto com a adição de ácido acético às 188h e 70 h, respetivamente, gerou um aumento do rácio C/N, que favoreceu a produção de lípidos.

Os ensaios em STR comprovaram que o comportamento da levedura *R. toruloides* é diferente nas duas fases da cultura em *fed-batch*, sendo que numa primeira verificou-se que o extrato de alfarroba, rico em açúcares como a glucose, frutose e a sacarose, favoreceu a produção de biomassa, enquanto que o ácido acético potenciou a acumulação lipídica. Tal como nos ensaios em *erlenmeyer*, estes resultados estão de acordo com as observações realizadas por Huang *et al*<sup>59</sup>, para a levedura *R. toruloides*, onde os autores verificam que o teor em lípidos é mais elevado quando é cultivada em meio com ácido acético do que em meio com glucose como fontes de carbono.

Os resultados obtidos indicam o potencial de combinar dois resíduos agroindustriais para o crescimento da levedura *R. toruloides* e produção de lípidos neutros. Demonstram assim que é possível potenciar a produção de biomassa com o resíduo de alfarroba, rico em açúcares solúveis, para os quais a levedura tem uma elevada afinidade, e conseqüente crescimento mais rápido, e por outro lado os VFA, nomeadamente resíduos ricos em ácido acético, podem ser utilizados apenas como indutores da síntese lipídica, numa segunda fase da cultura na qual não se dá praticamente produção de biomassa.

Contudo, devem ser realizados novos estudos, seguindo esta abordagem, mas com o intuito de melhorar as produtividades, através da diminuição do tempo de cultura e aumentos da biomassa e lípidos acumulados.

### 3.3 Análise do perfil lipídico em ácidos gordos produzidos pela levedura

Sabe-se que a composição do perfil lipídico dos ácidos gordos, os quais podem ser saturados, polinsaturados ou monoinsaturados, tem influência na qualidade do biodiesel produzido a partir de biomassa orgânica. Tanto em óleos vegetais, usados, ou microbianos, a composição em ácidos gordos, pode variar, originando assim biodiesel com propriedades diferentes, tais como a estabilidade oxidativa, o ponto de ignição, a viscosidade e o número de cetano<sup>15,37,86</sup>.

Devido à grande diversidade da matéria-prima utilizada para a obtenção de óleos para a produção de biodiesel, torna-se indispensável avaliar o perfil dos ácidos gordos de cada uma, de forma a estabelecer critérios de qualidade essenciais à produção deste tipo de biodiesel em larga escala.

Embora existam vários estudos onde é avaliado o perfil lipídico da levedura *R. toruloides*, a grande maioria utiliza a glucose, ou outras soluções ricas em açúcares solúveis, como fonte de carbono<sup>37,45,56,85</sup>. No presente estudo, visto que são utilizados os resíduos de alfarroba e ácido acético, como fonte de carbono, é importante avaliar a sua influência na síntese de ácidos gordos.

Desta forma foi avaliado o perfil lipídico da levedura *R. toruloides* crescida em reator biológico STR 2-L com um arejamento de 1 vvm e resíduo de alfarroba como fonte de carbono inicial, com um *fed-batch* de 15 g/L de ácido acético. Para a avaliação do perfil lipídico, foi então feita a extração e hidrólise dos lípidos totais presentes na suspensão celular obtida no final das culturas, tal como descrito nas secções 2.6.7 e 2.6.8.

Na tabela 9 encontram-se os resultados dos perfis lipídicos das culturas em reator biológico realizadas no presente trabalho com resíduo de ácido acético e alfarroba como fontes de carbono, podendo ser comparados com resultados previamente obtidos no LEBA e com os óleos vegetais mais utilizados na produção de biodiesel de 1ª geração.

Existe uma grande diversidade de ácidos gordos, sendo que na constituição dos óleos vegetais e derivados de microrganismos, os que se encontram em maior quantidade, geralmente são o ácido oleico, o ácido palmítico, o ácido esteárico e o ácido linoleico, no entanto a sua composição relativa varia, como referido anteriormente. No presente estudo

## Resultados e discussão

estes foram os ácidos gordos analisados, sendo que para além dos mesmos, podem ainda existir outros em quantidades muito inferiores, e por isso não são mencionadas na tabela 9.

**Tabela 9** - Perfil de ácidos gordos produzidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 crescida em meio com alfarroba como fonte de carbono inicial e *fed-batch* de ácido acético às 188h e às 70 h de cultura, comparados com os perfis de ácidos gordos de outras estirpes crescidas em diferentes fontes de carbono, e também óleos vegetais usados para a produção de biodiesel.

|   | Ácidos gordos % (p/p) |                 |                     |                     | Referências                           |
|---|-----------------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------------------------|
|   | Linoleico<br>C 18:2   | Oleico<br>C18:1 | Palmítico<br>C 16:0 | Esteárico<br>C 18:0 |                                       |
| <i>R. toruloides</i> CECT 1499 (Fed-batch Ace 188h) | 18,4 ± 2,5            | 33,3 ± 0,1      | 46,7 ± 2,7          | 1,5 ± 0,1           | Este trabalho                         |
| <i>R. toruloides</i> CECT 1499 (Fed-batch Ace 70h)  | 16,8 ± 0,3            | 39,2 ± 0,2      | 41,9 ± 0,1          | 2,0 ± 0,2           | Este trabalho                         |
| <i>R. toruloides</i> CECT 1499 (Batch alfarroba)    | 33,4 ± 0,4            | 61,5 ± 0,5      |                     | ---                 | Martins <sup>70</sup>                 |
| <i>R. toruloides</i> Y4 (glucose)                   | 13,1                  | 46,9            | 20,0                | 14,6                | Li. <i>et al.</i> <sup>37</sup>       |
| <i>R. toruloides</i> DMKU3-TK16 (glucose)           | 15,1                  | 41,5            | 22,5                | 14,6                | Kraisintu <i>et al.</i> <sup>56</sup> |
| <i>R. glutinis</i> TISTR 5159 (POME*)               | 7,3                   | 47,9            | 20,4                | 10,3                | Saenge <i>et al.</i> <sup>75</sup>    |
| <i>R. toruloides</i> (glicerol)                     | 39,5                  | 21,3            | 22,2                | 5,7                 | Gao <i>et al.</i> <sup>87</sup>       |
| <i>Chorella vulgaris</i> YSL04                      | 8,0                   | 53,0            | 22,0                | 5,0                 | Shanab <i>et al.</i> <sup>88</sup>    |
| Óleo de soja  | 56,0                  | 23,0            | 12,0                | 3,0                 | Ma. <i>et al.</i> <sup>89</sup>       |
| Óleo de milho                                       | 61,0                  | 25,0            | 12,0                | 2,0                 | Ma <i>et al.</i> <sup>89</sup>        |

