

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANA MARIA DE OLIVEIRA FINCO**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIOLIPÍDEOS  
PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS FUNCIONAIS**

**CURITIBA**

**2015**

ANA MARIA DE OLIVEIRA FINCO

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIOLIPÍDEOS  
PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS FUNCIONAIS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos, no curso de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho

CURITIBA

2015

---

F493d

Finco, Ana Maria de Oliveira

Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biolipídeos para a indústria de alimentos funcionais/ Ana Maria de Oliveira Finco. – Curitiba, 2015.

114 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2015.

Orientador: Carlos Ricardo Soccol – Co-orientador: Júlio Cesar de Carvalho.

Bibliografia: p. 103-114.

1. Heterokontophyta. 2. Fermentação. 3. Ômega 3. 4. Ácidos carboxílicos.  
I. Universidade Federal do Paraná. II. Soccol, Carlos Ricardo. III. Carvalho, Júlio Cesar de. IV. Título.

CDD: 613.284

---

**ANA MARIA DE OLIVEIRA FINCO**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE  
BIOLIPÍDEOS PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS  
FUNCIONAIS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:



Prof. Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL  
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI  
Setor de Tecnologia, UFPR



Dr.<sup>a</sup> CRISTINE RODRIGUES  
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 27 de março de 2015.

Dedico este trabalho a vocês que me inspiram com suas atitudes, caráter e bondade, que me encorajam e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, que são minhas referências, meus melhores amigos, enfim os melhores pais do mundo, com todo meu amor e gratidão, Marival e Agda.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida e por me proporcionar mais uma grande conquista.

À toda minha família, em especial aos meus pais e minhas irmãs Mariana e Luciana, pelo amor incondicional, pelas orações, pelo incentivo e apoio emocional.

Ao João Vitor, por seu amor, carinho, dedicação, paciência e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade, por ser o mentor do projeto, por permitir meus avanços na vida profissional acadêmica e, também, pela dedicação, orientação e amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho, pela orientação e participação de todas as etapas de elaboração desta pesquisa, por sua dedicação, conselhos, compreensão e amizade.

Aos grandes amigos, Luis Daniel Goyzueta Mamani, Amanda Roman Guedes, Keli Sobral, Paulo César Kirnev, Fernanda Farinazzo e Rui Alexandre Faria, pela ajuda na realização do trabalho, pelos momentos de descontração e pela força e companhia que só amigos podem proporcionar.

Aos meus amigos e colegas, Alejandra Cruz, Joana Rizzolo, Denise Salmon, Guilherme Moraes, Cristine Rodrigues, Maria Rosa Prado, Márcio Vasconcelos, Fernanda Fiorda, Mitiyo Miyaoka, Francieli Goelzer, Ricardo Fendrich, Suzan Rossi, David Coral, Gilberto Melo e Ivo Borghetti pela ajuda, descontração e apoio em todos os momentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Alimentos e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pelos conhecimentos transmitidos e por terem ajudado em alguns dos meus pequenos avanços na vida profissional acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal do Paraná, por dar provimento ao desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas, que de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação se tornasse realidade, o meu agradecimento.

## RESUMO

Nos últimos anos, os ácidos graxos da família ômega 3 (por exemplo, o ácido docosahexaenóico DHA) tem emergido como um importante promotor da saúde humana, sendo essencial para o desenvolvimento funcional do cérebro e da retina, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer. O mercado global no que diz respeito à produção de ácidos graxos ômega-3, particularmente DHA, teve uma grande expansão na última década, devido ao aumento do uso desta substância como alimento e como um importante componente da fórmula alimentar infantil complementar. As principais fontes de DHA são óleos de peixe. No entanto, a produção deste composto por meio de matéria-prima animal está causando redução ou mesmo a extinção de várias espécies de peixes e têm consumido recursos cada vez mais escassos. Além desse impacto ambiental, a produção de óleo de origem animal não sustentará a demanda, requerendo aumentar significativamente os níveis de predação. Por conseguinte, observa-se a importância da pesquisa de fontes alternativas para a produção de ômega-3. A investigação recente foi dirigida para uma fonte mais sustentável, como é o caso das fontes microbianas. O objetivo global deste projeto de pesquisa foi investigar e otimizar condições de fermentação para o processo de produção de ácido graxo ômega -3/DHA (ácido docosahexaenóico) por fermentação submersa utilizando microrganismo *Schizochytrium limacinum sr 21*. O microrganismo selecionado foi submetido a uma investigação das melhores condições de cultivo e aos melhores concentrações de nutrientes. Após a otimização do meio cultivo, definiu-se um meio barato e efetivo composto de 110 g/L de glicerol, 8,4 g/L de nitrato de sódio e 28 g/L de sal marinho, que produziu 28,54 g/L de biomassa e 14,30 g/L de lipídeos em 120 horas de fermentação. A produção do microrganismo foi escalonada para fermentador tipo STR em batelada e, atingiu níveis satisfatórios de produtividade com 6,72 g/L/dia de biomassa, 3,36 g/L/dia de lipídeos e 1,28 g/L/dia de DHA.

Palavras-chave: *Schizochytrium*; fermentação submersa, ômega-3, ácido docosahexaenóico.

## ABSTRACT

In recent years omega-3 fatty acids such as docosahexaenoic acid (DHA) have emerged as an important promoters of human health, being essential for the functional development of the brain and retina, reducing the risk of cardiovascular disease and Alzheimer's disease. The global market for omega-3, particularly DHA, has had a large expansion in the last decade due to the increasing use of this substance as a food and as an important component of infant formula food supplements. The main sources of DHA are fish oils. However, production of this compound from animal raw material is causing the reduction or even extinction of several species of fish, making this resource increasingly scarce. Besides the environmental impact of this practice, the demand for fish oils is not sustainable, causing a rise in predation levels,. Therefore, it is essential to find alternative sources for the production of omega 3. Recent research has been directed to more sustainable sources, as is the case of microbial sources. The overall objective of this research project was to investigate and optimize fermentation conditions for the production of Omega -3 / DHA (docosahexaenoic acid) by submerged fermentation using the microorganism *Schizochytrium limacinum sr. 21*. The selected microorganism was subjected to an investigation of the best growing conditions and the best nutrient concentrations. After optimization of the culture medium, a cheap and effective formulation was defined, consisting of 110 g/L glycerol, 8.4 g/L sodium nitrate and 28 g/L sea salt, that produced 28.54 g/L of biomass and 14.30 g/L of lipids in 120 hours of fermentation. The production of the microorganism was scaled up to a STR batch fermentor , where satisfactory levels of productivity of 6.72 g/L/day biomass, 3.36 g/L/day lipids and 1.28 g/L/day of DHA were reached.

Keywords: Schizochytrium; submerged fermentation, omega 3, docasahexaenoic acid.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 SUGESTÕES DE DOSES DIÁRIAS DE ÔMEGA-3 (EPA + DHA) POR PAÍSES .....	23
FIGURA 2 USO GLOBAL DE ÓLEO DE PEIXE .....	24
FIGURA 3 PRODUÇÕES MUNDIAIS: CAPTURA VERSUS PISCICULTURA .....	25
FIGURA 4 UTILIZAÇÃO E ABASTECIMENTO MUNDIAL DE PEIXE .....	26
FIGURA 5 DISTRIBUIÇÃO DE MERCADO DE OMEGA 3.....	27
FIGURA 6 BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS - VIA AERÓBICA CONVENCIONAL, ÁCIDO GRAXO SINTASE.....	29
FIGURA 7 COMPLEXO AERÓBICO DE DESSATURAÇÃO .....	30
FIGURA 8 SÍNTESE DE DHA EM SCHIZOCHYTRIUM SP. PELA VIA PKS.....	31
FIGURA 9 DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DE EMPRESAS PRIVADAS QUE PRODUZEM DHA.....	34
FIGURA 10 CÉLULAS DE <i>SCHIZOCHYTRIUM</i> COM SEUS CORPOS LIPÍDICOS	43
FIGURA 11 ESTÁGIOS MORFOLÓGICOS DO MICROORGANISMO ESTUDADO - MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO, AUMENTO DE 400 A 2000K (BARRA DE TAMANHO COM 1 $\mu$ M).....	44
FIGURA 12 PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE DHA POR SCHIZOCHYTRIUM SP. ....	49
FIGURA 13 PATENTES VS ARTIGOS NO PERÍODO 2005-2014 .....	50
FIGURA 14 SCHIZOCHYTRIUM LIMACINUM SR 21 - MYA 1381 EM MEIO SÓLIDO .....	51
FIGURA 15 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO <i>SCHIZOCHITRIUM LIMACINUM LIMACINUM SR 21</i> .....	61
FIGURA 16 ESTUDO DA TAXA DE NOCULAÇÃO EM FERMENTADORES COM AGITAÇÃO.....	64
FIGURA 17 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS FONTES DE CARBONO.....	67
FIGURA 18 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS FONTES DE NITROGÊNIO .....	67
FIGURA 19 AVALIAÇÃO DA RAZÃO C/N ELEMENTAR .....	69
FIGURA 20 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL MARINHO.....	70
FIGURA 21 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA.....	71
FIGURA 22 AVALIAÇÃO DE PH.....	72

FIGURA 23 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 1. ....	75
FIGURA 24 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (GLICEROL E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	75
FIGURA 25 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (GLICEROL E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	76
FIGURA 26 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (SAL MARINHO E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL GLICEROL MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	76
FIGURA 27 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 1. ....	78
FIGURA 28 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (GLICEROL E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	79
FIGURA 29 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (GLICEROL E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	79
FIGURA 30 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (SAL MARINHO E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL GLICEROL MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	80
FIGURA 31 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 2. ....	83
FIGURA 32 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (GLICOSE/GALACTOSE E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	83
FIGURA 33 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (GLICOSE/GALACTOSE E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	84
FIGURA 34 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (NITRATO DE SÓDIO E SAL MARINHO) VARIÁVEL GLICOSE/GALACTOSE MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	84

FIGURA 35 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 2 .....	86
FIGURA 36 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (GLICOSE/GALACTOSE E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0.....	87
FIGURA 37 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (GLICOSE/GALACTOSE E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	87
FIGURA 38 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (NITRATO DE SÓDIO E SAL MARINHO) VARIÁVEL GLICOSE/GALACTOSE MANTIDA NO NÍVEL 0.....	88
FIGURA 39 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 3 .....	91
FIGURA 40 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (FRUTOSE E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0.....	91
FIGURA 41 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (FRUTOSE E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	92
FIGURA 42 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (NITRATO DE SÓDIO E SAL MARINHO) VARIÁVEL FRUTOSE MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	92
FIGURA 43 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 3. ....	94
FIGURA 44 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (FRUTOSE E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0.....	95
FIGURA 45 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (FRUTOSE E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	95
FIGURA 46 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (NITRATO DE SÓDIO E SAL MARINHO) VARIÁVEL FRUTOSE MANTIDA NO NÍVEL 0. ....	96
FIGURA 47 FERMENTAÇÃO DE S. LIMACINUM EM BIORREATOR STR.....	99

FIGURA 48 CINÉTICA DE SCHIZOCHYTRIUM LIMACINUM SR 21 EM BIORREATOR STR .....	100
---	-----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 DEMANDA ANUAL DE DHA COM BASE NA RECOMENDAÇÃO DE CONSUMO.....	35
TABELA 2 TEOR DE ÓLEO DE ALGUNS MICRORGANISMOS .....	38
TABELA 3 SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO PARA A PRODUÇÃO DE SCOs.....	40
TABELA 4 TRAUSTOQUITRÍDEOS ISOLADOS A PARTIR DE DIFERENTES AMBIENTES E SEU RESPECTIVO TEOR DE DHA (% DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS) .....	46
TABELA 5 PLANEJAMENTO PARA AVALIAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO E DAS FONTES DE NITROGÊNIO.....	53
TABELA 6 PLANEJAMENTO PARA AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FONTES DE CARBONO E DAS FONTES DE NITROGÊNIO – VALORES DE PROPORÇÃO C/N.....	54
TABELA 7 MATRIZ DE DADOS CODIFICADOS DO PLANEJAMENTO DCCR .....	57
TABELA 8 NÍVEIS AVALIADOS NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) – MEIOS 1,2 E 3.....	57
TABELA 9 COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO .....	62
TABELA 10 AVALIAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO .....	66
TABELA 11 AVALIAÇÃO DA RAZÃO C/N.....	69
TABELA 12 RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE LIPÍDEOS DO PLANEJAMENTO DCCR MEIO 1 - GLICEROL + NITRATO DE SÓDIO.....	73
TABELA 13 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 1 - GLICEROL + NITRATO DE SÓDIO (BIOMASSA) .....	74
TABELA 14 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 1 - GLICEROL + NITRATO DE SÓDIO (LIPÍDEOS) .....	77
TABELA 15 RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE LIPÍDEOS DO PLANEJAMENTO DCCR MEIO 2 - GLICOSE/GALACTOSE + NITRATO DE SÓDIO .....	81
TABELA 16 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 2 - GLICOSE/GALACTOSE + NITRATO DE SÓDIO (BIOMASSA)....	82
TABELA 17 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 2 - GLICOSE/GALACTOSE + NITRATO DE SÓDIO (LIPÍDEOS).....	85

TABELA 18 RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE LIPÍDEOS DO PLANEJAMENTO DCCR MEIO 3 - FRUTOSE + NITRATO DE SÓDIO.....	89
TABELA 19 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 3 - FRUTOSE + NITRATO DE SÓDIO (BIOMASSA) .....	90
TABELA 20 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 3 - FRUTOSE + NITRATO DE SÓDIO (LIPÍDEOS) .....	93
TABELA 21 VALIDAÇÃO DO DCCR .....	97
TABELA 22 GANHOS DE PRODUTIVIDADE.....	98
TABELA 23 FERMENTAÇÕES EM BATELADA EM BIORREATOR STR.....	99
TABELA 24 CUSTOS DO MEIO DE CULTIVO.....	101

**ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIações**

AA	Ácido Araquidônico
AGPI	Ácidos Graxos Poli-Insaturados
ALA	Ácido A-Linolênico
DHA	Ácido Docosaheptaenóico
DNS	Ácido 3,5- Dinitrosalicílico
DPA	Ácido Docosapentaenoico
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
FAO	<i>Food And Agriculture Organization Of The United Nations</i>
FAS	Ácido Graxo Sintase
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
FUFOSE	<i>The European Commission Concerted Action On Functional Food Science In Europe</i>
GC	Cromatografia Gasosa
GRAS	Geralmente Reconhecido Como Seguro
IUPAC	International Union Of Pure And Applied Chemistry
LA	Ácido Linoléico
n-3	Ômega-3
n-6	Ômega-6
PKS	Policetídeo Sintase
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
SCO	<i>Single Cell Oil</i>
TFA	<i>Total Fatty Acids</i>

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Objetivos .....	19
1.1.1 Objetivo Geral .....	19
1.1.2 Objetivos Específicos .....	19
1.2 Justificativa .....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Lipídeos na dieta humana .....	21
2.2 Necessidade de fontes alternativas de ômega-3.....	23
2.3 As fontes alternativas de PUFAs .....	28
2.4 <i>Single Cell Oil</i> potencial industrial .....	32
2.5 A produção de lipídeos por meio de microrganismos unicelulares.....	36
2.6 O microrganismo <i>Schizochytrium limacinum sr 21</i> .....	42
3 METODOLOGIA.....	51
3.1 MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	51
3.1.1 Comparação de meios de cultivos .....	52
3.1.2 Avaliação das fontes de carbono e nitrogênio.....	52
3.1.3 Avaliação da proporção carbono/nitrogênio .....	53
3.1.4 Avaliação da concentração de sal marinho .....	54
3.2 Estudo da taxa de inoculação .....	55
3.3 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO .....	55
3.4 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA <i>Schizochytrium limacinum sr 21</i> ..	56
3.5 ESTUDO DA PRODUTIVIDADE EM BIORREATOR .....	58
3.6 AVALIAÇÃO ECONÔMICA .....	58
3.7 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	58
3.7.1 Biomassa seca .....	58
3.7.2 Determinação do açúcar residual.....	58
3.7.3 Determinação do glicerol residual .....	59
3.7.4 Determinação do teor de lipídios.....	59

3.7.5 Caracterização dos ácidos graxos .....	59
3.8 Análises estatísticas .....	60
4 RESULTADOS .....	61
4.1 Avaliações das condições de cultivo do <i>Schizochitrium limacinum sr 21</i> .....	61
4.1.1 Curva de crescimento do inóculo .....	61
4.1.2 Estudo dos meios de cultivo .....	62
4.1.3 Estudo da taxa de inoculação .....	63
4.1.4 Estudo das fontes de carbono e nitrogênio .....	65
4.1.5 Estudo da proporção carbono/nitrogênio .....	68
4.1.6 Estudo da concentração de sal marinho. ....	70
4.2 Estudo dos parâmetros de fermentação.....	71
4.2.1 Estudo da temperatura.....	71
4.2.2 Estudo do pH .....	72
4.3 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA <i>Schizochitrium limacinum Sr 21</i> ..	72
4.4 Validação do modelo da otimização do meio de cultivo .....	97
4.5 Produção De <i>Schizochitrium Limacinum Sr 21</i> Em Batelada Em Biorreator Do Tipo STR .....	98
4.6 CINÉTICA DA PRODUÇÃO EM BIORREATOR .....	100
4.7 AVALIAÇÃO ECONÔMICA .....	101
5 Conclusões.....	102
6 Sugestões para trabalhos futuros.....	103
Referências Bibliográficas .....	104

## INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, a atividade de extração de óleos provenientes de microrganismos unicelulares tem ganhado notoriedade no cenário acadêmico (CHRISTOPHE et al., 2012). As aplicações são inúmeras, mas a que gera maior impacto e, por conseguinte, maior demanda, é aquela relacionada à indústria de alimentos (LIU *et al.*, 2014). Isso porque os óleos são ingredientes indispensáveis à produção de alimentos nutracêuticos e funcionais, os quais têm expandido os horizontes de consumo de indivíduos cada vez mais ávidos por uma alimentação balanceada e rica em compostos bioativos.

Dessa maneira, quando se pensa no contexto mundial, o consumo de alimentos funcionais vem crescendo, uma vez que o desenvolvimento da ciência e tecnologia no campo da biotecnologia aplicada à indústria alimentícia traz consigo a reconceitualização da maneira de se pensar o consumo de alimentos funcionais. Isso acontece pois, além de tornar acessíveis tais produtos a uma maior quantidade de indivíduos, há também as vantagens fisiológicas do consumo diário de alimentos com propriedades bioativas (GUL; SINGH; JABEEN, 2015).

Os ácidos graxos da família ômega-3 estão em destaque entre esses alimentos/suplementos, prova disso é que seu consumo tem aumentado anualmente (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Entretanto, apesar de haver aumento considerável no consumo deste tipo de produto, há, ao mesmo tempo, déficit na produção mundial de óleos provenientes de peixes, principal fonte deste insumo até o momento (SALEM; EGGERSDORFER, 2015).

Esse cenário tem ocorrido por conta da disponibilidade limitada de pesca pelágica e, naturalmente, a diferença na balança de “produção vs consumo” de óleos nutracêuticos, sinalizada anteriormente. Essa diferença tem sido acentuada, por exemplo, pelo aumento da utilização de ácidos graxos ômega-3 em mercados emergentes, como o Brasil (CHAUTON et al., 2015). É necessário, portanto, pesquisar-se alternativas à produção de óleos funcionais, uma vez que apenas a manufatura dependente de matéria prima animal não tem alcançado níveis de produção correspondentes à atual demanda.

Nesse sentido, sabe-se que a oferta mundial de óleo de peixe está estabilizada em cerca de um milhão de toneladas métricas por ano (IFFO, 2013).

Cerca de 70% do óleo de peixe disponível é usado para alimentação de peixes e produção de salmonídeos (IFFO, 2013). Isso quer dizer que, apenas uma pequena parcela é destinada à produção de alimentos funcionais para humanos, fato este que justifica e potencializa o cenário deficitário já apontado.

Naturalmente, as pesquisas científicas devem dar suporte de conhecimento e tecnologia para que sejam viabilizadas novas maneiras de se alcançar o objetivo de suprir a demanda por este produto. Assim sendo, diversas foram as tentativas que buscaram fontes alternativas àquela animal (CHRISTOPHE et al., 2012). De certo modo, por conta da grande disponibilidade e fácil manuseio, seres unicelulares têm sido utilizados de forma eficaz para a produção de óleos como o ácido graxo ômega-3 (GARAY; BOUNDY-MILLS; GERMAN, 2014).

Huang et al. (2013), fundamentados em Ratledge (1997), explicitam que, tradicionalmente, microrganismos que podem acumular lipídios em uma quantidade superior a 20% de seu peso seco são considerados microrganismos oleaginosos. Mas, ainda segundo Huang *et al.* (2013), conhecer os microrganismos oleaginosos, bem como os processos de acumulação de lipídios, não é mais interesse de primeira ordem. Segundo declaram que, atenção especial deve ser dada ao meio de cultivo ao qual são estabelecidos tais microrganismos, assim como, processos otimizados para extrair-se o conteúdo lipídico destes.

Por exemplo, na família dos *Traustochytrídeos* encontram-se protistas marinhos oleaginosos residentes nos mangues e ambientes estuarinos. Estes indivíduos têm capacidade de acumular grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA). Além disso, pesquisas recentes indicaram o promissor potencial destes microrganismos como fontes produtoras de óleo com ômega-3, um ácido graxo poli-insaturado DHA (acrônimo de ácido docosahexaenóico) (GUPTA; BARROW; PURI, 2012).