\*Efluente do processamento do óleo de palma

Nos dois ensaios realizados em reator com as mesmas fontes de carbono em modo *fed-batch*, pode-se observar que a composição em ácidos gordos é muito semelhante, como seria de esperar, considerando que as condições de crescimento em ambos foram idênticas, apenas diferenciando no tempo da adição do ácido acético. Por outro lado, comparando com o perfil obtido por Martins.<sup>70</sup>, onde apenas foi utilizado o resíduo de alfarroba como fonte de carbono, observa-se que houve uma diminuição para metade na produção do ácido linoleico, tendo sido favorecida a produção dos ácidos oleico e palmítico. Estes resultados indicam que a

## Resultados e discussão

adição do ácido acético poderá ter influenciado o perfil lipídico da levedura *R. toruloides*. De notar também que, a diferença entre os perfis com resíduo de alfarroba e os perfis com glucose como fontes de carbono reportada por Martins<sup>70</sup>, tornou-se menos evidente no presente estudo com a adição do ácido acético. Comparando com a glucose como fonte de carbono, comparando o presente ensaio com o perfil obtido por Li *et al.*<sup>37</sup> e Kraisinto *et al.*<sup>56</sup>, com glucose como fonte de carbono, verificando-se que apenas o ácido palmítico apresenta um aumento significativo, acompanhado de uma diminuição do ácido esteárico. Como referido por Martins<sup>70</sup>, o facto dos ácidos oleico, linoleico e palmítico, serem produzidos em maiores quantidades, pode dever-se à presença destes ácidos gordos no resíduo de alfarroba, como reportado por Ayaz *et al.*<sup>90</sup>, onde os autores identificaram na sua composição o ácido oleico, com  $562 \pm 32 \mu\text{g/g}$ , e também os ácidos palmíticos e linoleico, com  $270 \pm 13 \mu\text{g/g}$  e  $245 \pm 16 \mu\text{g/g}$ , respetivamente.

Considerando ainda que diferentes microrganismos oleaginosos podem gerar diferentes perfis lipídicos, e tendo em conta que a microalga *Chlorella vulgaris* é uma das microalgas mais estudadas para a produção de lípidos adequados à obtenção de biodiesel, comparou-se também o perfil lipídico obtido no presente estudo com o perfil de *C. vulgaris* obtido por Shanab *et al.*<sup>88</sup>. Observa-se assim, na tabela 9, que os perfis lipídicos entre esta levedura e a microalga são semelhantes, com uma diferença mais acentuada quanto à produção de ácido oleico e palmítico, sendo que a levedura *R. toruloides* produziu maior quantidade de ácido palmítico do que oleico, o contrário é observado no perfil da microalga.

Tendo em conta que atualmente o tipo de biodiesel mais produzido em larga escala é o de 1ª geração, obtido a partir de óleos vegetais, também na tabela 9 é possível comparar o perfil lipídico da levedura *R. toruloides*, com os perfis dos óleos de soja e de milho, que são os mais utilizados na indústria dos biodiesel. Assim observa-se que o perfil da levedura *R. toruloides*, apresenta algumas diferenças em relação aos óleos de soja e milho, nomeadamente uma menor produção de ácido linoleico, e uma maior de ácido palmítico, sendo que as quantidades de ácido oleico e esteárico não diferem significativamente.

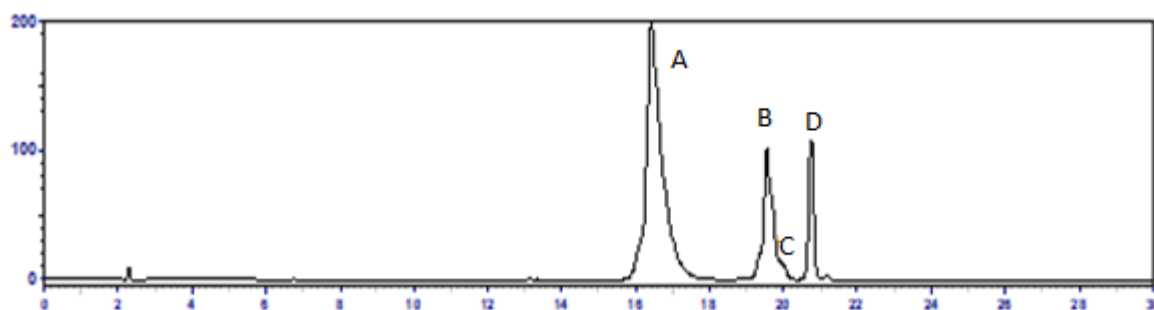
A qualidade do biodiesel produzido é influenciada pelo perfil lipídico do óleo do qual é obtido, sendo que para ser considerado um biocombustível de qualidade deve apresentar propriedades dentro dos limites estabelecidos pela Norma Europeia de Qualidade EN 14124<sup>16</sup>, apresentadas na tabela 1. O número de cetano é a propriedade do biodiesel mais influenciada

pelo perfil em ácidos gordos. Quanto maior for o número de cetano, melhor é a qualidade do biodiesel produzido. Por sua vez, o número de cetano, é mais elevado quanto maior for a quantidade de ácidos gordos monoinsaturados, como o ácido oleico, e polinsaturados como o ácido palmítico, presentes na sua composição<sup>86,91-94</sup>.

Considerando o perfil lipídico da levedura *R. toruloides* obtido no presente estudo e por outros autores apresentados na tabela 9, com elevadas quantidades de ácido palmítico e oleico na sua composição, sugere-se que o óleo obtido a partir deste microrganismo é adequado para a produção de biodiesel de 3ª geração. Tendo ainda em conta apenas o presente estudo, onde foram utilizados dois resíduos como matéria-prima para a conversão do carbono em ácidos gordos pela levedura *R. toruloides*, pode-se concluir que a utilização destes resíduos promove a síntese de ácidos palmítico e oleico, garantindo a qualidade do óleo produzido neste estudo para a sua utilização como biodiesel de 3ª geração.

### 3.4 Identificação e quantificação dos carotenoides produzidos pela levedura *R. toruloides* em STR

Realizou-se ainda a extração e quantificação dos carotenoides produzidos pela levedura *R. toruloides* crescida em reator biológico, STR, utilizando o resíduo de alfarroba como fonte de carbono. A análise por HPLC permitiu identificar os quatro principais carotenoides sintetizados por esta levedura, o torularodina, o toruleno, Y-caroteno e o  $\beta$ -Caroteno (figura 22), cujos tempos de retenção se encontram apresentados na tabela 10.



**Figura 22** - Cromatograma dos carotenoides obtidos da levedura *R. toruloides* CECT 1499, Os picos apresentados correspondem aos compostos: A) torularodina; B) toruleno; C) Y-caroteno e D)  $\beta$ -caroteno.

**Tabela 10** - Análise cromatográfica dos carotenoides, tempo de retenção e quantidades de carotenoides produzidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499 em reator STR, usando o resíduo de alfarroba como fonte de carbono.

| Carotenoides       | Tempo de retenção | mg/L  |
|--------------------|-------------------|-------|
| Torularodina       | 16,420            | 41,75 |
| Toruleno           | 19,553            | 15,65 |
| $\gamma$ -Caroteno | 19,980            | 2,38  |
| $\beta$ -Caroteno  | 20,753            | 15,79 |

Foram assim obtidas 75,58 mg/L de carotenoides totais na cultura de *R. toruloides* em STR, utilizando alfarroba como fonte de carbono. Estes resultados são relativamente elevados quando comparados com estudos realizados por Dias *et al.*<sup>55</sup> e Braunwald *et al.*<sup>74</sup>, que obtiveram quantidades de 0,3 e 1,2 mg/L de carotenoides totais, respetivamente, utilizando glucose como fonte de carbono. Em estudos realizados utilizando resíduos agroindustriais, diferentes autores obtiveram valores que variaram entre 5,9 mg/L e 123 mg/L de carotenoides<sup>95,96</sup>. A produção específica de carotenoides totais obtida neste estudo foi de 8,43 mg/g, valor superior ao referenciado noutros estudos realizados<sup>24,55,74,96</sup>. Também se verificou a produção de lípidos, com 1,25 g/L e um rendimento de 0,124 g/g, pelo que estes valores sugerem que a coprodução de carotenoides e lípidos é possível, e ambas podem ser otimizadas.

Na tabela 11 encontra-se apresentado o perfil dos carotenoides produzidos pela levedura *R. toruloides* obtido.

No presente estudo verifica-se que o torularodina foi o carotenoide mais produzido pela levedura *R. toruloides*, a mesma tendência é verificada em estudos realizados por outros autores, apresentados na tabela 11<sup>24,96</sup>. Por sua vez o  $\beta$ -caroteno e o toruleno foram produzidos em proporções similares. Observa-se também que de todos os estudos apresentados, apenas o crescimento em glicerol<sup>24</sup> favoreceu a produção do toruleno em maior quantidade que o presente estudo, no qual a produção deste carotenoide também foi favorecida quando comparada com os restantes estudos<sup>96</sup>. Possivelmente o extrato obtido do resíduo de alfarroba pode conter compostos que induzam uma maior produção de toruleno em relação a outro tipo de resíduos.

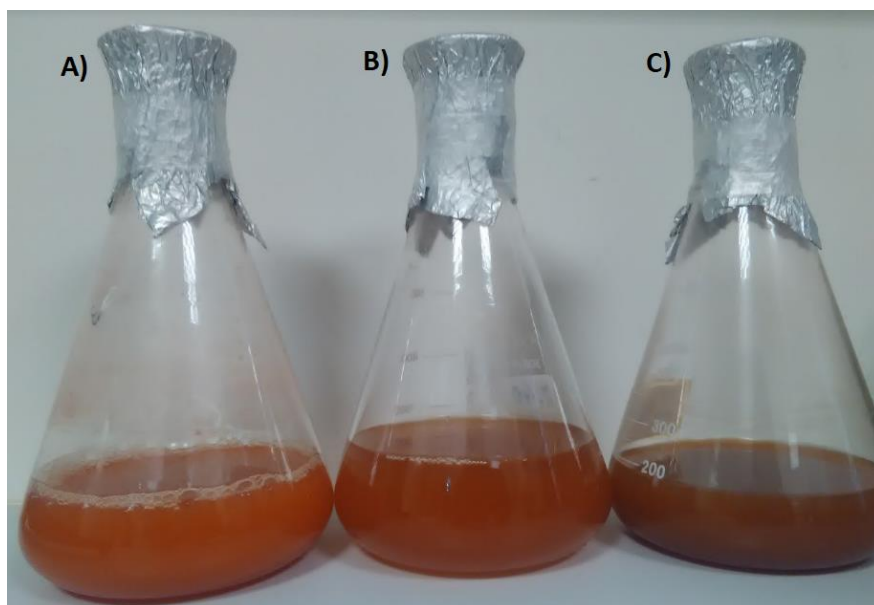
**Tabela 11** - Perfil dos carotenoides produzidos pela levedura *R. toruloides* CECT 1499, e comparação com resultados obtidos por outros autores, utilizando resíduos como fonte de carbono.