Frente a esse cenário e procurando-se alinhar o propósito à essa vertente de grande potencial econômico, desenvolveu-se a presente pesquisa: existe um método de produção e um método de extração de ácido graxo ômega-3 do microrganismo unicelular *Schizochytrium limacinum* SR21 suficientemente eficaz economicamente para que seja fonte de insumos para a indústria de alimentos? Por conseguinte, a hipótese levantada é apontada pela seguinte sentença: Se há um meio de cultivo suficientemente compatível com as necessidades de produção do microrganismo unicelular *Schizochytrium limacinum* SR21, tal que seja viável a formulação de um

meio rico em nutrientes, então o desenvolvimento deste microrganismo alcançará níveis satisfatórios, com população aceitável à extração de DHA.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo global deste projeto de pesquisa foi investigar e otimizar condições de fermentação para o processo de produção de um ácido graxo Ômega-3 / DHA (ácido docosahexaenóico) por fermentação submersa utilizando microrganismo *Schizochytrium limacinum sr 21*.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos desta proposta de investigação têm-se os seguintes itens:

1. Otimizar as condições de cultivo de *Schizochytrium limacinum SR21* para produção de biomassa e lipídeos;
2. Otimizar os parâmetros de fermentação submersa de *Schizochytrium limacinum SR21* para produção de biomassa e lipídeos;
3. Avaliar a cinética de produção de biomassa e lipídeos em biorreator do tipo tanque agitado (STR), nas condições otimizadas para operação em batelada;
4. Avaliar a produção de DHA em biorreator escala de bancada.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Para justificar a proposição deste trabalho tem-se três dimensões que são aplicáveis e/ou replicáveis ao projeto aqui citado. A primeira delas se dá na dimensão científica, na qual tem-se a inovação tecnológica alcançada pela otimização de um processo industrial, oneroso, com forte apelo econômico e pouco trabalhado na literatura científica. Tema recente nas discussões acadêmicas, o desenvolvimento de uma metodologia apropriada para a produção de DHA de fontes como aquela aqui

abordada, bem como, o estudo de um substrato ótimo ao crescimento de tais microrganismos, são pontos chave, por vezes apontados na literatura (GUPTA; BARROW; PURI, 2012; LI et al., 2015; PATIL; GOGATE, 2015), como escopo de necessidade em pesquisa.

A segunda é a dimensão social. Uma vez desenvolvido este projeto, é indubitável a contribuição para com o desenvolvimento social, uma vez que servirá de apoio àquelas iniciativas relativas à produção de alimentos funcionais. Ademais, o desenvolvimento da pesquisa científica brasileira na área de biotecnologia e alimentos contribui, sobremaneira, para com o crescimento das divisas e do poderio tecnológico da nação, bem como, promove melhorias nos campos de saúde pública, alimentação, agricultura, entre outros, os quais dependem das incursões científicas para progredirem.

Terceiro, devido a demanda crescente mundial por ômega-3, quer seja para nutrição humana quanto para piscicultura (ração para peixes) está provocando redução e até mesmo extinção de várias espécies de peixes. Sabe-se que a produção de DHA por meio de matéria-prima animal consome recursos naturais cada vez mais escassos e, também, espaço. Por exemplo, a pesca marinha extrativista tem causado declínio de algumas espécies de peixes, sendo que algumas sofrem com o risco da extinção (TACON; METIAN, 2015; TOCHER, 2015). Além dos riscos desta atividade, existe o fato da mesma não ter sustentado a demanda, necessitando aumentar cada vez mais os níveis de predação, portanto, é notória a importância de pesquisar-se fontes alternativas à produção de ômega-3, como no caso das fontes microbianas. Adicionalmente, é importante salientar que a quantidade extraída de DHA de peixes é extremamente inferior àquela extraída de microrganismos como o que aqui se propôs pesquisar, o que propiciará recuo da necessidade de grandes espaços, como os tanques de criação de peixes, acarretando menor impacto sobre o meio ambiente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LIPÍDEOS NA DIETA HUMANA

Nesta investigação, entende-se que o desenvolvimento de uma alimentação rica em componentes bioativos é, indubitavelmente, componente necessária a manutenção da boa saúde do corpo humano. Não longe, sabe-se que, nas últimas décadas, importância sobrejacente tem sido dada às mudanças nos hábitos alimentares de uma população cada vez mais adepta da utilização de produtos industrializados, porém, saudáveis (GUL; SINGH; JABEEN, 2015).

Corroborando com essas ideias, Dewapriya (2014) indica que existe, nos últimos anos, maior procura por alimentos que contenham ácidos graxos insaturados. Entretanto, é necessário diferenciá-los, pois, à medida que cresceu o consumo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) ômega-6, decresceu o consumo de ômega-3. Isso, pois, na ingestão natural desse tipo de ácidos graxos, é mais comum alimentar-se de precursores da síntese de ômega-6, do que a de ômega-3. De acordo com o Código de Austrália, a Food and Drug Administration (FDA) e Organização para a Alimentação e Agricultura / Organização Mundial da Saúde (FAO / OMS), essas substâncias devem coexistir no corpo humano de uma forma equilibrada (DECKELBAUM; TORREJON, 2012; DUNBAR; BOSIRE; DECKELBAUM, 2014)

A fim de avaliar a relação correta entre o consumo destes lipídeos, existe uma relação n-6/n-3, a qual deve ser cerca de 4/1. Nas últimas décadas, com o consumo excessivo de alimentos ricos em gorduras trans, a média n-6/n-3 foi extremamente elevada, como é apontado por (PATTERSON et al., 2012; SIMOPOULOS, 2008), respectivamente 15/1 em dietas ocidentais. Coincidindo com o aumento da proporção de n-6 para n-3 houve um aumento de doenças como as cardiovasculares, doenças neurodegenerativas ou mesmo, doenças inflamatórias e câncer (DUNBAR; BOSIRE; DECKELBAUM, 2014; PATTERSON et al., 2012)

Estudos recentes (BARROW; SHAHIDI, 2007; CALDER, 2013; DECKELBAUM; TORREJON, 2012; DUNBAR; BOSIRE; DECKELBAUM, 2014) têm mostrado grande progresso na compreensão do papel dos PUFAs para a manutenção e melhoria da nossa saúde e bem-estar, e têm demonstrado maior interesse das pessoas para consumir este tipo de alimento. Sabe-se que os ácidos graxos são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções

cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais, por não serem sintetizados pelo organismo (GOGUS; SMITH, 2010; INNIS, 2008).

Além disso, os PUFAs são utilizados para a síntese de moléculas bioativas com propriedades anti-inflamatórias e antiarrítmicas, sendo que muitos desses efeitos estão associados à manutenção da saúde cardiovascular (COTTIN; SANDERS; HALL, 2011; LEE et al., 2009; MARIK; VARON, 2009; MASSON et al., 2007). Alguns pesquisadores (BIRCH et al., 2007; INNIS, 2008; SINCLAIR & JAYASOORIYA, 2010) mostram uma melhoria no desenvolvimento visual de recém-nascidos e memória de adultos. Outras pesquisas (DANIEL et al., 2009; DIMRI et al., 2010; GLEISSMAN; JOHNSEN; KOGNER, 2010; JANAKIRAM; RAO, 2009; KIM, 2008; LIM et al., 2005) têm sugerido envolvimento de PUFAs na ativa amenização dos sintomas de doenças como o Alzheimer, distúrbios intestinais crônicos e alguns tipos de câncer.

Não há dúvida de que o consumo diário de alimentos com essas propriedades é muito benéfico para a saúde humana, de acordo com o que também é afirmado no documento publicado pela Organização Mundial da Saúde / Organização Mundial da Alimentação e Agricultura (FAO / WHO, 2008). No mesmo documento, fica estabelecido que o consumo adequado de PUFA deve ficar entre 6% e 11% do valor calórico total da dieta humana em adultos. Relativamente às quantidades de ômega-3 (DHA e EPA) estão em 0,5-2% do valor calórico total da dieta humana. A Organização Mundial de EPA e DHA ômega-3, recentemente compilou as recomendações de mais de 50 organizações (GOED, 2014), a Figura 1 apresenta alguns desses níveis.



FIGURA 1 SUGESTÕES DE DOSES DIÁRIAS DE ÔMEGA-3 (EPA + DHA) POR PAÍSES  
 FONTE: O AUTOR (2015)

Ao rever as recomendações das organizações globais em relação à dose diária de EPA / DHA, é importante destacar que, em muitas partes do mundo o consumo de ômega-3 é consideravelmente menor do que 500 mg/dia, apenas em países costeiros, como o Japão e alguns países da Escandinávia que possuem uma alimentação rica em organismos marinhos têm consumo mediano que são iguais ou maiores do que o nível recomendado (SALEM; EGGERSDORFER, 2015). É um fato que o ômega-3 estará presente cada vez mais na vida das pessoas, propiciando um aumento contínuo da demanda por alimentos que contêm esse nutriente.

## 2.2 NECESSIDADE DE FONTES ALTERNATIVAS DE ÔMEGA-3

Óleos ricos em DHA são agora ingredientes essenciais para a produção de uma série de produtos nutracêuticos e alimentos funcionais, e esta disponibilidade ampliou os horizontes de consumo dos indivíduos cada vez mais ávidos por uma dieta equilibrada, rica em compostos bioativos (SALEM; EGGERSDORFER, 2015; TOCHER, 2015; LIU et al, 2014 ).

A principal fonte de DHA são organismos marinhos, e de acordo com diversas organizações a ingestão diária recomendada implica em um alto consumo de frutos do mar (KITESSA et al., 2014). Neste contexto, alguns *danos* para a saúde humana têm sido associados ao consumo de organismos marinhos. Isso porque algumas espécies de peixes estão sujeitas à contaminação por poluentes ambientais, como as

dioxinas, metilmercúrio e bifenilos policlorados. Estes principalmente são poluentes hidrofóbicos e se acumulam ao longo da cadeia alimentar marinha, principalmente em corpos lipídicos. Além dos os riscos relacionados aos poluentes, os óleos de peixe podem apresentar características indesejáveis para o consumo humano, tais como odor típico, peroxidação lipídica, o que implica na perda de qualidade sensorial diminuindo a sua vida útil (TOCHER, 2015).

É importante notar que, até hoje, a principal fonte de DHA para alimentos funcionais é óleo de peixe. As aplicações de óleo de peixe incluem piscicultura, consumo humano e outras aplicações, como hidrogenação e usos industriais (Figura 2).

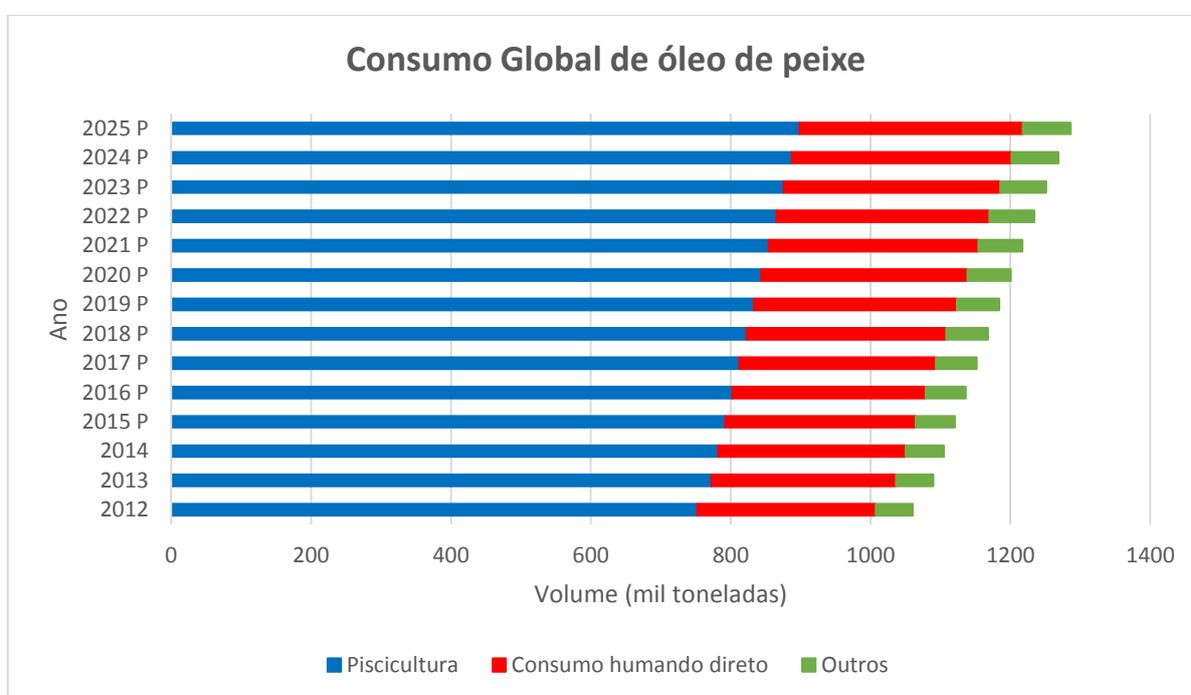
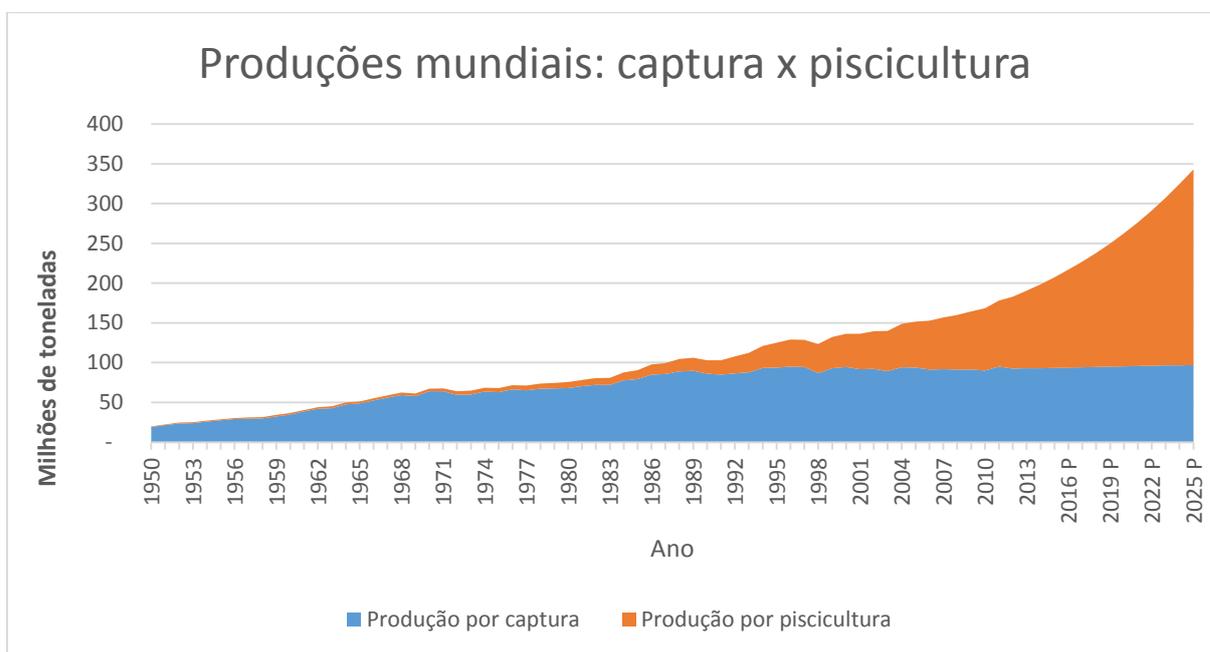


FIGURA 2 USO GLOBAL DE ÓLEO DE PEIXE  
 FONTE: O AUTOR (2015)

A piscicultura foi o segmento que mais consumiu óleo de peixe em 2014 e espera-se que este segmento continue a dominar o mercado no período de previsão (Figura 2). Apenas 24% desse óleo foi utilizado para consumo humano direto. A demanda de óleo de peixe em piscicultura era 772 mil toneladas em 2013 e deve chegar a 898 mil toneladas em 2025, crescendo a uma taxa média anual de 1,6% 2015-2025 (IFFO, 2013).

Neste contexto, é importante ressaltar que a demanda da piscicultura tem origem no metabolismo de ácidos graxos nos peixes, que para manter os níveis altos de ômega-3 necessita que a alimentação dos peixes em viveiro seja rica em DHA. (SALEM; EGGERSDORFER, 2015). Quanto à sustentabilidade da predação destinada a essa demanda, é importante evidenciar que a pesca extrativista está no seu limite, isso é mostrado na Figura 3, onde verifica-se que não há ampliação significativa deste tipo de pesca – não pela falta de demanda, mas pela dificuldade de ampliação.



P – PERÍODO DE PREVISÃO

FIGURA 3 PRODUÇÕES MUNDIAIS: CAPTURA VERSUS PISCICULTURA

FONTE: O AUTOR (2015)

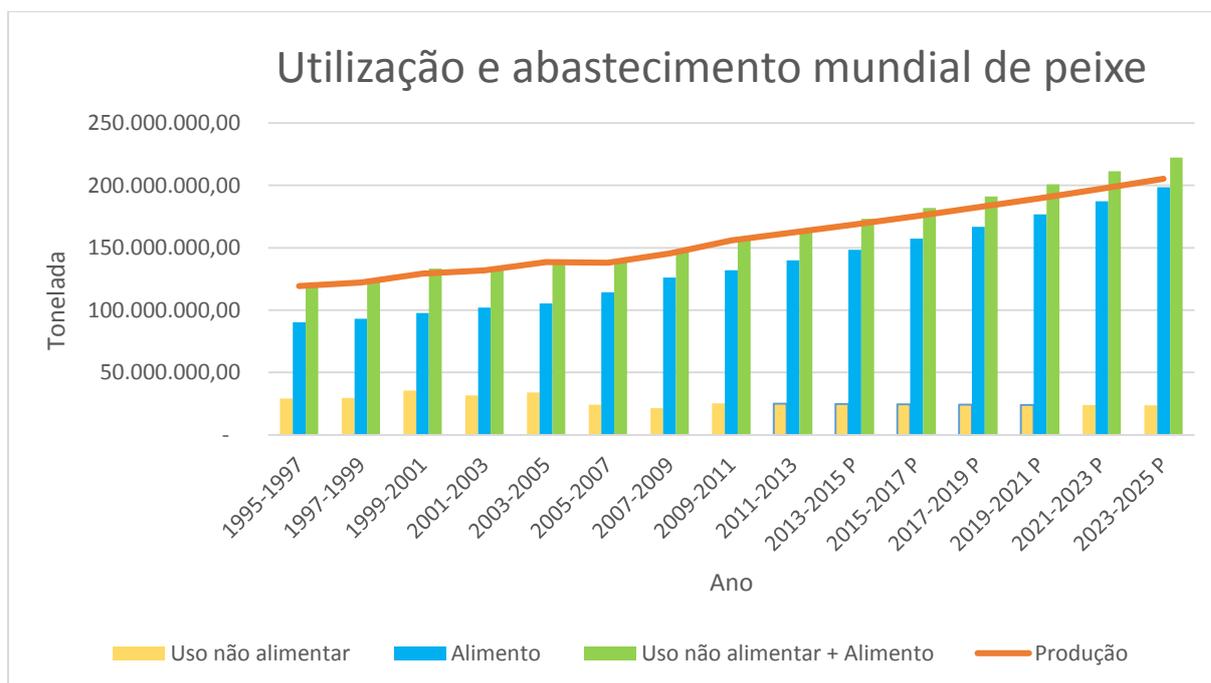
A Figura 3 mostra o crescimento da pesca selvagem e da piscicultura desde 1950, observa-se que a captura de peixe selvagem atingiu o pico no início de 1990 e tem sido uma constante desde então. Em relação à piscicultura, esta produção tem crescido exponencialmente desde o início de 1990 e em 2012 chegou a quase o mesmo nível que a captura selvagem.

A produção de óleo de peixe via piscicultura necessita da pesca extrativa que estão com seus níveis de produção reduzidos ou praticamente estáticos, é, portanto, um fator que pode afetar o crescimento do mercado de ômega-3. Os principais produtores e exportadores de óleo de peixe são a Dinamarca, Peru e Chile. O último recentemente sofreu sanção à pesca de anchovas. Além disso, o fenômeno climático

El Niño, que provoca variação na temperatura da água da superfície do Oceano Pacífico oriental, resultou em menor disponibilidade de peixes em partes da América do Sul. (FAO, 2014; GRAND VIEW RESEARCH, 2014). Portanto, o mercado mostra grandes oportunidades para o desenvolvimento de fontes alternativas para a produção de ômega-3.

Com um crescimento significativo de 8,7% ao ano, o mercado mundial de óleo de peixe vai saltar de USD 1.853 milhões em 2013 e deve chegar a US \$ 5.000 milhões em 2025, e o aumento da piscicultura, e do consumo humano vem como uma injeção no mercado. Este aumento do consumo foi permitido por uma combinação de crescimento econômico, pela busca por dietas mais saudáveis, e uma distribuição mais eficiente dos produtos (DELARUE; GURIEC, 2014; TOCHER, 2015).

A produção de peixe e de produtos da pesca está no seu limite e a demanda aumenta a cada ano, como mostrado na figura 4, tornando-se um desafio para o desenvolvimento do mercado global de óleo de peixe.



P – PERÍODO DE PREVISÃO

FIGURA 4 UTILIZAÇÃO E ABASTECIMENTO MUNDIAL DE PEIXE

FONTES: O AUTOR (2015)

A demanda global de alimentos com ômega-3 era de 21.900 toneladas em 2012 e espera-se que aumente para mais de 60.000 toneladas em 2020, a uma taxa de crescimento anual composta de 13,7% 2014-2020 (Grand View Research, 2014).

Os segmentos da indústria de ômega-3 incluem suplemento/alimentos funcionais, produtos farmacêuticos, fórmulas infantis e alimentos para animais. Nesta pesquisa, nutrição clínica e bebidas foram considerados “outros” itens, como mostrado na Figura 5.