| Espécie                                       | Carotenoides |          |            |            | Referências                          |
|---|--------------|----------|------------|------------|--------------------------------------|
|   | Torularodina | Toruleno | Y-Caroteno | β-Caroteno |                                      |
| <i>R. toruloides</i><br><b>CECT1499 *</b>     | 55,3         | 20,7     | 3,1        | 20,9       | Este trabalho                        |
| <i>R. toruloides</i> <b>AC</b><br>(glicerol)  | 41,0         | 39,0     | -----      | 20,0       | Lee <i>et al.</i> <sup>24</sup>      |
| <i>R. toruloides</i> <b>CBS</b><br>(glicerol) | 69,0         | 7,0      | -----      | 24,0       | Lee <i>et al.</i> <sup>24</sup>      |
| <i>R. glutinis</i> <b>DBVPG</b><br>(CGM)**    | 78,8         | 9,3      | -----      | 9,2        | Buzzini <i>et al.</i> <sup>96</sup>  |
| <i>R. glutinis</i> <b>DBVPG</b><br>(GM)***    | 65,3         | 7,9      | -----      | 25,5       | Buzzini <i>et al.</i> <sup>96</sup>  |
| <i>R. glutinis</i> <b>DBVPG</b><br>(glucose)  | 85,0         | 10,8     | -----      | 0,0        | Buzzinni <i>et al.</i> <sup>96</sup> |

\*Resíduo de alfarroba; \*\*mosto de uva; \*\*\*mosto de uva concentrado

Tendo em conta os resultados obtidos, observa-se que o crescimento da levedura *R. toruloides* em meio com resíduo de alfarroba como fonte de carbono, é favorável à produção de carotenoides. A composição dos carotenoides é favorável, uma vez que os quatro carotenoides produzidos apresentam interesse comercial em diversas indústrias.

Visualmente observa-se que houve diferença na produção de carotenoides nas culturas crescidas em *erlenmeyer* com diferentes fontes de carbono (figura 23 e 24). As culturas crescidas com ácido acético como fonte de carbono (figura 23A e 24), possuem uma coloração alaranjada mais pronunciada do que os balões com 9 e 70 g/L de resíduo de alfarroba (figura 23B e 23C).



**Figura 23** - Imagem das culturas em *erlenmeyer* após 400 h de cultura com **A)** 9 g/L de Ace, **B)** 9 g/L alfarroba e **C)** 70 g/L alfarroba.



**Figura 24** - Imagem das culturas em *erlenmeyer* após 400 h de cultura em ácido acético (3-15 g/L).

Embora não tenham sido quantificados os pigmentos nestes *erlenmeyers*, a visualização das culturas permite ter uma percepção de que a sua produção é favorecida com o ácido acético como fonte de carbono. Sendo assim uma mais valia para a utilização deste resíduo num processo em larga escala de produção da levedura *R. toruloides*.

Em conjunto, estes resultados demonstram que é possível produzir carotenoides em simultâneo com a produção de lípidos, otimizando, mesmo utilizando resíduos como fonte de

## Resultados e discussão

carbono. Assim sugere-se que é possível integrar a sua extração e purificação num contexto de biorrefinaria, onde várias frações da biomassa são aproveitadas. A sua comercialização permitiria a redução dos custos totais da produção do biodiesel, tornando-se viável a sua produção em larga escala, com capacidade para competir com os combustíveis fósseis e com biocombustíveis de 1ª geração.

## 4. Conclusão e perspectivas futuras

---

### 4.1 Conclusão

O biodiesel de 3ª geração, produzido a partir de microrganismos oleaginosos, apresenta-se como uma potencial alternativa à utilização dos combustíveis fósseis no setor dos transportes. No entanto a sua comercialização em larga escala está dependente da redução dos custos associado à sua produção, sendo que estes ainda são elevados na atualidade. Torna-se assim importante o desenvolvimento de investigação nesta área, no sentido de redução de custos de produção, de forma a tornar viável a comercialização do biodiesel com preços que possam competir com os dos combustíveis fósseis, e com os biocombustíveis de 1ª geração.

O substrato mais utilizado no crescimento da levedura *R. toruloides* é a glucose, que por si só pode representar mais de 70% dos custos de produção totais do biodiesel a partir de microrganismos oleaginosos<sup>17</sup>. No presente trabalho, foram utilizados dois resíduos agroindustriais como fontes de carbono de baixo custo no cultivo da levedura *R. toruloides* CECT 1499, o resíduo de alfarroba e um resíduo rico em ácido acético.

Este estudo pode dividir-se em duas fases, sendo que numa primeira foi avaliada a capacidade da levedura *R. toruloides* para crescer e acumular lípidos em meio com resíduo rico em ácido acético como única fonte de carbono, e numa segunda fase onde se desenvolveram estratégias de cultura, utilizando o resíduo de ácido acético e o de alfarroba de forma a potenciar a produção de biomassa e acumulação lipídica.

Foram avaliados diferentes rácios C/N utilizando o resíduo de ácido acético como única fonte de carbono no crescimento e acumulação lipídica da levedura *R. toruloides* CECT1499, em meio de cultura essencialmente inorgânico. A fonte de azoto foi o sulfato de amónio numa com uma concentração limitante de 0,1 g/L. Neste ensaio foi obtida uma biomassa máxima de 6,41 g/L num rácio de 70 (15 g/L de Ace), por sua vez o rendimento lipídico máximo obtido foi de 4,4% (p/p) com 0,27 g/L de lípidos produzidos. Os rendimentos obtidos sofreram um incremento entre 37 a 68% em todos os rácios, com a adição de glucose a 10 g/L num *fed-batch* realizado às 316h de cultura, sendo o máximo de lípidos 0,49 g/L num rácio de 65.

## Conclusão e perspectivas futuras

Uma vez confirmado o potencial da levedura para crescer e acumular lípidos com resíduo de ácido acético como fonte de carbono, procedeu-se então à combinação do resíduo de ácido acético com o resíduo de alfarroba, para otimizar a produção de biomassa e de lípidos.

Foram testadas três condições diferentes, com concentrações de 9 g/L de resíduo de ácido acético e 9 e 70 g/L de resíduo de alfarroba, como fontes de carbono iniciais. Foi ainda utilizada uma concentração de sulfato de amónio de 0,5 g/L, de modo a não limitar a fonte de azoto. As concentrações de 9 g/L de ácido acético e alfarroba foram cultivadas em modo *fed-batch* com uma adição de 9 g/L da respetiva fonte de carbono às 216h de cultura, exceto a condição com 70 g/L, à qual não foi feita qualquer adição. Neste ensaio a produção de biomassa foi otimizada no meio de cultura com 70 g/L de resíduo de alfarroba onde se obteve  $7,44 \pm 1,92$  g/L de biomassa, por outro lado, a acumulação lipídica foi favorecida com o resíduo de ácido acético como fonte de carbono, onde se atingiu os 20% de lípidos acumulados pela levedura.

Com base nos resultados dos ensaios anteriores, delineou-se uma estratégia de aumento de escala em reator biológico mecanicamente agitado (STR), com o objetivo de combinar os dois resíduos, de forma sequencial. Assim, nos dois ensaios realizados, utilizou-se o extrato de alfarroba numa concentração de 70 g/L como fonte de carbono inicial, tendo sido feito um *fed-batch* com ácido acético de forma a aumentar o rácio C/N do meio, e consequentemente induzir a produção de lípidos. Nos dois ensaios realizados em STR apenas foi alterado o tempo da adição do *fed-batch*, num ensaio foi realizado às 188h de cultura, enquanto que no outro foi às 70 h de cultura. Nestes ensaios foi obtida uma biomassa máxima de  $9,51 \pm 0,38$  e  $15,72 \pm 0,10$  g/L, respetivamente. A acumulação lipídica também foi favorecida, obtendo-se um rendimento lipídico de 40% (p/p). Estes resultados são promissores, comprovando o potencial de se utilizarem os dois resíduos agroindustriais, combinados numa estratégia de cultura sequencial, no crescimento da levedura *R. toruloides* e produção de lípidos, com o fim de serem convertidos em biodiesel de 3ª geração.

O perfil lipídico desta levedura, utilizando os resíduos de alfarroba e ácido acético como fontes de carbono, é constituído maioritariamente pelos ácidos oleico, linoleico e palmítico, apresentando uma composição semelhante à dos óleos vegetais mais utilizados na produção de biodiesel de 2ª geração. O elevado teor em ácido palmítico e oleico sugere que os óleos produzidos pela levedura *R. toruloides* são adequados à produção de biodiesel de qualidade, com propriedades dentro dos limites estabelecidos pela Norma Europeia de Qualidade<sup>16</sup>.

## Conclusão e perspectivas futuras

Numa perspectiva de biorrefinaria, procedeu-se à quantificação dos pigmentos, sendo um produto de elevado valor. Procedeu-se à identificação e quantificação por HPLC dos carotenoides maioritários produzidos pela levedura, que foram a torularodina, o toruleno, o Y-caroteno e o  $\beta$ -caroteno. A produção total foi de 75,58 mg/L com uma produção específica de carotenoides totais de 8,43 mg/g PS, que comparando com outros estudos realizados, estes resultados apresentam-se como promissores, tendo em vista a coprodução de carotenoides e lípidos pela levedura, utilizando resíduos de alfarroba e ácido acético como fontes de carbono, num contexto de biorrefinaria.

Este estudo contribui assim, para o desenvolvimento de um processo sustentável de produção de biodiesel de 3ª geração utilizando um meio de cultura de baixo custo, e onde são valorizados dois resíduos agroindustriais, que ao serem convertidos em ácidos gordos pela levedura *R. toruloides*, passam a ser valorizados como matéria-prima, e em que o impacto ambiental da sua descarga para o meio ambiente é reduzido. Embora ainda sejam necessários mais estudos, nomeadamente de aumento de escala do processo, é possível concluir que a produção de biodiesel a partir de microrganismos oleaginosos utilizando resíduos como substrato para o seu crescimento, é uma realidade que poderá vir a competir no mercado com os combustíveis fósseis e biocombustíveis atuais de 1ª geração.

### 4.2. Perspetivas futuras

Embora tivessem sido feitos alguns avanços com o presente estudo, ainda existem vários aspetos do processo de produção de lípidos a partir da levedura *R. toruloides* que devem ser otimizados. Por um lado, a otimização das condições que favoreçam a acumulação de biomassa e conseqüentemente a acumulação lipídica.

A produção de biomassa pode ser otimizada através de estratégias que permitam um melhor crescimento celular, nomeadamente a utilização de um vetor de oxigénio, como o n-dodecano, que facilite a transferência de massa do oxigénio no meio de cultura, ou o aumento do caudal de arejamento.

Existem também autores que referem a adição de NaCl como forma de induzir um fator de stresse osmótico nas células, e conseqüente potenciação da acumulação lipídica e de

## Conclusão e perspectivas futuras

carotenoides<sup>22</sup>. Assim a adição conjunta de NaCl com o resíduo de ácido acético na segunda fase da cultura poderá ser uma estratégia que deveria ser testada em ensaios futuros.

Outra estratégia de cultivo poderá passar por ser feita uma cultura em duas fases, com substituição total do meio de cultura, onde numa primeira fosse fornecido azoto em excesso de forma a potenciar a biomassa e numa segunda fase, o meio de cultura não teria azoto, induzindo stress nutricional na cultura e aumentaria o rácio C/N induzindo a acumulação lipídica.

Por outro lado, poderiam ser explorados novos métodos de extração de lípidos e de carotenoides, visando a diminuição dos custos dos mesmos bem como o aumento do seu rendimento.

Para além dos carotenoides existem ainda enzimas de interesse biotecnológico que podem ser extraídas, purificadas e quantificadas, de modo a identificar todas as frações da biomassa com valor comercial.