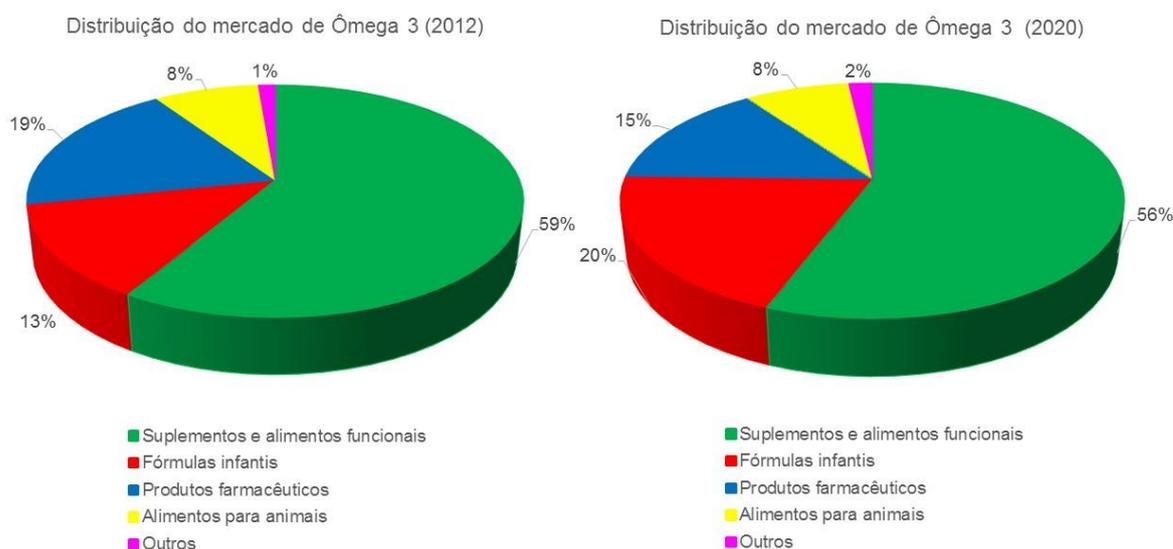


FIGURA 5 DISTRIBUIÇÃO DE MERCADO DE OMEGA 3  
 FONTE: GRAND VIEW RESEARCH (2014)

O segmento com maior aplicação de ômega-3 foi o de alimentos funcionais e suplementos com mais de 55% e consumo de 12.800 toneladas de ômega-3 em 2012. Os segmentos farmacêuticos e fórmulas infantis representam 33% da receita total. O segmento de fórmulas infantis é o de crescimento mais rápido no período, com uma taxa de crescimento prevista em 15,3% ao ano até 2020 (GRAND VIEW RESEARCH, 2014). Isso ocorre porque o enriquecimento da fórmula infantil com DHA e ARA para as crianças não-amamentadas foi reconhecido por vários organismos oficiais, incluindo a ONU FAO / OMS (Organização para Agricultura e Alimentação / Organização Mundial da Saúde), que recomenda que qualquer fórmula deve conter DHA e ARA.

Devido à demanda crescente mundial por ácidos graxos ômega-3, quer seja para nutrição humana ou para piscicultura (ração para peixes) está ocorrendo a redução das populações e até mesmo extinção de várias espécies de peixes (MARTINS et al., 2013). Contudo, sabe-se que a produção de DHA por meio de matéria-prima animal consome recursos naturais cada vez mais escassos, e também

espaço. Por exemplo, a pesca marinha extrativista tem causado declínio de algumas espécies de peixes, sendo que algumas sofrem com o risco da extinção. Além dos riscos desta atividade, existe o fato da mesma não ter sustentado a demanda, necessitando aumentar cada vez mais os níveis de predação, portanto, é notória a importância de pesquisar-se fontes alternativas à produção de ácidos ômega-3 (BIBUS, 2015; KITESSA et al., 2014).

### 2.3 AS FONTES ALTERNATIVAS DE PUFAS

A preocupação com a pesca de espécies selvagens para atender à crescente demanda de ômega-3 moveu esforços para a produção em terra, incluindo a piscicultura, plantas geneticamente modificadas, e produção em larga escala de microrganismos oleaginosos (ADARME-VEGA; THOMAS-HALL; SCHENK, 2014).

Aditivos como soja, canola, trigo, linhaça, incluindo alguns organismos marinhos (microalgas) têm sido incorporados as rações utilizadas na piscicultura, apresentando efeitos positivos no crescimento e conteúdo nutricional dos peixes de cativeiro (TOCHER, 2015). No entanto, a produção de DHA a partir de peixe tem vários inconvenientes. Esses contrapontos são ligados procedimentos de purificação complexos, contaminação indesejada por poluentes e aspectos marítimos relacionados à sustentabilidade (CHAUTON et al., 2015).

As plantas geneticamente modificadas e suas sementes têm sido utilizados como novas fontes de ômega-3. Deve ser enfatizado que as plantas superiores não têm a capacidade natural para sintetizar alguns ácidos graxos poli-insaturados, como o DHA. Os ácidos encontrados na maioria dessas plantas são o ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA) (18:3n-3) e o ácido linoléico (LA) e a síntese de ácidos graxos poli-insaturados em plantas nativas a partir de LA e ALA é inviável devido à ausência de enzimas elongases e dessaturases (ADARME-VEGA; THOMAS-HALL; SCHENK, 2014).

A síntese de AGPI é realizada por via aeróbica convencional, ácido graxo sintase (Figura 6), o LA (18: 2n-6) é metabolizado em ácido araquidônico (AA) (20: 4n-6) e o ALA (18: 3n -3) a ácido eicosapentaenoico (EPA) (20: 5n-3) e ácido docosahexanóico (DHA) (22: 6n-3) pela ação de enzimas  $\Delta$ -6 e  $\Delta$ -5-dessaturases e elongases. Esta via ocorre na maior parte dos eucariotos (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2007; HAUVERMALE et al., 2006; MORITA et al., 2006; UTTARO, 2006).

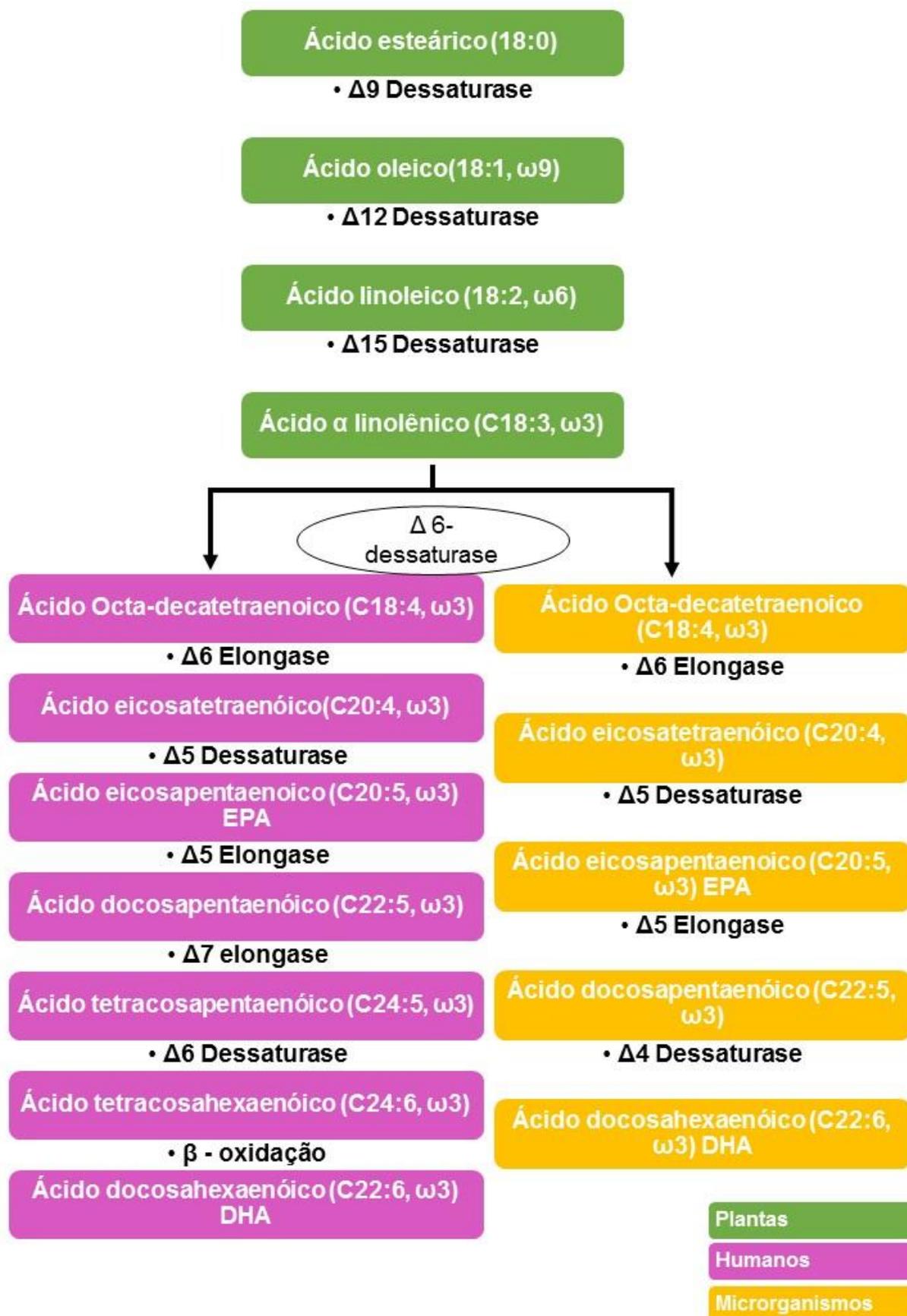


FIGURA 6 BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS - VIA AERÓBICA CONVENCIONAL, ÁCIDO GRAXO SINTASE.  
 FONTE: O AUTOR (2015)

Esta via é caracterizada pelas reações enzimáticas sequenciais de dessaturação e alongamento de ácido graxo no retículo endoplasmático. Deste modo, as ligações duplas são introduzidas na cadeia de ácidos graxos pelas dessaturases por um sistema dependente de oxigênio, o qual é composto por pelo menos três tipos de enzimas: NADPH-citocromo b5 redutase, citocromo b5 e um ácido graxo terminal dessaturase, tal como ilustrado na Figura 7.

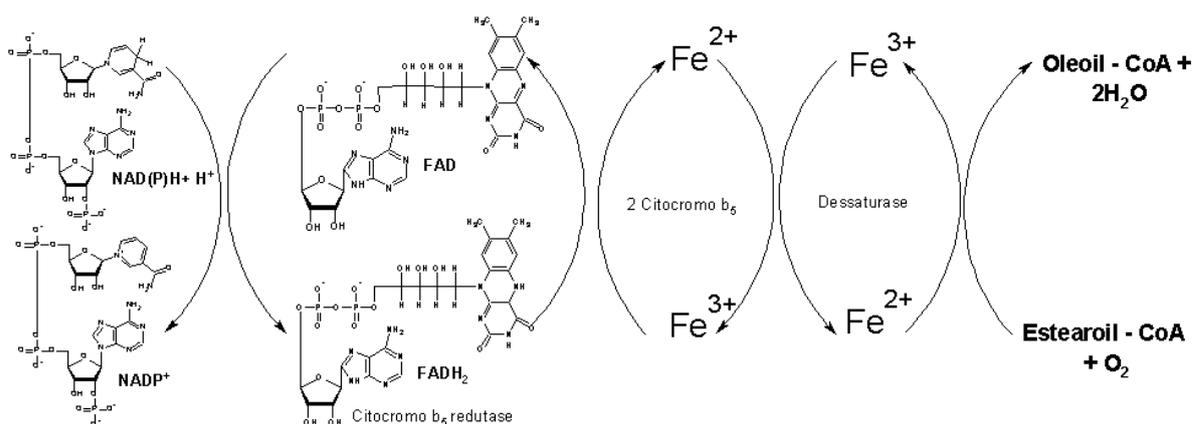


FIGURA 7 COMPLEXO AERÓBICO DE DESSATURÇÃO  
 FONTE: O AUTOR (2015)

Em contraste com o sistema FAS (sigla em inglês para ácido graxo sintase), a via PKS (sigla em inglês para policetídeo sintase) (Figura 8) não requer oxigênio molecular durante a síntese (HUANG; PEREIRA; LEONARD, 2004; METZ et al., 2001; NAGANO et al., 2011). O sistema PKS envolve acetil-CoA e a malonil-CoA como os componentes de síntese essencial, no entanto, não envolve os intermediários da via e reações de redução. Por exemplo, a síntese de ácidos graxos de cadeia longa com *Schizochytrium sp* pela via PKS (RATLEDGE, 2004), envolve o uso de 8 enzimas: 3-cetoacil-sintase (KS), malonil-CoA: ACP-aciltransferase (MAT), proteína transportadora de acil (ACP), 3-cetoacil-ACP-redutase (KR), aciltransferase (AT), o fator de comprimento da cadeia (CLF), enoil redutase (ER) e isomerase (DH). Ao contrário da utilização de várias elongases e dessaturases e enzimas na via FAS, a via PKS exhibe reações de desidratação e isomerização que envolvem os produtos intermediários de ácidos graxos (ARMENTA; VALENTINE, 2013; GUPTA; BARROW; PURI, 2012; NAGANO et al., 2011).

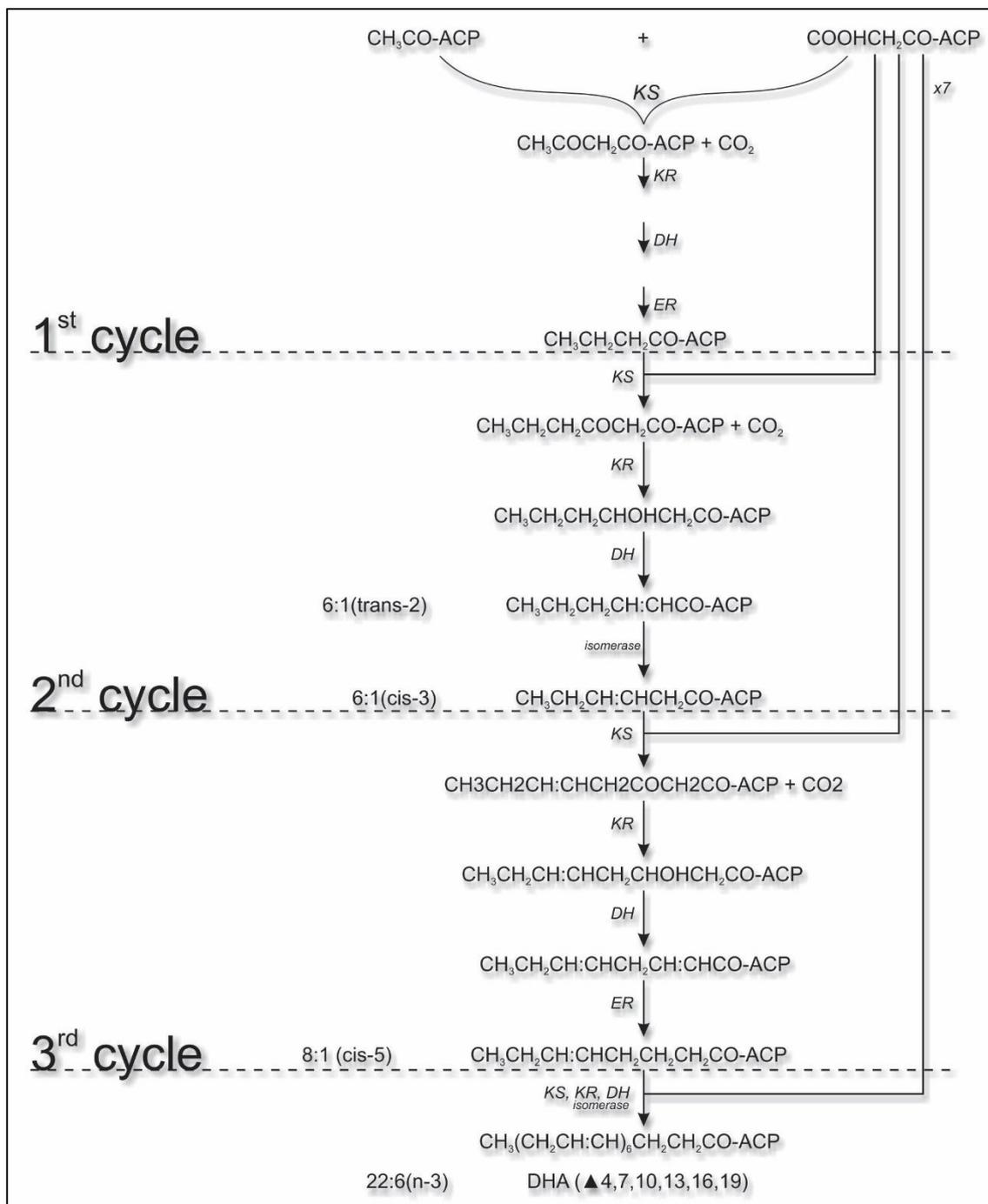


FIGURA 8 SÍNTESE DE DHA EM SCHIZOCHYTRIUM SP. PELA VIA PKS  
 FONTE: (GUPTA; BARROW; PURI, 2012)

Com base nos estudos supracitados sobre as vias sintéticas, é válido afirmar que progressos consideráveis têm sido realizados em relação a produção de sementes com enzimas capazes de sintetizar PUFA e estudos com a implementação de genes em plantas superiores, esses genes estão diretamente envolvidos na via biossintética de PUFA e, são provenientes de microrganismos acumuladores de lipídeos (ADARME-VEGA; THOMAS-HALL; SCHENK, 2014). Alguns exemplos são a

introdução da via FAS em plantas como *Arabidopsis*, soja e canola; os genes do fungo *Mortierella alpina* que codificam a enzima  $\Delta 6$ -dessaturase,  $\Delta 5$ -dessaturase e elongases foram expressos com sucesso em soja; síntese de DHA em plantas de *Arabidopsis* usando os genes da rota PKS derivados de *Schizochytrium* (RUIZ-LÓPEZ et al., 2012; VALENTINE; VALENTINE, 2004; VENEGAS-CALERÓN; SAYANOVA; NAPIER, 2010).

As plantas geneticamente modificadas são uma alternativa como fonte de PUFA para piscicultura e nutrição humana. Porém em relação aos níveis de DHA, os oriundos de plantas são em sua maioria mais baixos do que de microrganismos oleaginosos, e além disso existem muitas barreiras comerciais em relação as plantas transgênicas dificultando ainda mais o desenvolvimento de alternativas mais viáveis que o uso de microrganismos.

Nesse contexto, é factível pensar que os avanços na produção de óleos microbianos utilizando-se processos biotecnológicos permitirão que se alcance patamares sustentáveis, os quais estarão em consonância com a demanda pelos cuidados ambientais requeridos na atualidade. O potencial desta fonte é discutido na próxima seção.

#### 2.4 SINGLE CELL OIL POTENCIAL INDUSTRIAL

O mercado global de ácidos graxos ômega-3, especialmente DHA, teve uma grande expansão na última década devido ao aumento do consumo dessa substância, em alimentos e também como um importante componente da fórmula de suplementos e alimentos infantis (SALEM; EGGERSDORFER, 2015).

Neste contexto, em meados dos anos 80, a produção de DHA ganhou destaque em todo o mundo, devido à incorporação deste ácido graxo em fórmulas infantis (COLLINS et al., 2011; INNIS, 2008). O recurso a esta incorporação é devido a essencialidade deste composto para a formação de tecidos neurais e membranas do olho em recém-nascidos.

Neste sentido, a fim de produzir DHA com segurança para utilização em fórmulas para lactentes, David Kyle da Martek Corporation, em 1992, iniciou seu trabalho, encontrando como promissor o microrganismo *Cryptocodinium cohnii*, a fim de produzir DHA de uma maneira controlada, por processos fermentativos a uma

escala industrial. Em 2002, o óleo contendo ácido graxo ômega-3, conhecido como DHASCOTM, foi dado como o status de GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pelo FDA nos Estados Unidos e, a partir dessa data, o óleo poderia, então, ser adicionados às fórmulas para lactentes nos Estados Unidos (RATLEDGE, 2013). Desde então, a produção de ácidos graxos ômega-3 por fermentação tem aumentado em todo o mundo (Ratledge e Cohen 2008; Christophe et al. 2012; Huang et al. 2013; Garay et al. 2014). Como um exemplo das dimensões astronômicas alcançadas pela produção deste suplemento alimentar, as transações financeiras de DHA, foram marcado pela venda de Martek Biosciences em 2011 para DSM (Dutch State Mines). Esta transação foi de US \$ 1,1 bilhão, refletindo as vendas do preço do óleo, produto considerado a “pedra angular” da empresa (RATLEDGE, 2013).

Destaca-se que, a proporção das vendas atuais no que se refere a produtos com tal substância, pontuam marcas não menos exorbitantes que a de 2000 toneladas por ano; taxas as quais têm tendência ao aumento nos anos que seguem. Todavia, embora os preços do óleo sejam tratados como “comercialmente sensíveis”, a Martek gerou receita de U\$ 317 milhões, em 2010, valores fundados em vendas de óleo para a nutrição infantil (RATLEDGE, 2013).

Paralelamente a David Kyle, Bill Barclay, líder da Omega -Tech Inc., descobriu que havia um grande grupo de organismos eucarióticos marinhos, conhecidos como *Traustoaquitrídeos*, capazes de produzir altas concentrações de DHA. Barclay conseguiu selecionar uma linhagem específica a qual apresentou bons rendimentos de produção, o *Schizochytrium sp.*, espécie a qual servirá como base produtora de DHA, nesta investigação. Isso foi possível, também, pois, em 2004, o óleo produzido por *Schizochytrium sp.* teve seu certificado GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pelo FDA (RATLEDGE, 2013)

Adicionalmente, as espécies do gênero *Traustoaquitrídeos* são de interesse comercial, devido ao seu potencial não só por sua capacidade de sintetizar DHA, mas também, por sua velocidade de crescimento e forma rápida para alcançar densidades celulares elevadas, uma vez associados a processos fermentativos industriais adequados. Por exemplo, segundo (RATLEDGE, 2013)os *Traustoaquitrídeos* submetidos a fermentadores de 100 a 150m<sup>3</sup>, alcançam densidades celulares de 200g/L em menos de 72 horas, suas células contêm até 60 % (p/p) em óleo e, pelo menos 40 % dos ácidos graxos totais é formado por DHA.