## Bibliografia

---

1. Mccurdy, A. T., Bugbee, B. *Microbial-Derived Oils and Value-Added Products: Biosynthesis and Applications for Biofuel Production*. (2015).
2. Pratap, A., Nitin, S. *Biodiesel Production and Effect on DI Diesel Engine Combustion , Performance and Emissions Using Biodiesel and Its Blends - A Review*. International Journal of Engineering Research and Technology **1**, 1–12 (2012).
3. Ho, D. P., Ngo, H. H., Guo, W. *A mini review on renewable sources for biofuel*. Bioresource Technology. **169**, 742–749 (2014).
4. Demirbas, M. F. *Biofuels from algae for sustainable development*. Applied Energy **88**, 3473–3480 (2011).
5. Ferreira, S., Moreira, N. A., Monteiro, E. *Bioenergy overview for Portugal*. Biomass and Bioenergy **33**, 1567–1576 (2009).
6. Bonturi, N., Matsakas L., Nilsson R., Christakopoulos P., Alves Miranda E., Arvid Berglund K., Rova U., *Single cell oil producing yeasts Lipomyces starkeyi and Rhodosporidium toruloides: Selection of extraction strategies and biodiesel property prediction*. Energies **8**, 5040–5052 (2015).
7. Fei, Q., O'Brien, M., Nelson, R., Chen, X., Lowell, A., Dowe, N. *Biotechnology for Biofuels Enhanced lipid production by Rhodosporidium toruloides using different fed - batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source*. Biotechnology Biofuels 1–12, 1754-6834 (2016).
8. <https://ec.europa.eu/energy/en/topics/renewable-energy/biofuels> (visitado a 11 de Agosto de 2017).
9. Diário da República, 2.ª série — N.º 111 — 9 de junho de 2015. 3890–3891 (2015).
10. Soccol, C. R., Neto, J. D. C., Soccol, T. V., Bittencourt, S. E., Scopel, F. C., E., Bianchi, P. M. A., Porto de Souza Vandenberghe, L. *Pilot scale biodiesel production from microbial oil of Rhodosporidium toruloides DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study*. Bioresource Technology. **223**, 259–268 (2017).
11. Demirbas, A. & Demirbas, M. F. *Algae Energy*. (Springer London, 2010). doi:10.1007/978-1-84996-050-2
12. Körbitza, W., Friedricha, St., Wagingerb, E., Wörgetterc M. *Worldwide Review on Biodiesel Production*. **1-121**, (2003)
13. Avinash, A., Subramaniam, D. & Murugesan, A. *Biodiesel - A global scenario*. Renew. Sustain. Energy Rev. **29**, 517–527 (2014).
14. R. Sitepu, L., A. Garay, L., Ryan Sestric, L., Levin, D., E. Block, D., Bruce German, Kyria J., Boundy-Mills, L. *Oleaginous yeasts for biodiesel : Current and future trends in biology and production*. Biotechnology Advances. **32**, 1336–1360 (2014).

15. Meng, X., Yang, J., Xua, X., Zhanga, L., Nie, Q., Xian, M. *Biodiesel production from oleaginous microorganisms*. *Renewable Energy* **34**, 1–5 (2009).
16. European Union. EN 14214 - *Automotive fuels. Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines. Requirements and Test Methods*. (2003).
17. Koutinas, A. A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Kookos, I. K. *Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production*. *Fuel* **116**, 566–577 (2014).
18. Li, Q., Du, W. & Liu, D. *Perspectives of microbial oils for biodiesel production*. *Applied Microbiology Biotechnology*. **80**, 749–756 (2008).
19. Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P. & Villa, T. G. *Oily yeasts as oleaginous cell factories*. *Applied Microbiology Biotechnology* **90**, 1219–1227 (2011).
20. Rakicka, M., Lazar, Z., Dulermo, T., Fickers, P. & Nicaud, J. M. *Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions*. *Biotechnology Biofuels*, 1–10 (2015).
21. Wang, Q., Zhao, Z. K., Hua, Y. & Zhao, Z. K. *Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4*. *Microbiology Biotechnology* **37**, 581-585 (2010).
22. Tchakouteu, S. S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Kalantzi, O., Stoforos, N. G., Koutinas, A. A., Aggelis, G., Papanikolaou, S. **Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media : Adaptation dynamics and lipid production*. *Eng. Life Sci.* **00**, 1–12 (2016).
23. Béligon, V., Poughona, L., Christophea, G., Leberta, A., Larrochea, C., Fontanille P. *Validation of a predictive model for fed-batch and continuous lipids production processes from acetic acid using the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus**. *Biochem. Eng. J.* **111**, 117–128 (2016).
24. Jie Lin Lee, J., Chen, L., Shi, J., Trzcinski, A., Wei-Ning Chen. *Metabolomic Profiling of *Rhodospiridium toruloides* Grown on Glycerol for Carotenoid Production during Different Growth Phases*. *Agric. Food Chem.* **62 (41)**, 10203-10209 (2014).
25. Martins, V. M. *Development of *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 fed-batch cultures for simultaneous production of lipids and carotenoids*. (2015).
26. Bommarreddy, R. R., Sabra, W., Maheshwari, G. Zeng, A. *Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates*. *Microbial cell factories*, **14(36)**, 1–13 (2015).
27. Teles, M. S. V. *Production of carotenoids and biodiesel from the yeast *Rhodospiridium toruloides* – Optimization of the extraction process*. (2015).
28. Xu, J., Zhao, X., Du, W., Liu, D. *Bioconversion of glycerol into lipids by *Rhodospiridium toruloides* in a two-stage process and characterization of lipid properties*. *Eng. Life Sci.* **00** 1–11 (2016).
29. Mattanovich, D., Sauer, M., Gasser, B. *Yeast biotechnology : teaching the old dog new tricks*. *Microbial Cell Factories*, **13(34)** 1–5 (2014).