Quanto a potencialidade do uso deste óleo microbiano na indústria de alimentos, pode-se dizer que o DHA produzido por esses microrganismos pode ser incorporado em uma grande variedade de alimentos como, por exemplo, os patês de mesa, maioneses e laticínios em geral (BARCLAY *et al.*, 2010); há, também, o aproveitamento por meio do encapsulamento, processo que pode tornar mais barato o acesso a tal substância.

Outros dados existentes sobre os aspectos econômicos da produção mundial de DHA são na sua maioria propriedade de empresas privadas, a Figura 9 mostra a distribuição geográfica das principais empresas que operam neste setor (VIGANI *et al.*, 2015). Entre as empresas produtoras de DHA proveniente de microrganismos estão a Lonza Group Ltd; Cellana Inc.; Rishon International Group; Hubei Youzhiyou Biotechnology Co. Ltd.; Hubei Fuxing Biotechnology Co. Ltd.; Shantou Runke Biological Engineering Company; Wuhan Bioco Sci & Tech Dev Co. Ltd; e Cargill Alking Bioengineering (Wuhan) Co. Ltd.

Neste mercado ainda pouco explorado, a DSM tem ênfase global sobre a produção de ácidos graxos ômega-3, como o principal fornecedor de DHA para o mercado norte-americano (o que representa 80 por cento do mercado) europeu e asiático (excluindo a China).

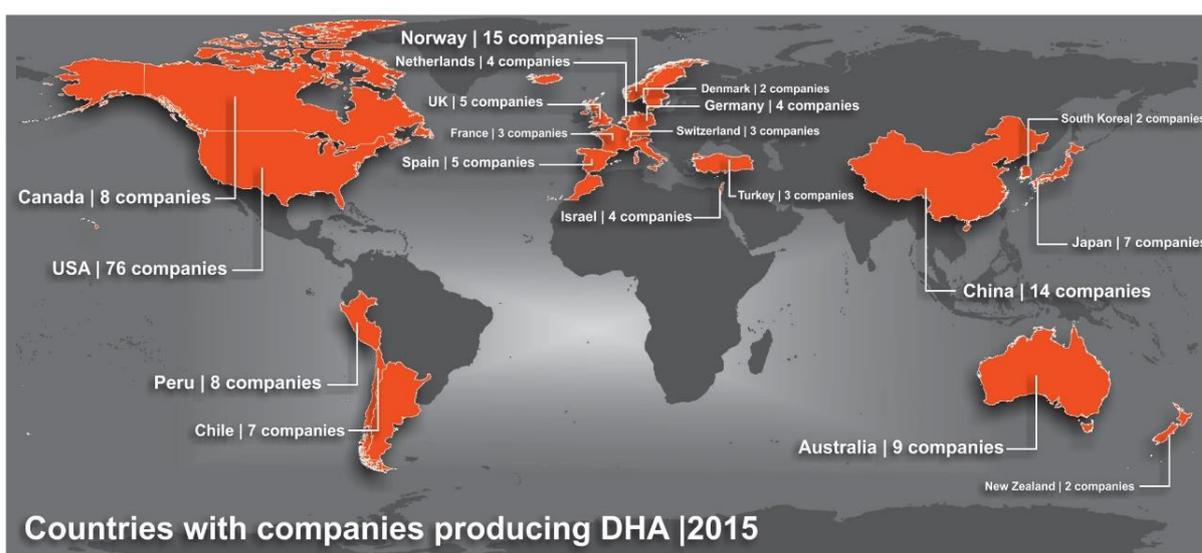


FIGURA 9 DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DE EMPRESAS PRIVADAS QUE PRODUZEM DHA  
FONTE: O AUTOR (2015)

A figura 9 mostra como alguns poucos países dominam o mercado mundial de DHA, mostrando que Singles Cells Oils (SCOs) ainda são um campo promissor para

a investigação e desenvolvimento. A produção de óleos microbianos que utilizam processos biotecnológicos avançados podem fornecer níveis sustentáveis de óleos PUFA antes de outras tecnologias.

Outro aspecto econômico importante é o fato de que a produção global de DHA não está atendendo a demanda fato comprovado por informações da FAO (2014). A tabela 1 a seguir mostra uma visão geral da produção mundial de ômega-3. Com base na ingestão diária recomendada para a saúde, o mercado total de ácidos graxos ômega-3 foi estimado em 1,3 milhões de toneladas por ano, enquanto a oferta total é estimada em pouco mais de 0,8 milhões de toneladas métricas, indicando um déficit de mais de 0,4 milhão de toneladas métricas por ano (TOCHER, 2015).

TABELA 1 DEMANDA ANUAL DE DHA COM BASE NA RECOMENDAÇÃO DE CONSUMO

	Milhões de toneladas	Notas
<b>Demanda (3.5g/semana x 52semanas x 7bilhões)</b>	1.274	Baseado em 500 mg/dia (ISSFAL, 2004)
<b>Abastecimento</b>	0.84	
<b>Déficit (demanda – abastecimento)</b>	0.434	
<b>Pesca selvagem (Alimento)</b>	75.0	FAO (2014)
<b>Conteúdo de DHA (20%)</b>	0.375	
<b>Pesca selvagem (Ração)</b>	20.0	FAO (2014)
<b>Conteúdo de DHA (25%)</b>	0.11	
<b>Óleo de peixe produzido</b>	1.0	Rendimento de óleo é variável
<b>Conteúdo de DHA (25%)</b>	0.25	
<b>Produtos marinhos (incluindo piscicultura)</b>	2.0	Cerca de 50% de subprodutos são produzidos a partir de piscicultura e, por conseguinte, o DHA é obtido principalmente a partir de farinha de peixe e óleo de peixe.
<b>Conteúdo de DHA (10%)</b>	0.01	
<b>Óleo de peixe produzido</b>	0.2	
<b>Conteúdo de DHA (10%)</b>	0.02	
<b>Piscicultura (mal-alimentada)</b>	20.5	(FAO, 2014)
<b>Conteúdo de DHA (25%)</b>	0.05	
<b>Piscicultura (produção endógena)</b>	NA*	
<b>Microalgas</b>	23.8	
<b>Conteúdo de DHA (15%)</b>	0.02	

A produção de DHA (ômega-3) foi estimado de acordo com a variedade de espécies dentro de cada classe. \* NA, não está disponível.

FONTE: (TOCHER, 2015)

De acordo com a tabela 1, é evidente que as fontes alternativas de DHA devem ser exploradas industrialmente porque a demanda global nas próximas décadas não vai atender o consumo global com as fontes de produção atuais. Segundo Adarme-Vega et al 2014, o aumento previsto do consumo mundial de alimentos com ômega-3 indica que a demanda anual de óleo de peixe será muito maior do que a oferta atual global já em 2017.

Neste contexto Delarue e Guriec (2014) afirmam que, no mercado norte-americano, o percentual de adultos que consomem suplementos com ômega-3 saltou de 8% em 2006 para 17% em 2011 e as despesas globais de produtos de consumo que contenham ômega-3 (excluindo peixe) foi de cerca de USD \$ 13 bilhões em 2011 e deve chegar a 34,7 bilhões em 2016. Além disso, a demanda de óleo de peixe (ômega-3) foi de 1035 toneladas quilo em 2011 e deve chegar a 1130 toneladas quilo em 2018.

A sustentabilidade desse mercado em crescimento de ômega-3 é um novo desafio para o desenvolvimento de novos processos tecnológicos de produção que utilizam fontes renováveis de matérias-primas e são mais amigáveis com o meio ambiente. Desta forma, são notáveis os potenciais benefícios ecológicos a produção de óleos microbianos para suprir a demanda da indústria de alimentação humana e animal por compostos bioativos, como ômega-3.

## 2.5 A PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POR MEIO DE MICRORGANISMOS UNICELULARES

Os processos biotecnológicos para produção de lipídeos, a partir de microrganismos, são estudados desde o final do século XIX (RATLEDGE, 2004). Entretanto, os avanços na utilização de microrganismos para a produção de óleos para a indústria alimentícia, ocorreu mais tardiamente, em meados da década de 1970. Naquele momento histórico, cientistas revelaram os processos bioquímicos do metabolismo de microrganismos oleaginosos quando estes acumulam lipídios, a saber: os fungos, as leveduras, as microalgas e bactérias, todos estes capazes de acumular acima de 20% de lipídeos em relação ao seu peso seco (RATLEDGE, 2013). Nesse contexto, a produção de óleos denominados *Single Cell Oil* (óleo de organismos unicelulares) surgiu como alternativa de produção para a indústria de alimentos. O óleo de célula única pode ser definido como aquele produto obtido a

partir de microrganismos unicelulares. Esses óleos possuem características semelhantes às dos óleos e gorduras provenientes de plantas e animais (DEWAPRIYA; KIM, 2014; MENG et al., 2009; RATLEDGE; COHEN, 2008; WARD; SINGH, 2005). Segundo (HUANG et al., 2013), a vantagem de se produzir óleo microbiano está relacionada à alta diversidade e capacidade de acumular lipídeos que os microrganismos oleaginosos possuem. Além disso, por serem microrganismos, estes indivíduos de natureza unicelular tem velocidade de crescimento alta, e sua manipulação genética é menos onerosa que a de seres mais complexos, como plantas e animais superiores (GARAY; BOUNDY-MILLS; GERMAN, 2014).

Como um exemplo da capacidade de produção dos microrganismos unicelulares, se analisa a produção de óleos a partir de organismos superiores, tais como de amendoim (50% de óleo p/p), semente de colza (45% de óleo p/p), girassol (45% de óleo p/p), soja (20% de óleo p/p), coco (50% de óleo p/p) e de palma (50% de óleo p/p), e em comparação com a produção de óleo a partir de microrganismos unicelulares, tais como *Rhodotorula glutinis* (72% de óleo p/p), *Mortierella alpina* (56% de óleo p/p) de *Schizochytrium limacinum* (77% de óleo p/p), *Neochloris oleoabundans* (54% de óleo p/p), *Chaetoceros gracilis* (60% de óleo p/p), *Mortierella isabelina* (65% de óleo p/p), *Streptomyces coelicolor TR0958* (83% de óleo p/p) e *Botryococcus braunii* (75% de óleo p/p), vemos que os microrganismos oleaginosos produzem até 56% mais óleo do que os organismos superiores (THEVENIEAU; NICAUD, 2013).

Além das vantagens relativas a capacidade de produção, os óleos microbianos podem ser extraídos independentemente das condições climáticas (e.g., uma planta está sujeita às intempéries da sazonalidade, em contrapartida, um organismo unicelular pode ser facilmente manipulado num ambiente controlado), bem como, requerem menor espaço para serem produzidos e o fazem em menos tempo. Diferentemente, os óleos de origem vegetal e animal geram grande impacto ambiental quando produzidos em larga escala, por demandarem maiores espaços e esforços produtivos (ADARME-VEGA; THOMAS-HALL; SCHENK, 2014; CHRISTOPHE et al., 2012; SALEM; EGGERSDORFER, 2015; TOCHER, 2015). Por conseguinte, observando-se os motivos expostos é natural que, pesquisas científicas como a que aqui se desenha, intencionem descobrir novas possibilidades apresentadas pela produção de óleos por meio de microrganismos unicelulares.

Além disso, a viabilidade econômica da aplicação real destes processos, não é mais de conhecimento tácito, e sim, científico. Por esses motivos, é razoável

imaginar que, num cenário pouco mais adiante, será ampla a utilização de tais processos na produção de alimentos e, também, na produção de biocombustíveis. Na tabela 2 são apresentados diferentes microrganismos e sua capacidade de acumular lipídeos.

TABELA 2 TEOR DE ÓLEO DE ALGUNS MICRORGANISMOS

<b>Espécies</b>			
<b>Microalgas</b>	<b>Condições de cultura</b>	<b>Lipídeos (% peso seco)</b>	<b>Referências</b>
<i>Chlorella sp.</i>	Fototrófico	32.6–66.1	(HSIEH; WU, 2009)
<i>Dunaliella sp.</i>	Fototrófico	12.0–30.12	(ARAUJO et al., 2011)
<i>Neochloris oleabundans UTEX #1185</i>	Fototrófico	19–56	(GOUVEIA et al., 2009)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Fototrófico	21–58	(ABOU-SHANAB et al., 2011)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Fototrófico	15.5–60.28	(ARAUJO et al., 2011)
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Heterotrófico	19.9	(COUTO et al., 2010)
<i>Chlorella protothecoides</i>	Heterotrófico	49	(GAO et al., 2010)
<b>Leveduras</b>	<b>Fontes de Carbono</b>	<b>Lipídeos (% peso seco)</b>	<b>Referências</b>
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glicerol	25	(MEESTERS; HUIJBERTS; EGGINK, 1996)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Glicose e xilose	61	(ZHAO et al., 2008)
<i>Rhodospiridium toruloides Y4</i>	Glicose (Batelada)	48	(LI; ZHAO; BAI, 2007)
<i>Rhodospiridium toruloides Y4</i>	Glicose (Batelada alimentada)	67.5	(LI; ZHAO; BAI, 2007)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glutamato monossódico de águas residuais	20	(XUE et al., 2008)
<i>Trichosporon fermentans</i>	Glicose	62.4	(ZHU; ZONG; WU, 2008)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glicerol industrial	43	(PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2002)
<b>Fungos</b>	<b>Fontes de Carbono</b>	<b>Lipídeos (% peso seco)</b>	<b>Referências</b>
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Águas residuais de fécula de batata	19.03	(WANG et al., 2007)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Xilose	57.5	(FAKAS et al., 2009)
<i>Mortierella isabellina</i>	Xilose	65.5	(FAKAS et al., 2009)
<i>Mortierella isabellina</i>	Glicose	50-55	(PAPANIKOLAOU; KOMAITIS; AGGELIS, 2004)
<i>Trichoderma harzianum Q2-37</i>	Palha de milho	20.5	(WANG et al., 2012)
<i>Mortierella alpina</i>	Glicose	55	(NIE et al., 2013)

<b>Bactérias</b>	<b>Fontes de Carbono</b>	<b>Lípídeos (% peso seco)</b>	<b>Referências</b>
<i>Acinetobacter baylyi</i> <i>ADP1(MT)</i>	Gluconato de sódio e glicerol	12.4	(SANTALA et al., 2011)
<i>Alcanivorax borkumensis</i> <i>SK2</i>	Piruvato	23	(KALSCHEUER et al., 2007)
<b><i>Gordonia</i> sp. DG</b>	Resíduos agroindustriais	57.8 mg/L meio de cultura	(GOUDA; OMAR; AOUAD, 2008)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>H37Rv</i>	Nutriente limitante	11.9	(BACON et al., 2007)
<i>Nocardia globerula</i> <i>432</i>	Pristine e acetato	49.7	(ALVAREZ et al., 2001)
<i>Rhodococcus opacus</i> <i>PD630</i>	Resíduos agroindustriais	88.9 mg/L meio de cultura	(GOUDA; OMAR; AOUAD, 2008)
<i>Rhodococcus opacus</i> <i>PD630</i>	Glicose	38	(KUROSAWA et al., 2010)
<i>Rhodococcus opacus</i> <i>PD630</i>	Melaço de beterraba e sacarose	38.4	(VOSS; STEINBÜCHEL, 2001)
<i>Rhodococcus opacus</i> <i>PD630</i>	Glicose	50	(Miller, 2012)
<i>Streptomyces coelicolor</i> <i>TR0958</i>	Glicose	83	(ARABOLAZA et al., 2008)
<i>Streptomyces coelicolor</i> <i>TR0123</i>	Glicose	64	(ARABOLAZA et al., 2008)
<b>Outros</b>	<b>Fontes de Carbono</b>	<b>Lípídeos (% peso seco)</b>	<b>Referências</b>
<b><i>S. limacinum</i> SR 21</b>	Glicerol/Glicose	60	(LI et al., 2015)
<i>Schizochytrium</i> sp. <i>CCTCC M209059</i>	melaço de cana	26.09	(REN et al., 2013a)
<i>S. limacinum</i> SR 21	Glicerol/Glicose	70	(PATIL; GOGATE, 2015)
<i>Schizochytrium</i> sp. <i>HX-308</i>	Glicose	69	(SUN et al., 2014)

FONTE: (LIANG; JIANG, 2013)

A tabela 2 demonstra a potencialidade do segmento de produção de óleos microbianos. Para que a produção de óleos microbianos possa ser parametrizada com a produção de óleo de peixe, é necessária uma avaliação dos custos envolvidos no processo. Dentre eles a fonte de carbono utilizada é um dos parâmetros mais importantes, sendo necessário explorar fontes de carbono mais baratas como por exemplo a utilização de resíduos agroindustriais (HUANG et al., 2013; LIANG; JIANG, 2013)

Para tanto, deve se, num primeiro momento, buscar resíduos os quais sejam economicamente viáveis para produção levando em conta critérios para a escolha do resíduo como a viabilidade de aquisição e disponibilidade, no que refere aos aspectos de transporte, aquisição (restrição de uso), e serventia à sociedade, neste item,

preconizar-se-á por aqueles resíduos os quais não tenham, ainda, inúmeras formas de reaproveitamento nos processos industriais (HUANG et al., 2013).

Ao analisar os custos de produção de lipídeos microbianos, a fonte de carbono é responsável por 60 a 75% dos custos totais. Para tornar a produção economicamente viável de *Single Cell Oil*, o uso de resíduos agroindustriais como fonte de carbono é uma alternativa eficaz. De acordo com os pontos discutidos acima, a tabela 3 apresenta substratos de baixo custo que foram utilizados para a produção óleo microbianos.

TABELA 3 SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO PARA A PRODUÇÃO DE SCOs

Substrate	Strains	Reference
Melaço	<i>Trichosporon fermentans</i>	(ZHU; ZONG; WU, 2008)
	<i>Cunninghamella echinulata</i>	(CHATZIFRAGKOU et al., 2010)
	<i>Schizochytrium</i> sp. CCTCC M209059	(REN et al., 2013a)
Resíduo de cervejaria	<i>Thraustichytridae</i> sp. M12-X1	(QUILODRA, 2009)
Hidrolisados de amido	<i>Mortierella alpine</i>	(ZHU; YU; WU, 2003)
Hidrolisado de resíduos de tomate	<i>Cunninghamella echinulata</i>	(FAKAS et al., 2008)
Águas residuárias (lodo de esgoto)	<i>Lipomyces starkeyi</i>	(ANGERBAUER et al., 2008)
Efluentes de indústria de azeite	<i>Lipomyces starkeyi</i>	(YOUSUF et al., 2010)
Glutamato monossódico de águas residuais	<i>Rhodotorula glutinis</i>	(XUE et al., 2006, 2008, 2010)
Glicerol	<i>Yarrowia lipolytica</i>	(PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2003)
Glicerol	<i>Schizochytrium limacinum</i>	(ETHIER et al., 2011)
Soro de leite	<i>Mortierella isabellina</i>	(VAMVAKAKI et al., 2010)
Resíduos de alimentos	<i>Schizochytrium mangrovei</i>	(PLEISSNER et al., 2013)
Resíduos de alimentos	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	(PLEISSNER et al., 2013)
Hidrolisado de palha de arroz	<i>Trichosporon fermentans</i>	(HUANG et al., 2009)
Hidrolisado de palha de trigo	<i>Cryptococcus curvatus</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodospiridium toruloides</i> , <i>Lipomyces starkeyi</i> , and <i>Yarrowia lipolytica</i>	(YU et al., 2011)
Hidrolisado de casca de arroz	<i>Mortierella isabellina</i>	(ECONOMOU et al., 2011)
Hidrolisado de sabugo de milho	<i>Trichosporon dermatis</i>	(HUANG et al., 2012a)
Hidrolisado de bagaço de cana	<i>Trichosporon fermentans</i>	(HUANG et al., 2012b)
Hidrolisado de bagaço de cana	<i>Yarrowia lipolytica</i>	(TSIGIE et al., 2011)

FONTE: (HUANG et al., 2013)

Na tabela 3, são apresentadas várias pesquisas utilizando resíduos como substrato para fermentação de leveduras, entre os substratos utilizados estão: glicerol

bruto, águas residuais municipais + glicose, melaço de beterraba, soro de leite, efluente da fábrica de óleo de palma e amido de mandioca e todos eles obtiveram uma produção significativa de lipídeos em torno de 50% de óleo p/p (LEIVA-CANDIA et al., 2014). Outro exemplo são os fungos filamentosos oleaginosos usando glicerol bruto produziu 70% de óleo p/p. O uso de melaço de cana, amido solúvel e palha de trigo para fermentações de fungos também alcançaram sucesso.

Os substratos feitos a partir de material lignocelulósico são indicados para a fermentação de leveduras e fungos, algumas espécies de fungos, tais como *Ephalosporium* ou *Sclerocystis*, podem produzir celulases e acumular lipídeos simultaneamente. Pesquisas recentes estão selecionando leveduras capazes de degradar material lignocelulósico e acumular lipídeos (PENG; CHEN, 2007; THEVENIEAU; NICAUD, 2013).

O mercado de SCO é muito atrativo devido à demanda mundial por lipídeos ricos em PUFA. A utilização de resíduos como substrato para fermentação desses microrganismos pode alavancar a produção de SCO pois o custo é muito menor do que a fermentação com substratos sintéticos ou purificados. Além disso, a disponibilidade de resíduos agroindustriais é imensa, então cabe aos cientistas desenvolver processos de hidrólise e tecnologias de pré-tratamento capazes de aproveitar ao máximo esses resíduos como fonte de carbono para fermentações de microrganismos oleaginosos (HUANG et al., 2013; LEIVA-CANDIA et al., 2014; THEVENIEAU; NICAUD, 2013).

A comparação de custos entre um substrato a partir de material sintético e uma fermentação usando resíduos agroindustriais é complicado porque depende fortemente de fornecedores, da disponibilidade e da cadeia de abastecimento e transporte de resíduos a ser utilizado. Além disso, para cada tipo de resíduos existe um pré-tratamento específico que envolve um custo significativo no processo de produção.

Alguns microrganismos oleaginosos são considerados promissores para produção em escala industrial, principalmente porque eles já têm o GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) para a FDA (Food and Drug Administration), entre eles *Yarrowia lipolytica*, *Mortierella alpina*, *Schizochytrium*, *Cryptocodium cohnii* e *Ulkenia sp.*

Dentre os microrganismos produtores de óleo está o *Schizochytrium limacinum sr 21* uma das linhagens com maior capacidade de acumular lipídeos (LI et al., 2015;

PATIL; GOGATE, 2015; PYLE; GARCIA; WEN, 2008; YOKOCHI; HONDA; HIGASHIHARA, 1998). São poucas as pesquisas científicas que se atentam ao estudo das potencialidades da utilização deste microrganismo para a produção de óleo. Deste modo, dada a declarada intenção de se buscar inovação tecnológica nesta pesquisa, essa lacuna de conhecimento fez com que crescesse o interesse de se investigar esta variedade de microrganismo.

Assim sendo, faz-se necessário abrir um tópico específico para apresentação do *Schizochytrium limacinum sr 21*, com vistas a melhorar a compreensão acerca de suas propriedades metabólicas de crescimento e acumulação de lipídeos

## 2.6 O MICRORGANISMO *SCHIZOCHYTRIUM LIMACINUM SR 21*

O *Schizochytrium limacinum sr 21* (Figura 10) pertence aos *Traustochytrídeos* (*Labyrinthomycoata*) e é um microrganismo marinho heterotrófico (RAGHUKUMAR, 2002), descoberto em 1994 no oeste do Oceano Pacífico em uma área de mangue da Micronésia (HONDA et al., 1998). A classificação taxonômica dos *Traustochytrídeos* por muito tempo foi questão discutida entre os cientistas devido ao seu comportamento estrutural e funcional. Na década de 1970, relacionaram estes indivíduos unicelulares aos *Oomycetes* (KAZAMA, 1972, 1974). Entretanto, com a evolução do sequenciamento de DNA incorporou-se tais microrganismos aos *Ficomicetes* (BARR, 1981).

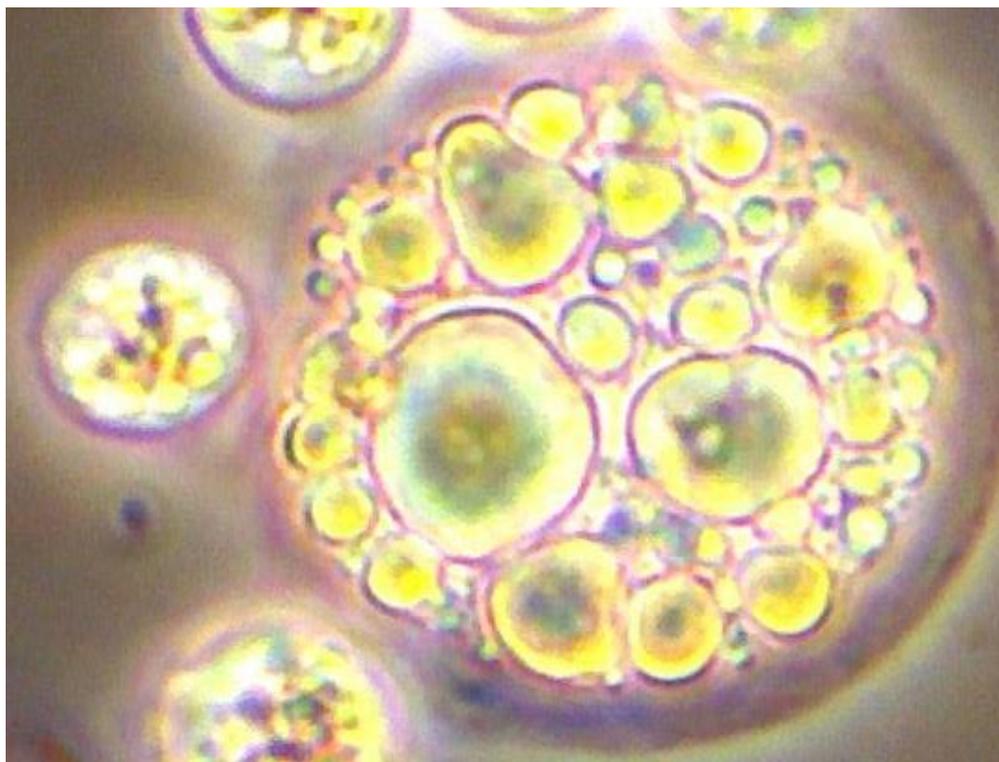


FIGURA 10 CÉLULAS DE *SCHIZOCHYTRIUM* COM SEUS CORPOS LIPÍDICOS  
 FONTE: O AUTOR (2015)

Os impasses promovidos por tais discussões findaram quando Cavalier-Smith; Allsopp; Chao, (1994) e Honda *et al.* (1999) conseguiram chegar a uma classificação taxonômica consensual. Desta forma, a espécie *Schizochytrium limacinum sr 21* foi isolada em 1998 por Honda *et al.* e, atualmente, é classificada segundo a seguinte taxonomia:

<b>Domínio</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>Reino</b>	<i>Chromophyta</i>
<b>Filo</b>	<i>Heterokonta</i>
<b>Família</b>	<i>Thraustochytriaceae</i>
<b>Ordem</b>	<i>Thraustochytriales</i>
<b>Gênero</b>	<i>Schizochytrium</i>

A Figura 11 mostra as diferentes morfologias do microrganismo *Schizochytrium limacinum sr 21*, em diferentes estágios de desenvolvimento da cepa, cultivada por (HONDA *et al.*, 1998)

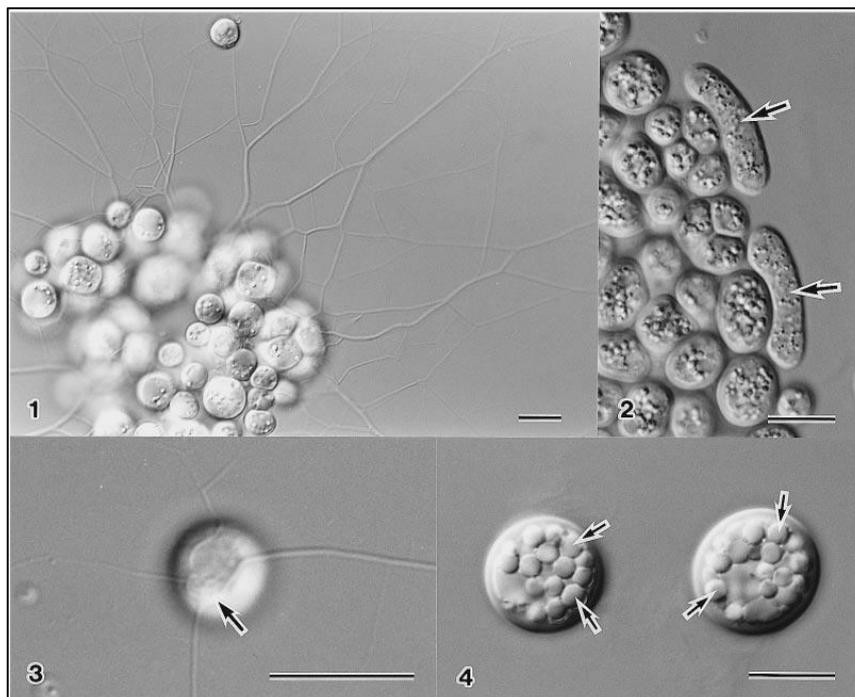


FIGURA 11 ESTÁGIOS MORFOLÓGICOS DO MICROORGANISMO ESTUDADO - MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO, AUMENTO DE 400 A 2000K (BARRA DE TAMANHO COM 1  $\mu$ M)  
 FONTE: (HONDA ET AL., 1998)

Observa-se na Figura 11 que a espécie *Schizochytrium limacinum* apresenta as seguintes características morfológicas: sucessivas divisões celulares binárias que formam grupos de células; células vegetativas tornando-se zoosporângios e liberando zoósporos; células vegetativas liberando células com formato ameboide. Além disso, é capaz de formar uma rede de ectoplasma que facilita a absorção de nutrientes e ajuda na fixação do microrganismo em meio de cultivo sólido. Tem a possibilidade de produzir enzimas extracelulares que acabam por hidrolisar materiais orgânicos complexos, aumentando a absorção de nutrientes pelo microrganismo (HONDA et al., 1998; MORITA et al., 2006; NAKAI et al., 2013; SHIRASAKA et al., 2005)

A aplicabilidade industrial de algumas cepas de *Schizochytrium limacinum* confia em sua capacidade de acumular 70% de lipídeos, considerando seu peso seco, a partir de fontes de carbono baratas (CHI et al., 2009; ETHIER et al., 2011; LIANG et al., 2010; PATIL; GOGATE, 2015; ROSA et al., 2010).

*Schizochytrium limacinum* demonstra grande potencial para ser produzido em escala industrial, uma vez que tem muitas vantagens sobre outras estirpes tais como a sua capacidade para se adaptar a uma vasta gama de condições de cultura, a sua elevada tolerância à salinidade: (50 a 200% da salinidade marinha). Esta espécie suporta elevados níveis de agitação, cresce bem à temperatura ambiente, com um

intervalo ótimo de 20 a 30°C. Além disso, é capaz de converter resíduos agroindustriais e subprodutos, tais como o glicerol, a vinhaça de cana de açúcar, sem afetar a produção de DHA (CHIN et al., 2006; HUANG; LU; CHU, 2012b; LI et al., 2015; PATIL; GOGATE, 2015; YOKOCHI; HONDA; HIGASHIHARA, 1998).

A família de microrganismos *Traustoquitrídeos* pode produzir o ácido graxo poli-insaturado DHA (ácido docosahexaenóico). A eficácia de produção de DHA por estes microrganismos é mostrada na Tabela 4.

TABELA 4 TRAUSTOQUITRÍDEOS ISOLADOS A PARTIR DE DIFERENTES AMBIENTES E SEU RESPECTIVO TEOR DE DHA (% DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS)

Microrganismos	Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio	Biomassa (g/L)	DHA (%AGT)	Tempo de fermentação (h)	Tipo de fermentação	Referências
<i>Schizochytrium sp. SR 21</i>	Glicose	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / Corn steep liquor	21.9-59,2	33.3-38.6	125	Batelada	(YAGUCHI et al., 1997)
<i>S. limacinum SR 21</i>	Monossacarídeos	Peptona/Extrato de levedura	12	6.0-43.1	120	Batelada	(Yokochi et al. 1998)
<i>S. mangrovei G-13</i>	Glicose	Poli peptona/ Extrato de levedura	14	28	96	Batelada	(BOWLES et al., 1999)
<i>S. limacinum KH 105</i>	Glicose	Poli peptona/ Extrato de levedura	11.5	34.9	120	Batelada	(AKI et al., 2003)
<i>Schizochytrium sp. N-2</i>	Glicose	Extrato de levedura	13.2	36.1	52	Batelada	(KAMLANGDEE; FAN, 2003)
<i>Schizochytrium sp. ATCC20888</i>	Glicose		171.5	35.32*	87,2	Batelada	(BAILEY et al., 2003)
<i>Schizochytrium mangrovei FB1</i>	Glicose	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / glutamato monossódico	8.53	39.14	120	Batelada	(JIANG et al., 2004)
<i>Schizochytrium sp. F26-b</i>	Glicose	Extrato de levedura	3.5	31.8		Batelada	(ABE et al., 2006)
<i>ONC-18</i>	Glicose	Extrato de levedura/Ácido Glutâmico	10.0-26.0	16-32	168	Batelada	(BURJA et al., 2006)
<i>Schizochytrium sp. KH 105</i>	Glicose	Shochu Distillery Wastewater	26	25.8	120	Batelada	(YAMASAKI et al., 2006)
<i>S. limacinum SR 21</i>	Glicerol	Acetato de amônio / Extrato de levedura	22.1	33.6	168	Batelada	(CHI et al., 2007)
<i>S. mangrovei Sk-02</i>	Água de coco / Glicose	Extrato de levedura	28	20	96	Batelada	(UNAGUL et al., 2007)
<i>Schizochytrium mangrovei FB3</i>	Glicose	Extrato de levedura	12.2	29.61	120	Batelada	(FAN et al., 2007)
<i>Schizochytrium sp. G13/2S</i>	Glicose	Glutamato Monossódico	15.7	47	56	Batelada	(GANUZA; IZQUIERDO, 2007)
<i>Schizochytrium sp. G13/2S</i>	Glicose	Glutamato Monossódico	8	41		Contínua	(GANUZA; IZQUIERDO, 2007)
<i>S. limacinum SR 21</i>	Glicerol	Peptona/Extrato de levedura	2.5-8.0	18.26-53.05		Batelada	(PYLE; GARCIA; WEN, 2008)
<i>S. limacinum OUC88</i>	Glicose	Hidrolisado de torta de soja	25.92	4.08	120	Batelada	(ZHU et al., 2008)

<i>S. limacinum</i> SR 21	Glicerol	Corn steep liquor/Acetato de amônio	37.9	6.56	40	Batelada	(CHI et al., 2009)
<i>S. limacinum</i> SR 21	Suco de sorgo doce		9.4	34.28	120	Batelada	(LIANG et al., 2010)
<i>S. limacinum</i> SR 21	Glicose	Corn steep liquor	40.3	7.8	120	Batelada alimentada	(ROSA et al., 2010)
<i>S. limacinum</i> OUC88	Glicose	Hidrolisado de torta de soja	24.83	5*	120	Batelada	(SONG et al., 2010)
<i>S. limacinum</i> SR 21	Glicerol	Peptona/Extrato de levedura	4.0-15.0	24.86-31.09		Contínua	(ETHIER et al., 2011)
<i>Schizochytrium mangrovei</i> PQ6	Glicose	Extrato de levedura	46.23	59.35	96	Batelada	(HONG; ANH; THU, 2011)
<i>S. limacinum</i> SR 21	Glicerol	Peptona/Extrato de levedura	61.76	20.3*		Batelada alimentada	(HUANG; LU; CHU, 2012a)
<i>Schizochytrium limacinum</i> BR2.1.2	Glicerol	Peptona	48.31	5.34*	120	Batelada	(KAWSAKUL; YONGMANITCHAI; CHONUDOMKUL, 2012)
<i>S. mangrovei</i>	Hidrolisado de Resíduo de Alimentos		20	40.3	144	Batelada	(PLEISSNER et al., 2013)
<i>Schizochytrium</i> sp. CCTCC M209059	Caldo de cana		35.32	37.9	54	Batelada	(REN et al., 2013b)
<i>Schizochytrium</i> sp. M209059	Glicose	Glutamato Monossódico	72.37	18.38*	136	Batelada alimentada	(QU et al., 2013)
<i>Schizochytrium</i> sp. S31	Glicerol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / Extrato de levedura	151.4	28.93*	96	Batelada	(CHANG et al., 2013)
<i>Schizochytrium</i> sp. HX-308	Glicose	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / Glutamato Monossódico	53	12.80*	44	Batelada	(SUN et al., 2014)
<i>S. limacinum</i> SR 21	Glicerol/Glicose	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / Glutamato Monossódico	83.84	32.36*	96	Batelada alimentada	(LI et al., 2015)
<i>S. limacinum</i> OUC88	Hidrolisado de amido de milho	Hidrolisado de farelo de soja	81,84	19,2*	100	Batelada alimentada	(SONG; ZANG; ZHANG, 2015)
<i>S. limacinum</i> SR 21	Glicerol/Glicose		34,40	5,07*	144	Batelada	(PATIL; GOGATE, 2015)

\*Valores Expressados em g/L –  
 FONTE: O AUTOR (2015)

A partir da Tabela 4, pode ser visto que o microrganismo *Schizochytrium limacinum sr 21*, e *Schizochytrium mangrovei PQ6* atingiram quase 60% de DHA, em comparação com o conteúdo total de lipídeos. A maioria dos relatos de *Traustochytriales* usa glicose como fonte de carbono que, mesmo não sendo o insumo mais barato, é de fácil metabolização em comparação com outros carboidratos. Também é interessante notar que o uso de diferentes fontes de carbono, tais como glicerol e outros substratos encontrados em resíduos agroindustriais pode reduzir o custo de produção, isto é, tornar o processo economicamente mais atraente, sem comprometer os níveis de DHA produzido.

Processos em batelada alimentada podem produzir uma quantidade muito maior de biomassa e DHA que processos em batelada e contínuo. Outro ponto importante na Tabela 4 é a possibilidade de utilizar diferentes fontes de nitrogênio (orgânicos e inorgânicos) que facilitam a produção econômica de DHA a partir de *Traustochytriales*.

No que se refere à viabilidade da utilização do *Schizochytrium limacinum sr 21* à produção de DHA, além daquilo que já foi apresentado, pode-se grifar que, segundo Yokoyama e Honda (2007) esta linhagem é capaz de produzir 70% de lipídeos intracelulares em relação ao seu peso seco, sendo que 30-40% desse total é relativo ao DHA. Ademais, outros estudos também têm demonstrado viabilidade parecida, nos quais destaca-se a grande produtividade do *Schizochytrium limacinum sr 21* a partir da utilização de substratos de produção como o glicerol (CHI et al., 2007; PYLE; GARCIA; WEN, 2008), chegando a uma biomassa de 22,1 g/L e concentração de DHA de 4,91 g/L. Nesse sentido, Chi et al. 2009 testaram o controle de oxigênio durante a fermentação de *Schizochytrium limacinum sr 21* e conseguiram observar que os microrganismos por eles cultivados produziram um total de biomassa equivalente ao valor de 39,1 g/L com concentração de DHA de 6,56 g/L. Diferentemente de Chi et al. (2009), Ethier et al. (2011), que utilizou fermentação contínua, conseguiu produzir biomassa na quantidade de 11,78g/L e valor de DHA 1,74g/L.

Em contraste Rosa et al. (2010) e Huang et al. (2012c) , utilizando-se uma fermentação em batelada alimentada, alcançou a melhor produtividade de biomassa e DHA registado até à data com *Schizochytrium limacinum sr 21*; 61,76 g / L de biomassa e 20,3 g / L de DHA, por dia. Enquanto Rosa et al. (2010) obtido 40,3 g / L de biomassa e 7,8 g / L de DHA por dia.

Segundo Li et al. (2015) e Patil e Gogate (2015), a utilização de fontes de carbono mistas tais como glicerol com glicose podem aumentar a produção de biomassa e de DHA. Em experimentos recentes realizados por estes pesquisadores, tais combinações aumentaram a concentração em 15%. Tais misturas de fonte de carbono, apresentam uma estratégia eficaz para aumentar o rendimento dos produtos alvo, e têm sido amplamente utilizados na indústria de fermentação (CHEN et al., 2011).

Outro fator crítico na produção de óleos microbianos é a proporção carbono-nitrogênio (relação C/N) que afeta diretamente o organismo no seu crescimento, o metabolismo e a síntese de DHA. Além disso, Chi et al. (2009) e Qu et al. (2011) indicam que, durante a fermentação de *Schizochytrium limacinum sr 21*, o nível de oxigênio dissolvido no meio de cultura é um fator de grande impacto na produtividade, com um intervalo ótimo de 30-50% de oxigênio dissolvido. Embora esses estudos incluíssem ampla discussão das condições de fermentação, a produtividade DHA em *Schizochytrium limacinum sr 21* pode ser melhorada.

O diagrama de fluxo do processo para a produção de DHA a partir de *Schizochytrium* é ilustrado na Figura 12.

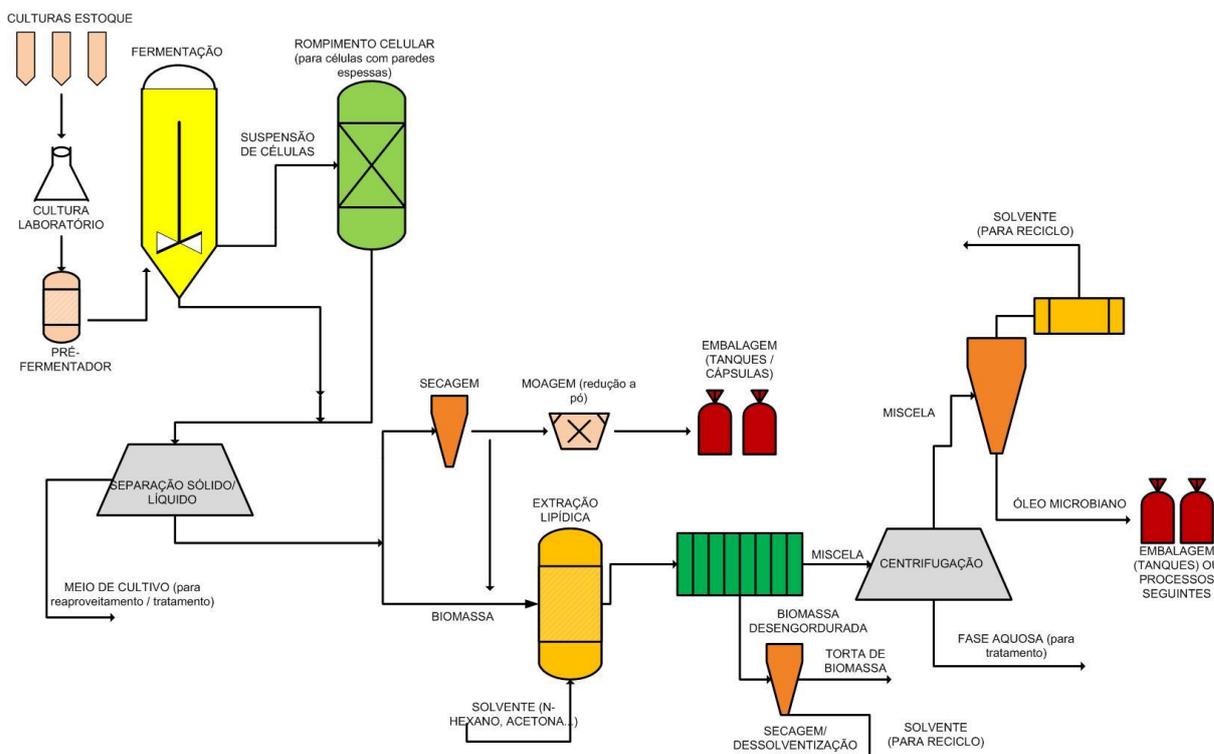


FIGURA 12 PROCESSO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE DHA POR SCHIZOCHYTRIUM SP.  
FONTE: O AUTOR (2014)

O processo de produção industrial de DHA pode ser dividido em quatro passos: Fermentação: fermentação realizada sob condições controladas utilizando diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, nutrientes, vitaminas e minerais; Recuperação de biomassa: Células são concentradas e secas, podem ser transferidas para processo de extração de óleo ou para processos de moagem sendo reduzida a pó. No processo de extração de óleo: óleo extraído da biomassa seca com solvente. Biomassa é separada do óleo por centrifugação ou filtração. Fase solvente cristalizado (Winterização) óleo é extraído; Purificação de óleo: óleo é aquecido e pré-tratado com ácidos, neutralizado e centrifugado para obter o óleo refinado.