30. Leiva-Candia, D. E., Pinzi, S., Redel-Macías, M. D., Koutinas, A., Webb, C., Dorado, M. P. *The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel*. *Fuel* **123**, 33–42 (2014).
31. Huang, X., Liu, J., Lu, L., Peng, K., Yang, G., Liu, J. *Bioresource Technology Culture strategies for lipid production using acetic acid as sole carbon source by Rhodosporidium toruloides*. *Bioresour. Technol.* **206**, 141–149 (2016).
32. Araujo, G. S., Matos, L. J. B. L., Gonçalves, L. R. B., Fernandes, F. A. N., Farias, W. R. L. *Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains*. *Bioresour. Technol.* **102**, 5248–5250 (2011).
33. Leiva-Candia, D. E., Tsakona, S., Kopsahelis, N., García, I. L. et al. *Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products*. *Bioresour. Technol.* **190**, 57–65 (2015).
34. Sitepu, I. R., Sestric, R. I., Laura, L., David G. J., Bruce, Gillies, L. A., Luis A.G., Boundy-Mills, K. L. *Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species*. *Bioresour. Technol.* **144**, 360–369 (2013).
35. Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., Larroche, C. *Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* **114**, 443–449 (2012).
36. Li, Y., Liu, B., Zhao, Z., Bai, F. *Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by Rhodosporidium toruloides*. *Chin. J. Biotechnol.* **22**, 650–656 (2006).
37. Li, Y., Kent, Z., Bai, F. *High-density cultivation of oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides Y4 in fed-batch culture*. *Enzyme and Microbial Technology* **41**, 312–317 (2007).
38. Zhou, Y. J., Buijs, N. A., Zhu, Z., Qin, J., Siewers, V., Nielsen, J. *Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories*. *Nat. Commun.* **7**, 1–9 (2016).
39. Wiebe, M. G., Koivuranta, K., Penttilä, M., Ruohonen, L. *Lipid production in batch and fed-batch cultures of Rhodosporidium toruloides from 5 and 6 carbon carbohydrates*. *BMC Biotechnology*, **12(26)**, 1-10 (2012).
40. Freitas, C., Parreira, T. M., Roseiro, J., Reis, A., Lopes, T. *Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast Rhodosporidium toruloides NCYC 921 using flow cytometry*. *Bioresource Technology* **158**, 355–359 (2014).
41. Yong-hong L. I., Bo L. I. U., Zong-bao Z., Feng-wu B. A. I. *Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by Rhodosporidium toruloides*. *Chin J Biotech* **22(4)**, 650-656 (2006).
42. Zhu Z., Zhang S., Liu H., Shen H., Lin X., Yang F., Zhou Y. J., Jin G., Ye M., Zou, H., Zhao Z.K. *A multi-omic map of the lipid-producing yeast Rhodosporidium toruloides*. *Nat. Commun.* **3**, 1111–1112 (2013).
43. Kumar S., Kushwaha H., Bachhawat A. K., Raghava G. P. S., Ganesan K. *Genome sequence of the oleaginous red yeast Rhodosporidium toruloides MTCC 457*. *Eukaryot. Cell* **11**,

1083–1084 (2012).

44. Singh G., Jawed A., Paul D., Bandyopadhyay K. K., Kumari A., Haque S. *Concomitant production of lipids and carotenoids in Rhodosporidium toruloides under osmotic stress using response surface methodology*. *Front. Microbiol.* **7**, 1–13 (2016).
45. Xu J., Zhao X., Wang W., Du W., Liu D. *Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides and the individual effect of some impurities on lipid production*. *Biochem. Eng. J.* **65**, 30–36 (2012).
46. Ratledge, C. *Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production*. *Biochimie* **86**, 807–815 (2004).
47. Ratledge, C. *Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms*. *Biochemical Society Transactions* **30**, 47–50 (2002).
48. Akpınar-Bayazit, A. *Fungal Lipids : The Biochemistry of Lipid Accumulation*. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* **5**, 409-414 (2014).
49. Zhou, Y. J., Buijs, N. A., Siewers, V., Nielsen, J. *Fatty acid-derived biofuels and chemicals production in Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2**, 1–6 (2014).
50. Christophe, G., Kumar, V., Nouaille, R., Gaudet, G., Pandey, A., Soccol, C. R. Larroche, C. *Recent Developments in Microbial Oils Production : a Possible Alternative to Vegetable Oils for Biodiesel Without Competition with Human Food ?* *Braz. Arch. Biol. Technol.* **55**, 29–46 (2012).
51. Beopoulos, A., Nicaud, J., Gaillardin, C. *An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**, 1193–1206 (2011).
52. Wakil, S. J. *Fatty Acid Synthase, A Proficient Multifunctional Enzyme*. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 1689–1699 (2013).
53. Sorger, D., Daum, G. *Triacylglycerol biosynthesis in yeast*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 289–299 (2003).
54. Tai, M. *Metabolic Engineering of Oleaginous Yeast for the Production of Biofuels*. (2012).
55. Dias, C., Silva, C., Freitas, C., Reis, A., Lopes, T. *Effect of Medium pH on Rhodosporidium toruloides NCYC 921 Carotenoid and Lipid Production Evaluated by Flow Cytometry*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 776–787 (2016).
56. Kraisintu, P., Yongmanitchai, W., Limtong, S. *Selection and Optimization for Lipid Production of a Newly Isolated Oleaginous Yeast , Rhodosporidium toruloides DMKU3-TK16*. *Nat. Sci.* **44**, 436–445 (2010).
57. Chang, Y., Chang, K., Hsu, C., Chuang, L., Chen, C., Huang, F. *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* **105**, 711–717 (2013).
58. Spier, F., Buffon, J. G., Burkert, C. A. V. *Bioconversion of Raw Glycerol Generated from the Synthesis of Biodiesel by Different Oleaginous Yeasts : Lipid Content and Fatty Acid Profile*