Devido à alta produtividade em óleo, é razoável imaginar que, num futuro breve, haverá ampla utilização desses processos com microrganismos para a produção de DHA. O potencial desta tecnologia é comprovado pelo crescimento do número de patentes publicados com o termo "*Schizochytrium*" ao longo dos anos de 2005 e 2014 (Fig.13)

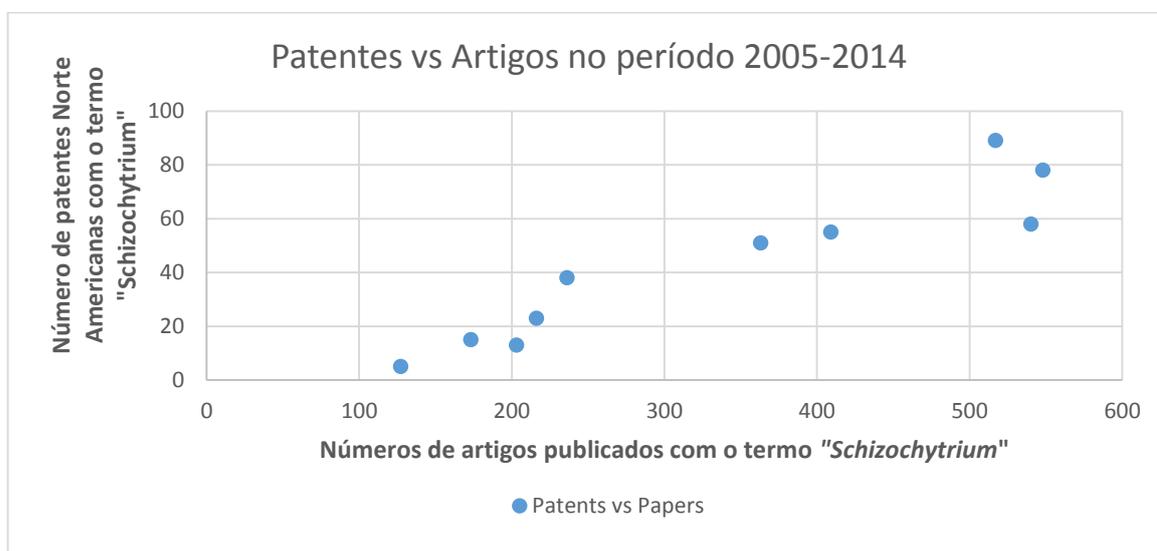


FIGURA 13 PATENTES VS ARTIGOS NO PERÍODO 2005-2014  
 FONTE: O AUTOR (2014)

Observa-se a partir do gráfico (Figura 13), que há interesse crescente em desenvolver (e proteger) tecnologias de produção *Schizochytrium sp.* Desta maneira, ratifica-se a importância de investigações como a que aqui se propõe, bem como, aproveita-se para indicar que é pelos caminhos da inovação que tentar-se-á percorrer a trajetória desta moção.

### 3 METODOLOGIA

Neste capítulo serão apresentadas as metodologias que foram utilizadas para o desenvolvimento desse projeto de pesquisa. Dentre elas, os métodos para análise das condições de cultivo do microrganismo estudado, como os parâmetros de fermentação foram analisados, os procedimentos de determinações analíticas como análise do açúcar residual, medição da biomassa produzida, determinação do teor de lipídeos. Além disso, métodos para caracterização dos lipídeos por cromatografia gasosa.

#### 3.1 MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A linhagem estudada foi *Schizochytrium limacinum* sr 21 - MYA 1381 (figura 13) ou também designado como *Aurantiochytrium limacinum* sr 21 e, adquirido da ATCC (*American Type Culture Colection*). O microrganismo foi mantido em meio sólido composto de: 20 g/L de glicose, 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura e 1,5% de ágar dissolvidos em 50 % da concentração de água do mar artificial. O microrganismo foi inoculado em Placas de Petri, durante 3 dias, e mantidos sob temperatura controlada a 25°C. Após esse procedimento o inóculo era ativado em meio líquido sob uma fermentação a 25°C. Para um bom andamento da pesquisa a cepa foi conservada em freezer a -80°C utilizando como crio preservador o glicerol 20%. Foram repicados sempre que necessário para manutenção dos cultivos e preparo de inóculo.



FIGURA 14 SCHIZOCHYTRIUM LIMACINUM SR 21 - MYA 1381 EM MEIO SÓLIDO  
FONTE: O AUTOR (2014)

### 3.1.1 Comparação de meios de cultivos

A produção de biomassa de *Schizochytrium limacinum* sr 21 foi avaliada utilizando os meios de cultura já pesquisados por vários cientistas (CHI et al., 2007; HUANG; LU; CHU, 2012a; TAHA et al., 2013; YAGUCHI et al., 1997; YOKOCHI et al., 1998) e o intuito foi avaliar a capacidade de produção de biomassa em relação aos dados encontrados pelos autores anteriormente citados.

Os parâmetros da fermentação foram determinados de acordo com as pesquisas acima: tempo de 5 dias, a 25°C de temperatura e agitação de 120 rpm. A taxa de inoculação utilizada foi de 10% (v/v). A fermentação foi realizada em erlenmeyers com capacidade de 250 mL e o volume de fermentação foi de 50mL.

### 3.1.2 Avaliação das fontes de carbono e nitrogênio

Para a seleção das fontes de carbono e nitrogênio que melhor se adequaram àqueles objetivos traçados nessa pesquisa, foi realizado um planejamento experimental com *Schizochytrium limacinum* sr 21 (CHI et al., 2007; YOKOCHI et al., 1998), com fontes de carbono e nitrogênio adequadas à produção de biomassa e lipídeos. As fontes de carbono testadas foram: glicose, glicerol, frutose e galactose. Para o nitrogênio, com base nos trabalhos supracitados foram utilizadas as seguintes fontes: *corn steep liquor*, extrato de levedura, acetato de amônio, nitrato de sódio, glutamato monossódico. O meio de cultura utilizado para produzir biomassa do microrganismo estudado, compôs-se de 3% de fonte de carbono e 1% de fonte de nitrogênio dissolvidos em água do mar a 50% de sua concentração. O planejamento foi realizado conforme a Tabela 5:

TABELA 5 PLANEJAMENTO PARA AVALIAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO E DAS FONTES DE NITROGÊNIO

FONTES DE CARBONO	GLICOSE (3%)	GALACTOSE (3%)	FRUTOSE (3%)	GLICEROL (3%)
<b>FONTES DE NITROGÊNIO</b>				
<b><i>Glutamato Monossódico (1%)</i></b>	Glicose + Glutamato monossódico	Galactose + Glutamato monossódico	Frutose + Glutamato monossódico	Glicerol + Glutamato monossódico
<b><i>Nitrato De Sódio (1%)</i></b>	Glicose + Nitrato de Sódio	Galactose + Nitrato de Sódio	Frutose + Nitrato de Sódio	Glicerol + Nitrato de Sódio
<b><i>Acetato De Amônio (1%)</i></b>	Glicose + Acetato de Amônio	Galactose + Acetato de Amônio	Frutose + Acetato de Amônio	Glicerol + Acetato de Amônio
<b><i>Corn Steep Liquor (1%)</i></b>	Glicose + Corn Steep Liquor	Galactose + Corn Steep Liquor	Frutose + Corn Steep Liquor	Glicerol + Corn Steep Liquor
<b><i>Extrato De Levedura (1%)</i></b>	Glicose + Extrato de Levedura	Galactose + Extrato de Levedura	Frutose + Extrato de Levedura	Glicerol + Extrato de Levedura

### 3.1.3 Avaliação da proporção carbono/nitrogênio

Fundamentando-se em estudos de extração de DHA da biomassa de *Schizochytrium limacinum sr21* foi necessário desenvolver uma investigação no que se refere ao entendimento da razão entre carbono e nitrogênio do meio de cultura a ser utilizado. É evidente, de acordo com Huang, Lu & I. Ming Chu (2012) e Rosa et al. (2010), que há um grande impacto da proporção carbono/nitrogênio no rendimento de biomassa e DHA.

Para tanto foi utilizado um planejamento experimental com diferentes proporções de fonte de carbono e nitrogênio, analisando produção de biomassa e de lipídeos como resposta da otimização. As concentrações de fonte de carbono testadas foram 50, 70, 90, 110 e 130 (g/L) e para as fontes de nitrogênio foram 5, 10, 15 e 20 (g/L). O meio de cultivo utilizado nesse experimento era composto de glicose e extrato de levedura dissolvido em 50% da água do mar (YOKOCHI et al., 1998) e os parâmetros da fermentação foram: 5 dias, exposição a 25°C de temperatura e agitação a 120 rpm.

A fermentação foi realizada em erlenmeyers com capacidade de 250 mL e o volume de fermentação foi de 50mL.

O experimento foi conduzido conforme a Tabela 6:

TABELA 6 PLANEJAMENTO PARA AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS FONTES DE CARBONO E DAS FONTES DE NITROGÊNIO – VALORES DE PROPORÇÃO C/N

Nitrogênio (g/L)	5	10	15	20
Carbono (g/L)	<b>Valores de proporção C/N</b>			
<b>50</b>	10	5	3,33	2,5
<b>70</b>	14	7	4,66	3,5
<b>90</b>	18	9	6	4,5
<b>110</b>	22	11	7,33	5,5
<b>130</b>	26	13	8,66	6,5

### 3.1.4 Avaliação da concentração de sal marinho

Nesta etapa foram selecionadas as concentrações de sal marinho ideais ou compatíveis com a constituição do ambiente marinho. Nesse sentido, buscou-se na literatura (CHIN et al., 2006; ROSA et al., 2010; YOKOCHI et al., 1998) a composição aqui denominada ideal uma vez que ainda segundo a literatura é aquela que permite que o microrganismo *Schizochytrium limacinum sr21* produza maior quantidade de biomassa, lipídeos e DHA.

Para que esta etapa se tornasse completa, um planejamento experimental foi idealizado com vistas ao entendimento do impacto da concentração de sal e suas respectivas concentrações no metabolismo celular do microrganismo estudado. As concentrações testadas foram 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%. Dessa maneira, foi escolhida aquela que atende as expectativas de maior produção de biomassa e lipídeos, assim como tem-se idealizado nesta proposta de investigação. O meio de cultivo utilizado nesse experimento era composto de glicose e extrato de levedura dissolvido em água do mar (YOKOCHI et al., 1998) e os parâmetros da fermentação foram: 5 dias, exposição a 25°C de temperatura e agitação a 120 rpm.

### 3.2 ESTUDO DA TAXA DE INOCULAÇÃO

Foi realizado estudo da concentração do inóculo na taxa de inoculação com intuito de avaliar a diferença na produção de biomassa e no teor de lipídeos ao final da fermentação. Para isso foram construídas curvas de crescimento do microrganismo *Schizochytrium limacinum sr 21* variando-se a concentração da taxa de inoculação em 4,8 g/L; 0,48 g/L e 0,24 g/L. Esse experimento foi conduzido em shaker e os parâmetros da fermentação foram: 5 dias, exposição a 25°C de temperatura e agitação a 120 rpm.

### 3.3 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

Os parâmetros como pH, temperatura e agitação podem afetar significativamente o rendimento de uma fermentação (ROSA et al., 2010). É muito importante que essas condições sejam conhecidas para estabelecer um protocolo para a produção efetiva de DHA e também para posteriores transferências de tecnologias.

Assim sendo, as condições foram testadas com base nos melhores resultados indicados por pesquisas recentes, considerando sempre os fatores que apresentaram maior impacto sobre a fermentação e principalmente sobre o rendimento de biomassa, lipídeos e DHA.

Os valores de pH testados foram 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0. O meio de cultivo utilizado nesse experimento era composto de: 90g/L de glicose e 20g/L de *Corn Steep Liquor* dissolvido em 50% da água do mar (YOKOCHI et al., 1998) e os parâmetros da fermentação foram: 5 dias, exposição a 25°C de temperatura e agitação a 120 rpm.

As temperaturas foram 23°C, 25°C, 28°C e 30°C, o meio de cultivo utilizado nesse experimento era composto de glicose e extrato de levedura dissolvido em 50% da água do mar (YOKOCHI et al., 1998) e os parâmetros da fermentação foram: 5 dias, exposição a 25°C de temperatura e agitação a 120 rpm.

### 3.4 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA *Schizochitrium limacinum* sr 21

Conforme as melhores condições de cultivo e melhores condições de fermentação pré-determinadas nos itens anteriores foram realizados três delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR) com 3 fatores, 3 níveis e 3 repetições do ponto central. Foram avaliados três meios de cultivos distintos a fim de verificar a interação entre as variáveis: concentração da fonte de carbono, da fonte de nitrogênio e sal marinho. Além disso, foram estudadas a diferença na produção de biomassa e no teor de lipídeos ao final das fermentações.

Os meios de cultivo utilizado nesses experimentos foram:

- Meio 1 - Glicerol + Nitrato De Sódio
- Meio 2 - Glicose/Galactose + Nitrato De Sódio
- Meio 3 - Frutose + Nitrato De Sódio

O delineamento obedeceu a matriz de dados apresentada na Tabela 7, constando de 9 ensaios, 6 ensaios nos pontos axiais e mais 3 ensaios nas condições de ponto central, totalizando 36 ensaios. Nele foram utilizados pontos fatoriais (+1 e -1), pontos axiais (+1,68 e -1,68) e pontos centrais (0). O ponto central foi repetido 3 vezes para estimar o erro experimental.

TABELA 7 MATRIZ DE DADOS CODIFICADOS DO PLANEJAMENTO DCCR

ENSAIO	FONTE DE CARBONO	FONTE DE NITROGÊNIO	CONCENTRAÇÃO DE SAL
1	-1,00000	-1,00000	-1,00000
2	-1,00000	-1,00000	0,00000
3	-1,00000	-1,00000	1,00000
4	-1,00000	0,00000	-1,00000
5	-1,00000	0,00000	0,00000
6	-1,00000	0,00000	1,00000
7	-1,00000	1,00000	-1,00000
8	-1,00000	1,00000	0,00000
9	-1,00000	1,00000	1,00000
10	0,00000	-1,00000	-1,00000
11	0,00000	-1,00000	0,00000
12	0,00000	-1,00000	1,00000
13	0,00000	0,00000	-1,00000
14	0,00000	0,00000	0,00000
15	0,00000	0,00000	1,00000
16	0,00000	1,00000	-1,00000
17	0,00000	1,00000	0,00000
18	0,00000	1,00000	1,00000
19	1,00000	-1,00000	-1,00000
20	1,00000	-1,00000	0,00000
21	1,00000	-1,00000	1,00000
22	1,00000	0,00000	-1,00000
23	1,00000	0,00000	0,00000
24	1,00000	0,00000	1,00000
25	1,00000	1,00000	-1,00000
26	1,00000	1,00000	0,00000
27	1,00000	1,00000	1,00000
28	0,00000	0,00000	0,00000
29	0,00000	0,00000	0,00000
30	0,00000	0,00000	0,00000
31	-1,68179	0,00000	0,00000
32	1,68179	0,00000	0,00000
33	0,00000	-1,68179	0,00000
34	0,00000	1,68179	0,00000
35	0,00000	0,00000	-1,68179
36	0,00000	0,00000	1,68179

A tabela 8 apresenta os níveis utilizados no planejamento DCCR para os meios 1, 2 e 3.

TABELA 8 NÍVEIS AVALIADOS NO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) – MEIOS 1,2 E 3

VARIÁVEIS	NÍVEIS				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Fontes de carbono (g/L)	76,40	90	110	130	143,64
Fontes de nitrogênio (g/L)	3,35	5,4	8,4	11,4	13,44
Concentração de sal (g/L)	16,22	21	28	35	39,77

### 3.5 ESTUDO DA PRODUTIVIDADE EM BIORREATOR

Conforme as melhores condições de cultivo e melhores condições de fermentação pré-determinadas nos itens anteriores foi realizado o escalonamento da fermentação para biorreator escala de bancada. Foram realizados testes cinéticos em um volume de 5 litros de fermentação. Com intuito de avaliar a melhor condição de agitação e de concentração de inóculo quatro biorreatores foram testados, sendo que as velocidades de agitação testadas foram de 150 rpm e 300 rpm. Os parâmetros da fermentação foram: 5 dias, exposição a 28°C de temperatura com pH 5.

### 3.6 AVALIAÇÃO ECONÔMICA

Ao final de todos os testes em escala laboratorial foi realizada uma avaliação econômica a fim de validar a viabilidade dessa pesquisa.

### 3.7 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

#### 3.7.1 *Biomassa seca*

A determinação da biomassa seca foi realizada através de método gravimétrico, retirando-se amostras periódicas e com intervalo de tempo pré-determinado. O fermentado foi filtrado em membrana de 3,0 µm de porosidade e depois seco em estufa a temperatura de 80°C até peso constante.

#### 3.7.2 *Determinação do açúcar residual*

Os açúcares redutores foram determinados pela reação com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). O extrato foi diluído de modo a se obter concentração de glicose inferior a 1 g/L. Uma mistura contendo 0,1 mL do extrato diluído e 0,1 mL do reativo DNS foi preparada, homogeneizada e mantida por 5 minutos em banho de ebulição. Após resfriar a temperatura ambiente, 0,5 mL de água destilada foram adicionados à mistura, homogeneizados e a medida da absorbância foi realizada a 540 nm. A concentração de açúcares redutores (g/L) foi obtida através

de curva padrão obtida empregando-se concentração conhecida de açúcar redutor padrão. A mistura de reativo DNS e água destilada foi utilizada como controle analítico.

### 3.7.3 Determinação do glicerol residual

A determinação do glicerol residual foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Antes da injeção as amostras foram filtradas (Milipore 0,2µm). O equipamento de cromatografia foi um HPLC Shimadzu equipado com uma coluna (Bio-Rad) Aminex® HPX-87H x 7,8mm e um detector de índice de refração 300 (RID-10A). A coluna foi mantida a 60 ° C e uma solução de 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,6 mL/min foi usada como fase móvel. Todos os produtos químicos utilizados eram de grau analítico.

### 3.7.4 Determinação do teor de lipídios

A extração de óleo foi realizada pelo método de (BLIGH; DYER, 1959) modificado. Foram pesadas 0,5 g de biomassa seca e adicionados 4 mL de clorofórmio, 2 mL de metanol e 1,6 mL água destilada; a agitação foi realizada em shaker por 30 minutos e, depois foram adicionados 2 mL de clorofórmio e mais 2mL de sulfato de sódio 1,5% e agitados em shaker por 2 minutos; a separação em camadas foi feita por centrifugação a 5000 rpm por 2 minutos; Depois foi retirada uma alíquota de 5 mL da camada inferior e esta foi colocada em recipiente previamente tarado e exposto a temperatura de 80°C por 24 horas para evaporar os solventes; depois de resfriar em dessecador por 15 minutos; as amostras foram pesadas e a determinação da porcentagem de lipídios pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Lipídios} = (m_{\text{final}} \times 1,2 / m_{\text{inicial}}) \times 100$$

Onde:  $m_{\text{final}} = (m_{\text{FinalTubo}} - m_{\text{InicialTubo}})$

### 3.7.5 Caracterização dos ácidos graxos

A caracterização de ácidos graxos foi realizada segundo a metodologia descrita por Johnson e Wen (2009). A transesterificação foi realizada diretamente com a

biomassa seca. Foram pesadas 1 g de biomassa seca e esta foi colocada em um tubo de ensaio, onde foram misturados com 3,4mL de metanol e 0,6mL de ácido sulfúrico. Foram adicionados 4,0mL de clorofórmio e a mistura foi aquecida a 90°C durante 40 minutos, durante o aquecimento as amostras foram bem agitadas. Depois da reação completada, os tubos foram arrefecidos à temperatura ambiente. Em seguida, 2 ml de água destilada foram adicionados ao tubo e misturado por 45 segundos. Duas fases distintas se formaram nos tubos e para acelerar o processo de separação de fases foram centrifugados.

A composição dos ésteres metílicos foi analisada através de cromatografia gasosa (CG). A camada de solvente contendo o éster metílico foi analisada em cromatógrafo Shimadzu 2010 (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD) que foi equipado com um dispositivo detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar RTX-WAX (100m X 0,25 mm ID, 0,20µm film). Como gás de arraste foi usado o gás Hidrogênio (20cm/sec), os ácidos graxos foram identificados usando um gradiente de 140°C a 240°C (4°C/min), permanecendo 40 minutos nessa temperatura. A temperatura da camada injetora e do detector foi de 260°C. Os ácidos graxos foram calculados pelas áreas de pico relativo à área de pico da mistura padrão de trinta e sete ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma Aldrich Chemical Co.) complementados com uma mistura padrão “n-3 PUFA” (Supelco, Inc). Os resultados foram expressos em % do total de ácidos graxos presentes.

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados dos planejamentos experimentais foram feitos usando o Software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

## 4 RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no presente trabalho. Neste contexto, são apresentadas as curvas de crescimento do microrganismo estudado, além das análises de condições de cultivo e avaliações de parâmetros de fermentação.

### 4.1 AVALIAÇÕES DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO *Schizochitrium limacinum* sr 21

#### 4.1.1 Curva de crescimento do inóculo

As condições de cultivo do inóculo do microrganismo foram testadas com intuito de estudar o valor da concentração celular máxima. A Figura 15 apresenta a curva de crescimento de *Schizochitrium limacinum* sr 21 em meio líquido, bem como o a concentração de substrato ao longo do processo fermentativo.

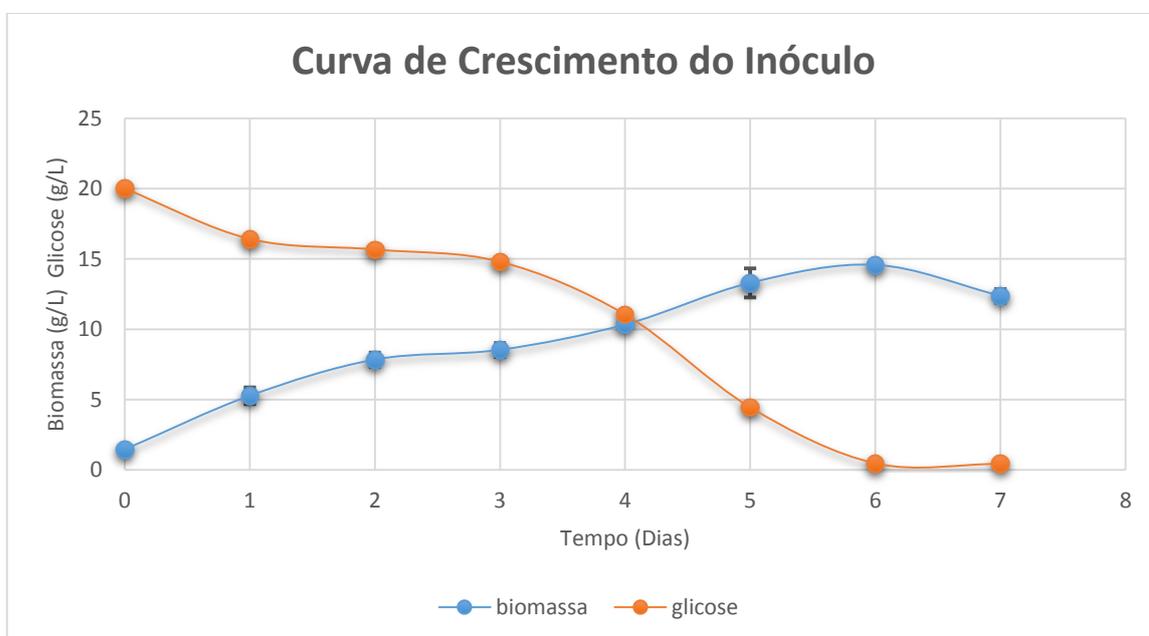


FIGURA 15 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO DE SCHIZOCHITRIUM LIMACINUM LIMACINUM SR 21  
 FONTE: O AUTOR (2015)

Na Figura 15, pode-se observar que o microrganismo consumiu todo o substrato, atingindo uma produção máxima de biomassa de 14,57 g/L em 144 horas de fermentação, que foi feita em *shaker* a 120 rpm de agitação, com pH inicial igual a

6,0. Além disso, fica visível que após 144 horas de fermentação o microrganismo entra em sua fase estacionária seguindo rapidamente para um leve declínio de biomassa, coincidindo com o período de exaustão do substrato. Esse experimento inicial, aliado às referências de literatura, permitiu definir os tempos de cultivo em 5-6 dias, para os experimentos posteriores de desenvolvimento de meio.

#### 4.1.2 Estudo dos meios de cultivo

O estudo dos meios de cultura já citados por outras pesquisas (CHI et al., 2007; HUANG; LU; CHU, 2012b; TAHA et al., 2013; YAGUCHI et al., [s.d.]; YOKOCHI et al., 1998) para produção de biomassa de *Schizochytrium limacinum sr 21* foram testados com objetivo de validar os dados encontrados por esses autores. A Tabela 9 informa os resultados encontrados nessa validação dos resultados encontrados da literatura.

TABELA 9 COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

REFERÊNCIAS	BIOMASSA SECA (g/L)	BIOMASSA SECA (g/L)
	REFERÊNCIAS	REPETIÇÃO NESSE ESTUDO
<b>YOKOCHI et al. (2003) –</b> <b>1</b>	43,800	6,433 ± 0,400
<b>YOKOCHI et al. (2003) –</b> <b>2</b>	49,170	9,107 ± 0,210
<b>YOKOCHI et al. (2003) –</b> <b>3</b>	59,200	13,007 ± 0,615
<b>YOKOCHI et al. (1998)</b>	36,000	19,427 ± 0,672
<b>CHI et al. (2009)</b>	37,900	7,618 ± 1,028
<b>YAGUCHI et al. (1997)</b>	48,100	10,560 ± 0,555
<b>TAHA et al. (2013)</b>	25,000	11,013 ± 0,303
<b>HUANG et al. (2012)</b>	10,800	12,860 ± 0,487

De acordo com a Tabela 9, fica evidente que as quantidades de biomassa produzidas nesse estudo ficaram muito aquém dos resultados encontrados por estudos anteriores (CHI et al., 2007; HUANG; LU; CHU, 2012b; TAHA et al., 2013; YAGUCHI et al., [s.d.]; YOKOCHI et al., 1998). Porém, quando comparado com o trabalho de (HUANG; LU; CHU, 2012b), este experimento superou a produção de biomassa em um valor de 2 g/L.

Apesar de avaliadas nas mesmas condições das pesquisas supracitadas, as fermentações testadas para validação dos dados da literatura não atingiram os mesmos resultados, então levantou-se uma hipótese de que a taxa de inoculação poderia ser um fator primordial para que resultados expressivos em produtividade de biomassa fossem alcançados. Assim, esse estudo foi a motivação para que o estudo da taxa de inoculação fosse abordado.

#### 4.1.3 Estudo da taxa de inoculação

A diferença na produção de biomassa apresentada em relação aos dados da literatura levou a realização de um estudo da concentração da taxa de inoculação com objetivo de avaliar sua influência durante o processo de produção de biomassa pelo microrganismo *Schizochytrium limacinum* sr 21. Nesse estudo a fermentação foi conduzida em *shaker* com agitação de 120 rpm e, as curvas de crescimento apresentadas na Figura 16 foram construídas variando-se a concentração da taxa de inoculação em 4,8 g/L; 0,48 g/L e 0,24 g/L.

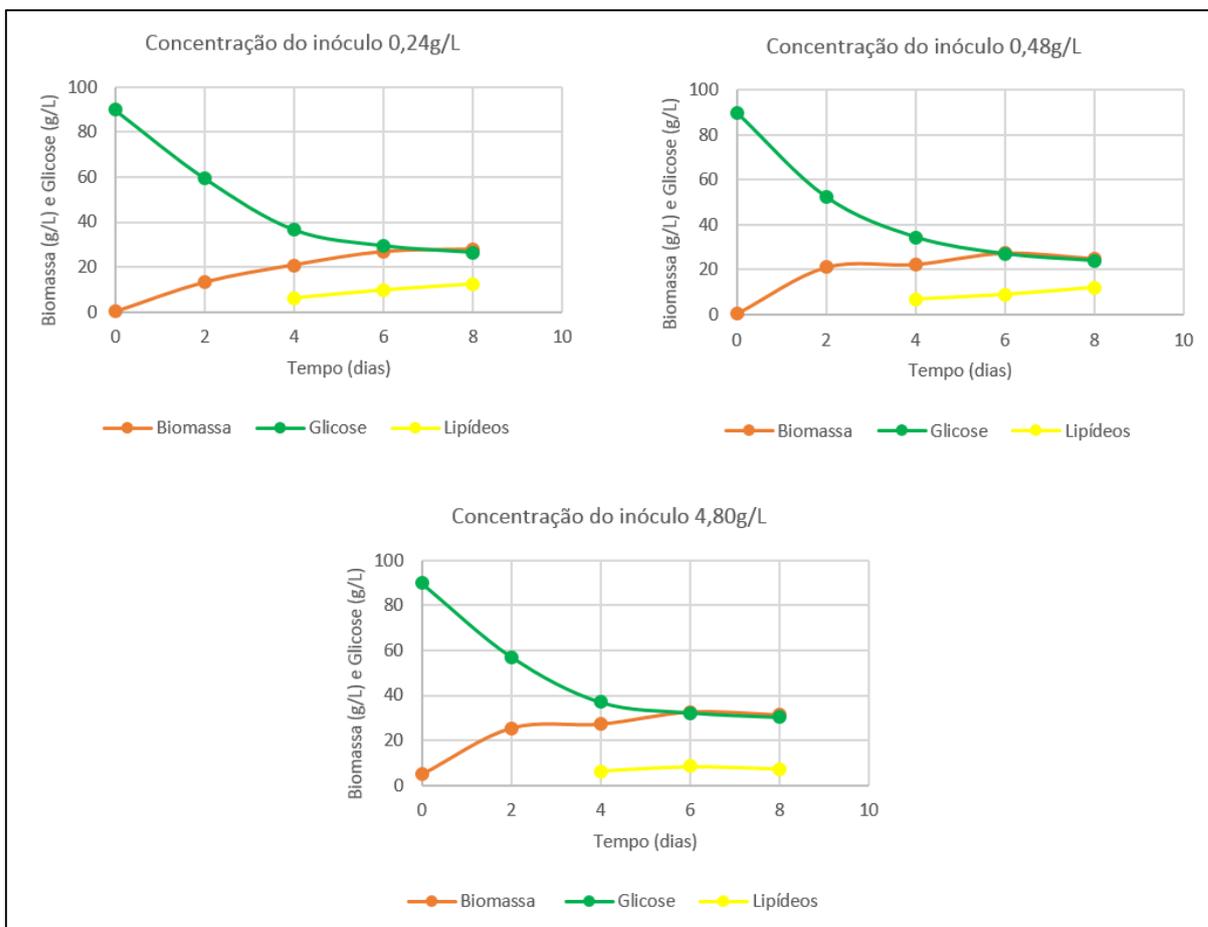


FIGURA 16 ESTUDO DA TAXA DE NOCULAÇÃO EM FERMENTADORES COM AGITAÇÃO  
 FONTE: O AUTOR (2015)

Avaliando a Figura 16, observa-se que a taxa de inoculação não influenciou de forma significativa a produção de biomassa durante a fermentação. Fato este que fica comprovado quando se analisa a produção de biomassa por dia em cada uma das fermentações. Na fermentação em que o inóculo inicial apresentava uma concentração de 4,8 g/L, a produtividade de biomassa alcançada foi de 3,31 g/L /dia, enquanto que nas fermentações que possuíam como inóculo inicial 0,48 g/L e 0,24 g/L, produziram 3,08 g/L e 3,44 g/L de biomassa por dia. Se calcularmos o rendimento das fermentações realizadas com agitação, fica claro que não houve uma diferença significativa que indique o uso de inóculo concentrado para obter maior produtividade, dentro das faixas estudadas e em agitador orbital tipo *shaker*. Ao utilizar a taxa de inoculação mais alta, 4,8g/L, o rendimento da fermentação foi de 44 % enquanto que as fermentações de inóculos 0,48 g/L e 0,24 g/L atingiram 37% e 43% de rendimento respectivamente. Essa modesta influência da taxa de inoculação pode ter sido efeito de limitantes mais importantes, como a transferência de oxigênio no processo. Em

ensaios em biorreator, feitos após otimização de composição de meio de cultivo, a avaliação da concentração de inóculo é retomada.

Quanto ao consumo de substrato realizado pelo microrganismo durante a fermentação, fica evidente que a agitação durante o processo fermentativo é essencial, o *Schizochitrium limacinum sr 21*, consumiu em média 70% do substrato disponível, restando uma parcela considerável a ser consumida. Assim, foi necessário investigar mais a fundo a interação da taxa de inoculação com a agitação durante esse processo fermentativo, para que o rendimento fosse máximo possível.

A produção de lipídeos também foi avaliada durante o processo fermentativo com agitação conforme apresentado na Figura 16. Nessa análise foi observado que o microrganismo produziu uma média de 40% de lipídeos em relação à sua massa seca.

De acordo com gráfico da evolução da produtividade de lipídeos na Figura 16, a taxa de inoculação mais alta tem uma influência negativa sobre a produção de lipídeos. O rendimento da produção de lipídeos foi mais alto quanto a taxa de inoculação foi menor, na fermentação em que o valor da taxa de inoculação foi de 0,24 g/L o rendimento foi de 19%, enquanto que nas fermentações com taxa de inoculação de 0,48 g/L e 4,8 g/L foi alcançado um rendimento de 17% e 10%, respectivamente.

Nesse contexto, vale ressaltar que não foi possível comparação a dados de literatura pois não há registros deste tipo de avaliação.

#### 4.1.4 Estudo das fontes de carbono e nitrogênio

As fontes de carbono e nitrogênio foram avaliadas para que a produção de biomassa e lipídeos fosse maximizada. A Tabela 11 apresenta um panorama da quantidade elementar de cada fonte utilizada neste estudo. Essas quantidades de 3% de fonte de carbono e 1% de fonte de nitrogênio dissolvidos em água do mar a 50% de sua concentração, foram indicados por (YOKOCHI; HONDA; HIGASHIHARA, 1998), como sendo componentes de um meio considerado ótimo ao crescimento de *Schizochytrium limacinum sr 21*.

A avaliação para eleger o melhor substrato para o processo fermentativo de *Schizochitrium limacinum sr 21*, foi executada conforme a tabela 10:

TABELA 10 AVALIAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

<b>Fonte de Carbono + Fonte de Nitrogênio</b>	<b>Carbono (g/L)</b>	<b>Nitrogênio (g/L)</b>	<b>Razão C/N elementar</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>	<b>Lipídeos (g/L)</b>
<b>Glicose + Glutamato Monossódico</b>	15,54	0,83	18,72	9,45	1,04
<b>Glicose + Nitrato de Sódio</b>	11,99	1,65	7,27	14,75	4,73
<b>Glicose + Acetato de Amônio</b>	15,10	1,82	8,30	7,25	0,63
<b>Glicose + Corn Steep Liquor</b>	12,65	5,15	2,46	13,55	4,59
<b>Glicose + Extrato de Levedura</b>	15,99	1,10	14,54	14,00	2,57
<b>Galactose + Glutamato Monossódico</b>	15,54	0,83	18,72	16,90	6,94
<b>Galactose + Nitrato de Sódio</b>	11,99	1,65	7,27	14,55	6,23
<b>Galactose + Acetato de Amônio</b>	15,10	1,82	8,30	9,85	0,82
<b>Galactose + Corn Steep Liquor</b>	12,65	5,15	2,46	17,50	5,48
<b>Galactose + Extrato de Levedura</b>	15,99	1,10	14,54	16,45	3,48
<b>Frutose + Glutamato Monossódico</b>	15,54	0,83	18,72	12,60	2,49
<b>Frutose + Nitrato de Sódio</b>	11,99	1,65	7,27	15,40	5,44
<b>Frutose + Acetato de Amônio</b>	15,10	1,82	8,30	6,75	0,81
<b>Frutose + Corn Steep Liquor</b>	12,65	5,15	2,46	15,55	6,22
<b>Frutose + Extrato de Levedura</b>	15,99	1,10	14,54	12,30	2,16
<b>Glicerol + Glutamato Monossódico</b>	15,28	0,83	18,41	13,70	3,39
<b>Glicerol + Nitrato de Sódio</b>	11,73	1,65	7,11	15,35	5,94
<b>Glicerol + Acetato de Amônio</b>	14,84	1,82	8,15	8,15	1,42
<b>Glicerol + Corn Steep Liquor</b>	12,39	5,15	2,41	12,90	5,76
<b>Glicerol + Extrato de Levedura</b>	15,73	1,10	14,30	11,60	2,37

As fontes de carbono e nitrogênio tem concentrações de 30 e 10g/l respectivamente, mas a tabela mostra o carbono e o nitrogênio elementares – daí os valores fracionados.

Em relação a Tabela 10, observa-se que todas as fontes de carbono têm potencial para uma boa produtividade de biomassa destacando-se a galactose por ter atingido uma produtividade média de 3 g/L por dia. Quanto às fontes de nitrogênio, o nitrato de sódio foi revelado como uma excelente alternativa de substrato para o crescimento do microrganismo por ter alcançado uma média de 3,5 g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> de produtividade em biomassa. Nesse contexto, para produzir uma maior quantidade de biomassa a combinação de galactose e corn steep liquor seria ideal pois alcançou um

valor de 17,5 g/L. No entanto, para atingir a maior concentração de lipídeos na biomassa, a combinação de glicerol e corn steep liquor é a mais indicada, devido ao fato de possibilitar a produção de 5,76 g/L de lipídeos.

De forma a esclarecer melhor a influência do substrato na produção de biomassa e lipídeos pelo *Schizochitrium limacinum* sr 21, foi realizada análise de variância com posterior teste de Tukey conforme ilustrado nas Figuras 18 e 19.

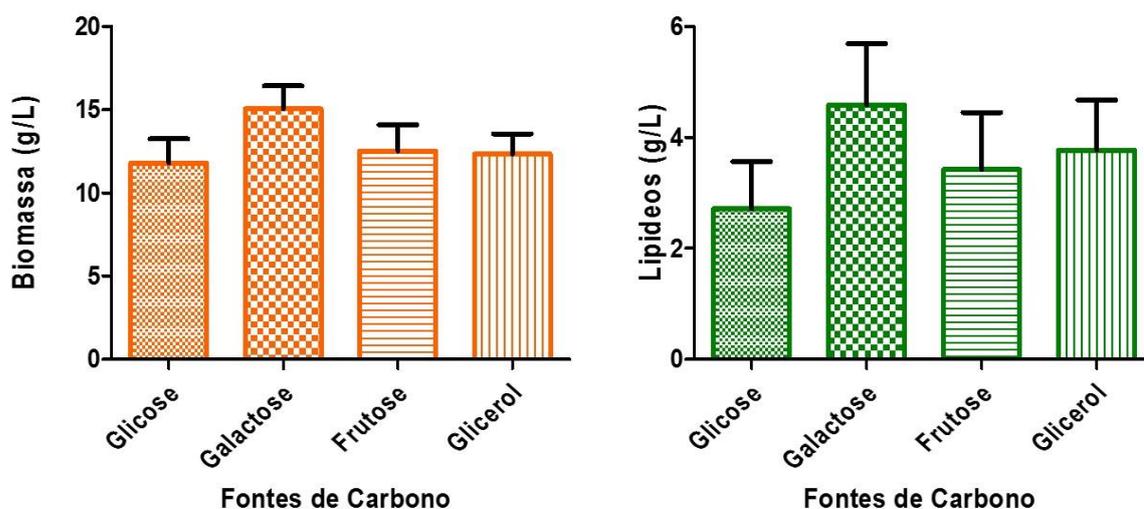


FIGURA 17 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS FONTES DE CARBONO  
 FONTE: O AUTOR (2015)

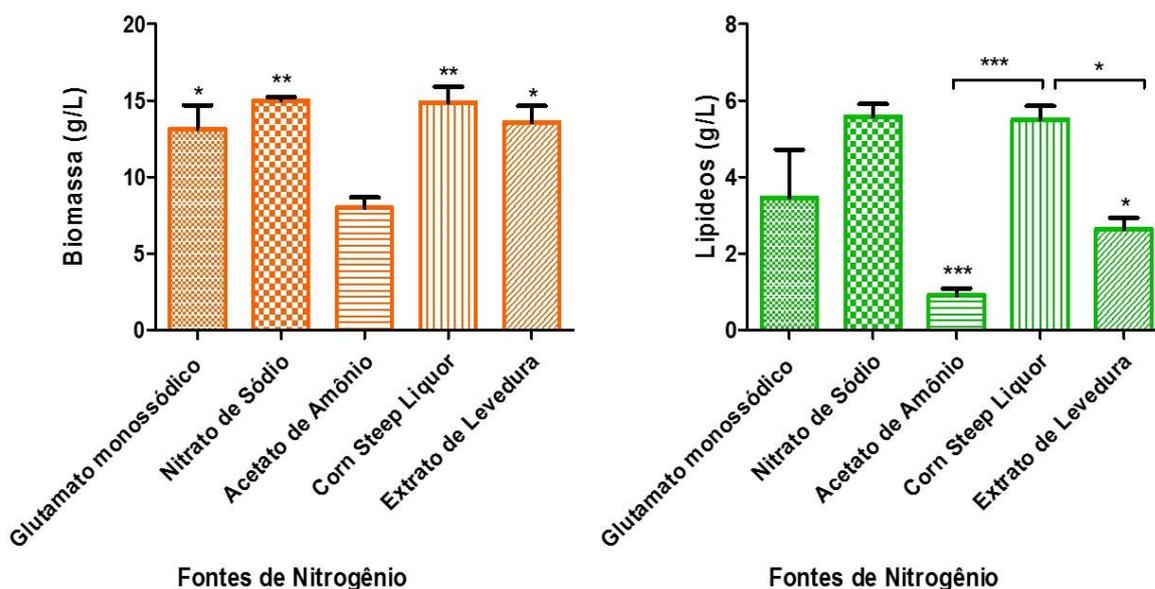


FIGURA 18 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS FONTES DE NITROGÊNIO  
 FONTE: O AUTOR (2015)

Observando-se a Figura 17, fica claro que não há diferença significativa entre as fontes de carbono no que se refere a produção de biomassa e lipídeos por *S.limacinum*. A galactose e o glicerol são fontes de carbono excelentes para a produção de lipídeos pelo microrganismo em estudo. Ao analisar a composição elementar das fontes de carbono avaliadas, a quantidade de carbono disponível para o processo fermentativo é praticamente igual. Nesse contexto, os resultados alcançados em produção de biomassa e lipídeos com as fontes de carbono utilizadas nessa pesquisa são semelhantes aos de Yokochi et al. (1998) e Chi et al. (2007). Quanto às fontes de nitrogênio (Figura 18), houve diferença significativa entre as fontes no que se refere a produção de biomassa e lipídeos. Em relação à produção de biomassa o acetato de amônio difere das demais fontes. Já para lipídeos o nitrato de sódio difere significativamente do acetato de amônio e do extrato de levedura e o *Corn Steep Liquor* difere do acetato de amônio e do extrato de levedura. A análise da composição elementar apresentou uma diferença significativa na quantidade de nitrogênio total disponível em cada uma das fontes testadas. Baseando-se nessa análise é possível ressaltar que em relação à produção de lipídeos, nitrato de sódio e o glutamato monossódico destacaram-se. No que se refere a produção de biomassa, as fontes com melhor desempenho foram o glutamato monossódico e o extrato de levedura.