- of Biomass. Indian J. Microbiol. **55**, 440–446 (2015).
59. Huang, C. Wu, H., Liu, Z., Cai, J., Lou, W., Zong, M. *Effect of organic acids on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast Trichosporon fermentans*. Biotechnology for Biofuels **5(4)**, 1–12 (2012).
60. Gong, Z., Shen, H., Yang, X., Wang, Q., Xie, H., Zhao, Z. K. *Lipid production from corn stover by the oleaginous yeast Cryptococcus curvatus*. Biotechnology for Biofuels **7(158)**, 1–9 (2014).
61. Reis, A., Lopes, T. *Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast Rhodosporidium toruloides NCYC 921 using flow cytometry*. Bioresource technology **158**, 355–359 (2016).
62. Christophe, G., Deo, J. L., Kumar, V., Nouaille, R. *Production of Oils from Acetic Acid by the Oleaginous Yeast Cryptococcus curvatus*. Appl Biochem Biotechnol, 1270–1279 (2012).
63. Patel, A., Arora, N., Sartaj, K., Pruthi, V., Pruthi, P. A. *Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses*. Renew. Sustain. Energy Rev. **62**, 836–855 (2016).
64. Tavares, L. C., Emi, M., Peinado, M. *Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by Saccharomyces cerevisiae in batch and fed- batch cultures*. Microbiol Biotechnol, 789–797 (2012).
65. Manso, T., Nunes, C., Raposo, Lima-Costa, M. *Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent P. agglomerans PBC-1*. Microbiol Biotechnol, 1145–1155 (2010).
66. Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., Eppink, M. H. M. *Biorefinery of microalgae for food and fuel*. Bioresour. Technol. **135**, 142–149 (2013).
67. Jin, M., J. Slininger, P., S. Dien B., Waghmode, S., R. Moser, B. Orjuela, A., da Costa Sousa, L., Balan, V. *Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: Feasibility and challenges*. Trends Biotechnol. **33**, 43–54 (2015).
68. Yen, H. W. *et al. Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products*. Bioresour. Technol. **135**, 166–174 (2013).
69. Lee, J. J. L. & Chen, W. W. N. *Regulation and Extraction of Carotenoids from Rhodosporidium toruloides*. Journal of Molecular and Genetic The Production **10**, 14–16 (2016).
70. Isabel, L., Martins, T. *Estratégias para o aumento do rendimento em biomassa e lípidos na levedura Rhodosporidium toruloides* (2015).
71. Frengova, G. I., Beshkova, D. M. *Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: Yeasts of biotechnological importance*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **36**, 163–180 (2009).
72. González-Delgado, Á. D. & Kafarov, V. *Microalgae based biorefinery: evaluation of oil extraction methods in terms of efficiency, costs, toxicity and energy in lab-scale*. Rev. ION **26**, 27–39 (2013).
73. Almeida, J. R. M., Fávaro, L. C. L. & Quirino, B. F. *Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste*. Biotechnol. Biofuels **5**, 48 (2012).

74. Braunwald, T., Schwemmlin, L., Graeff-Hönninger S., Todd French, W., Hernandez, R., E. Holmes, W., Claupein, M. *Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by Rhodotorula glutinis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **97**, 6581–6588 (2013).
75. Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., Bourtoom, T. *Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast Rhodotorula glutinis cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production*. Biotechnol. Bioprocess Eng. **16**, 23–33 (2011).
76. Guerreiro, F. *Influência da transferência de massa de oxigênio na acumulação de lípidos pela levedura Rhodosporidium toruloides*. (2013).
77. Zheng, Y., Chi, Z., Ahring, B. K., Chen, S. *Oleaginous yeast Cryptococcus curvatus for biofuel production: Ammonia's effect*. Biomass and Bioenergy **37**, 114–121 (2012).
78. Kimura, K., Yamaoka, M. & Kamisaka, Y. *Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence*. J. Microbiol. Methods **56**, 331–338 (2004).
79. Ebiura, T., Echizen, T., Ishikawa, A., Murai, K., Baba, T. *Selective transesterification of triolein with methanol to methyl oleate and glycerol using alumina loaded with alkali metal salt as a solid-base catalyst*. Applied catalysis **283**, 111–116 (2005).
80. Weatherburn, M. W. *Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia*. Anal. Chem. **39**, 971–974 (1967).
81. Lees, M., Sloane, G. H. *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J Biol Chem. **226(1)**, 497-509 (1953).
82. Isengard, M. H. H. *Determination of underivatated fatty acids by HPLC*. Springer-Verlag **204**, 420–424 (1997).
83. Buzzini, P., Martini, A., Gaetani, M., Turchetti, B., Pagnoni, U. M., Davoli, P. *Optimization of carotenoid production by Rhodotorula graminis DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis*. Enzyme Microb. Technol. **36**, 687–692 (2005).
84. Couso, I., Vila, M., Vígara, J., Cordero, B. F., Vargas, María Á., Rodríguez, H., León, R. *Synthesis of carotenoids and regulation of the carotenoid biosynthesis pathway in response to high light stress in the unicellular microalga Chlamydomonas reinhardtii*. Eur. J. Phycol. **47**, 223–232 (2012).
85. Shen, H., Zhang, X., Gong, Z., Wang, Y., Yu, X. Y., Xiaobing, Z., Zongbao K. *Compositional profiles of Rhodosporidium toruloides cells under nutrient limitation*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **101**, 3801–3809 (2017).
86. Knothe, G. *Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters*. Fuel Process. Technol. **86**, 1059–1070 (2005).
87. Gao, Z., Ma, Y., Wang, Q., Zhang, M., Wang, J., Liu, Y. *Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by Rhodosporidium toruloides yeast 32489*. Bioresour. Technol. **218**, 373–379 (2016).
88. Abou-Shanab, R. A. I. *et al. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake*. Biomass and Bioenergy **35**, 3079–3085

(2011).

89. Ma, F., Hanna, M. A. *Biodiesel production: A review*. *Bioresour. Technol.* **70**, 1–15 (1999).
90. Ayaz, F. A. *et al.* *Nutrient content of carob pod (Ceratonia siliqua L.) flour prepared commercially and domestically*. *Plant Foods Hum. Nutr.* **64**, 286–292 (2009).
91. Divya, V., Tyag, B. *Biodiesel: Source, Production, Composition, Properties and Its Benefits*. *J. Oleo Sci.* **55**, 487–502 (2006).
92. Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L., Pérez, Á. *Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties*. *Bioresour. Technol.* **100**, 261–268 (2009).
93. Knothe, G., Matheaus, A. C., Ryan, T. W. *Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester*. *Fuel* **82**, 971–975 (2003).
94. Duarte, S. H., Maugeri, F. *Prediction of Quality Properties for Biodiesel Production by Oleaginous Yeast Cultivated in Pure and Raw Glycerol*. *Chemical Engineering Transactions* **37**, 463–468 (2014).
95. Aksu, Z., Eren, A. T. *Production of carotenoids by the isolated yeast of Rhodotorula glutinis*. *Biochem. Eng. J.* **35**, 107–113 (2007).
96. Buzzini, P., Martini, A. *Production of carotenoids by strains of Rhodotorula glutinis cultured in raw materials of agro-industrial origin*. *Bioresour. Technol.* **71**, 41–44 (2000).
97. Tchakouteu, S. S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Kalantzi, O., Stoforos, N. G., Koutinas, A. A., Aggelis, G. and Papanikolaou, S. *Rhodosporidium toruloides cultivated in NaCl-enriched glucose-based media : adaptation dynamics and lipid production*. *Eng. Life Sci.* **00**, 1–12 (2016).