#### 4.1.5 Estudo da proporção carbono/nitrogênio

A proporção carbono/nitrogênio tem importante influência no rendimento de biomassa e DHA. Então fez-se necessário uma investigação dessa razão para que o objetivo da pesquisa fosse alcançado. A Tabela 11 representa os resultados obtidos nessa avaliação, utilizando como fonte de carbono a glicose e como fonte de nitrogênio o extrato de levedura.

TABELA 11 AVALIAÇÃO DA RAZÃO C/N

Fonte de Carbono (g/L)	Fonte de Nitrogênio (g/L)	Razão C/N	Razão C/N Elementar (g/g)	Biomassa (g/L)	Lipídeos (g/L)
50	20	2,5	12,7	18,300 ± 0,849	2,368
50	15	3,3	15,7	18,550 ± 0,495	3,707
70	20	3,5	16,4	20,700 ± 0,849	2,376
90	20	4,5	20	23,550 ± 3,323	2,969
70	15	4,7	20,6	23,150 ± 1,626	3,893
50	10	5	21,8	17,100 ± 0,141	3,904
110	20	5,5	23,6	26,050 ± 0,919	3,141
90	15	6	25,4	23,250 ± 1,626	3,336
130	20	6,5	27,3	30,050 ± 1,202	2,537
70	10	7	29,1	18,300 ± 0,849	3,694
110	15	7,3	30,3	21,250 ± 0,071	2,715
130	15	8,7	35,1	26,100 ± 1,414	3,173
90	10	9	36,3	24,000 ± 0,849	4,607
50	5	10	40	14,700 ± 1,414	5,103
110	10	11	43,6	23,650 ± 1,344	4,132
130	10	13	50,9	25,150 ± 0,495	4,336
70	5	14	54,5	18,150 ± 0,212	5,349
90	5	18	69	22,550 ± 1,485	4,935
110	5	22	83,6	24,700 ± 0,141	6,422
130	5	26	98,1	22,500 ± 2,546	4,862

Baseado na Tabela 11 fica claro que essa proporção influencia diretamente a produtividade de biomassa do microrganismo. No que se refere a quantidade de fonte de carbono e nitrogênio, ou seja, a razão C/N elementar levada em consideração nenhuma tendência é diagnosticada (Figura 19).

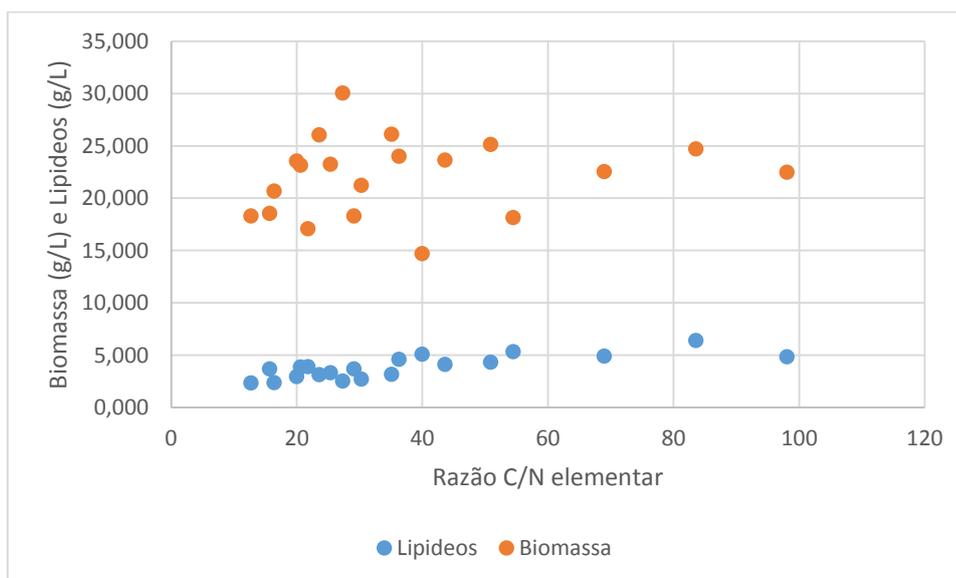


FIGURA 19 AVALIAÇÃO DA RAZÃO C/N ELEMENTAR  
 FONTE: O AUTOR (2015)

Nesse sentido, há forte correlação positiva entre a relação C:N e a concentração de lipídios. Quanto a produção alcançada de 30 g/L de biomassa, ou 6 g/L/dia, pode ser considerada um resultado satisfatório quando comparado aos trabalhos de (HUANG; LU; CHU, 2012a; YOKOCHI et al., 1998).

#### 4.1.6 Estudo da concentração de sal marinho.

O estudo da concentração de sal marinho no meio cultivo faz-se necessária devido ao *Schizochitrium limacinum sr 21* ser um microrganismo proveniente de mangues, onde essas concentrações de sais são extremamente variáveis. O gráfico ilustrado na Figura 20 apresenta a influência da concentração de sal na produção de biomassa e de lipídeos do microrganismo estudado.

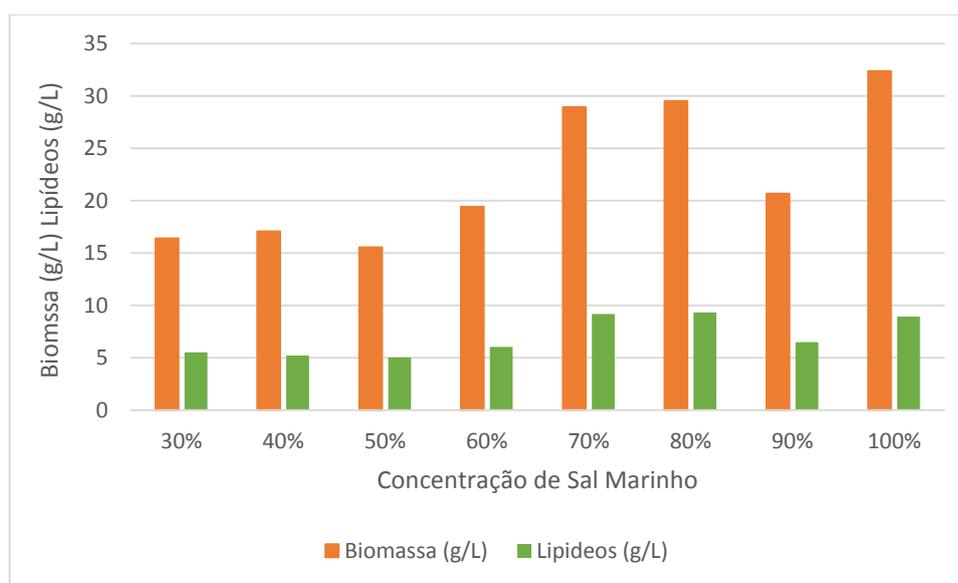


FIGURA 20 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SAL MARINHO  
 FONTE: O AUTOR (2015)

Analisando a Figura 20, a tendência de que quanto mais sal maior a produção de biomassa e lipídeos é muito clara. Os pontos 70%, 80 % e 100% contradizem a afirmação de (YOKOCHI et al., 1998) de que a produtividade de biomassa de *Schizochitrium limacinum sr 21* é praticamente igual em uma variação de concentração de sal de 50% até 200%. A biomassa encontrada na presente pesquisa foi de 32,40 g/L em uma concentração de 100% de sal, o que supera em 50% a biomassa encontrada por (YOKOCHI et al., 1998) na mesma concentração de sal. Os resultados encontrados por (ROSA et al., 2010) são semelhantes ao alcançados no

presente estudo. Quanto à concentração de lipídeos, essa manteve-se estável. Sendo assim, a porcentagem de sal escolhida para os próximos experimentos foi de 80%.

## 4.2 ESTUDO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO

### 4.2.1 Estudo da temperatura

A avaliação da temperatura durante o processo fermentativo do *Schizochitrium limacinum sr 21* é um importante parâmetro para o crescimento celular e para a produção de lipídeos. A Figura 21 representa os resultados do experimento de avaliação da temperatura.

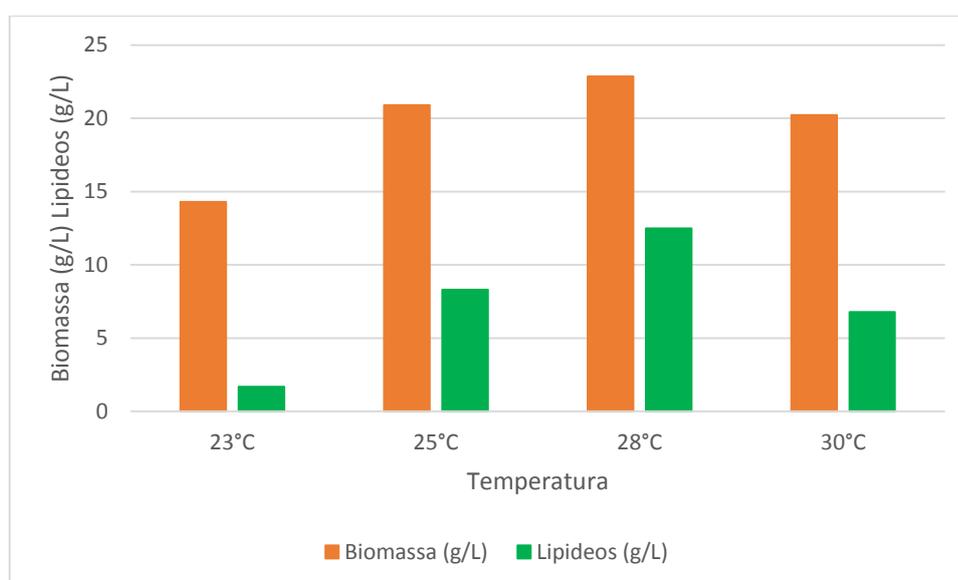


FIGURA 21 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA  
FONTE: O AUTOR (2015)

Pela Figura 21 observa-se que em relação a produção de biomassa há diferença relevante entre as temperaturas de 23°C e 30°C. No que se refere a produção de lipídeos é evidente que a temperatura de 28°C é mais favorável, chegando a um valor de 12,48 g/L de lipídeos em relação a biomassa seca. Os resultados encontrados corroboram o que é descrito na literatura (HUANG; LU; CHU, 2012a; ROSA et al., 2010; YOKOCHI et al., 1998)

#### 4.2.2 Estudo do pH

O estudo do pH durante o processo fermentativo faz-se necessário para que a produtividade de biomassa e lipídeos seja máxima. Desta maneira, a Figura 22 ilustra a tendência de produção conforme a mudança de pH.

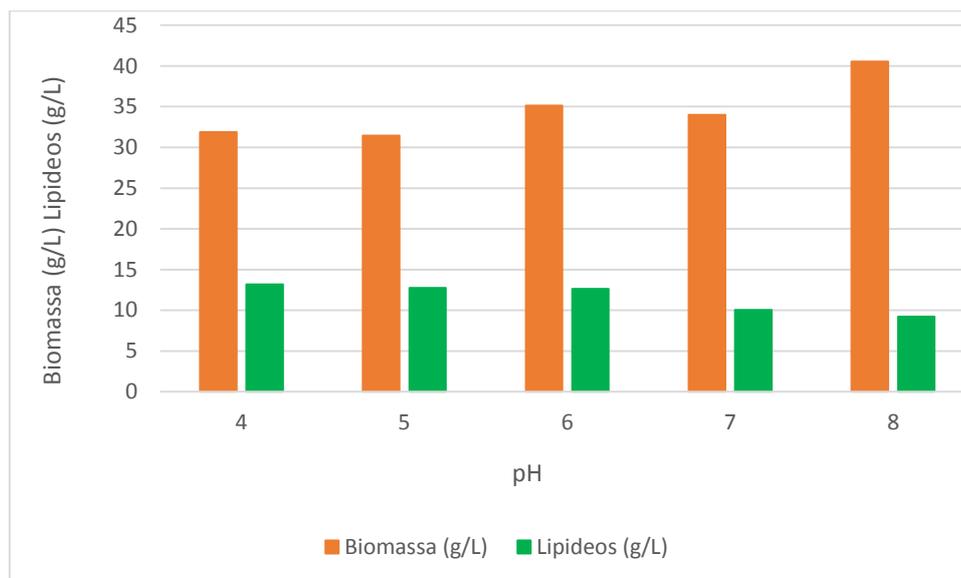


FIGURA 22 AVALIAÇÃO DE pH  
 FONTE: O AUTOR (2015)

Conforme apresentado na Figura 22, a produção de biomassa tem um leve crescimento com o aumento do pH, sendo que no pH 8 foi alcançado um valor de biomassa de 40,53 g/L. Em contrapartida, a produtividade de lipídeos diminui com o aumento do pH, observa-se na Figura 22 que em pH 4 foi atingida a maior produção de lipídeos 13,18 g/L em relação a biomassa seca. Nesse contexto, verifica-se que o controle de pH essencial para manter a alta produtividade de lipídios no processo fermentativo de *Schizochitrium limacinum sr 21*.

#### 4.3 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA *SCHIZOCHITRIUM LIMACINUM SR 21*

A etapa de otimização do meio de cultivo para o processo fermentativo do *Schizochitrium limacinum sr 21*, feita através de planejamentos experimentais do tipo DCCR, permitiu definir as concentrações ótimas dos componentes selecionados para

três meios distintos, os quais foram: Meio 1 Glicerol + Nitrato De Sódio; Meio 2 - Glicose/Galactose + Nitrato De Sódio; Meio 3 - Frutose + Nitrato De Sódio. Os resultados do planejamento experimental DCCR do meio de cultivo Meio 1 - Glicerol + Nitrato De Sódio para a cepa *Schizochitrium limacinum sr 21* estão apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE LIPÍDEOS DO PLANEJAMENTO DCCR MEIO 1 - GLICEROL + NITRATO DE SÓDIO

ENSAIOS	FONTE DE CARBONO (G/L)	FONTE DE NITROGÊNIO (G/L)	CONCENTRAÇÃO DE SAL MARINHO (G/L)	BIOMASSA (G/L)	LIPÍDEOS (G/L)
1	90,00	5,40	21,00	23,36	9,49
2	90,00	5,40	28,00	25,01	11,00
3	90,00	5,40	35,00	23,77	9,77
4	90,00	8,40	21,00	24,81	10,91
5	90,00	8,40	28,00	25,66	11,29
6	90,00	8,40	35,00	25,01	11,00
7	90,00	11,40	21,00	23,83	9,78
8	90,00	11,40	28,00	25,22	11,21
9	90,00	11,40	35,00	26,01	12,22
10	110,00	5,40	21,00	26,30	12,58
11	110,00	5,40	28,00	27,14	13,12
12	110,00	5,40	35,00	26,69	12,75
13	110,00	8,40	21,00	27,88	13,44
14	110,00	8,40	28,00	28,54	14,30
15	110,00	8,40	35,00	28,12	13,91
16	110,00	11,40	21,00	27,23	13,10
17	110,00	11,40	28,00	27,36	13,23
18	110,00	11,40	35,00	26,18	12,34
19	130,00	5,40	21,00	25,11	11,66
20	130,00	5,40	28,00	26,48	12,62
21	130,00	5,40	35,00	25,06	11,52
22	130,00	8,40	21,00	26,41	12,61
23	130,00	8,40	28,00	27,72	13,38
24	130,00	8,40	35,00	26,32	12,48
25	130,00	11,40	21,00	25,57	11,82
26	130,00	11,40	28,00	26,62	12,55
27	130,00	11,40	35,00	25,96	11,93
28	110,00	8,40	28,00	28,55	14,26
29	110,00	8,40	28,00	28,48	14,25
30	110,00	8,40	28,00	28,39	14,14
31	76,40	8,40	28,00	22,36	9,96
32	143,64	8,40	28,00	25,54	11,74
33	110,00	3,35	28,00	25,31	11,56
34	110,00	13,44	28,00	25,78	11,66
35	110,00	8,40	16,22	25,34	11,52
36	110,00	8,40	39,77	25,67	11,80

Ao analisar a tabela 12 podemos afirmar que o melhor resultado de produção para biomassa seca foi obtido quando o microrganismo *Schizochitrium limacinum sr 21* foi submetido as condições do ponto central nesse experimento glicerol 110 g/L,

nitrito de sódio 8,4 g/L e sal marinho 28 g/L, a produção média foi de 28,54 g/L. Em relação a produção de lipídeos a melhor condição de cultivo também ocorreu no ensaio 14 (ponto central), atingindo um valor de 14,30 g/L de lipídeos. Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, indicando uma boa repetibilidade do processo.

A Tabela 13 apresenta a análise das interações entre as variáveis estudadas em relação a produção de biomassa.

TABELA 13 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 1 - GLICEROL + NITRATO DE SÓDIO (BIOMASSA)

Fator	Soma Dos Quadrados	Graus De Liberdade	Médias Quadradas	Razão F	Razão p
Fonte de carbono (g/L) (L)	13,59968	1	13,59968	74,6305	0,000000
Fonte de carbono (g/L) (Q)	46,44450	1	46,44450	254,8719	0,000000
Fonte de Nitrogênio (g/L) (L)	1,43738	1	1,43738	7,8879	0,009319
Fonte de Nitrogênio (g/L) (Q)	17,71335	1	17,71335	97,2050	0,000000
Concentração de Sal Marinho (g/L) (L)	0,42399	1	0,42399	2,3267	0,139245
Concentração de Sal Marinho (g/L) (Q)	16,95285	1	16,95285	93,0316	0,000000
1L por 2L	0,16803	1	0,16803	0,9221	0,345767
1L por 3L	0,53763	1	0,53763	2,9504	0,097749
2L por 3L	0,04941	1	0,04941	0,2711	0,606977

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); L = interação linear; Q = interação quadrática.  $R^2$  = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta;  $R^2 = 0,939$ .

A tabela 13 da ANOVA do Meio de Cultivo 1 e o Diagrama de Pareto (Figura 23) apresentam as avaliações do experimento em relação a produção de biomassa, no qual as interações quadráticas do glicerol, do nitrato de sódio e do sal marinho e as interações lineares do glicerol e do nitrato de sódio apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) nas condições avaliadas. As superfícies de resposta geradas em relação ao experimento comprovam as afirmações em relação a produção de biomassa (Figuras 24, 25 e 26).

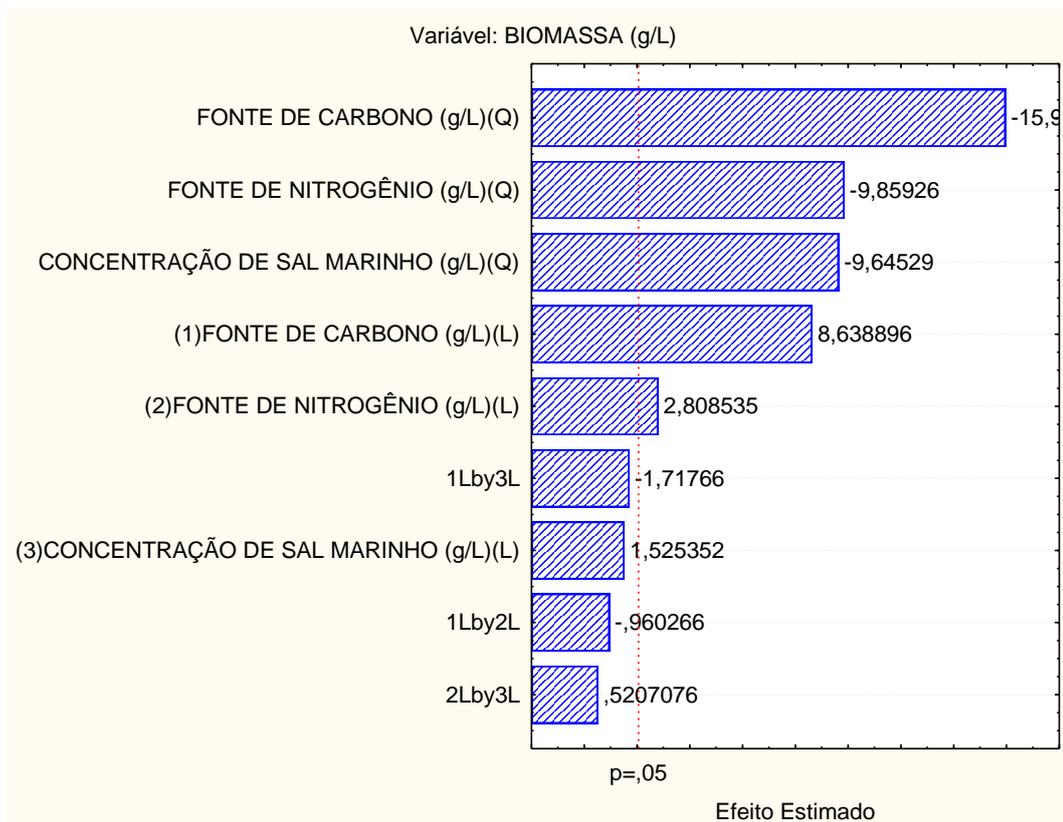


FIGURA 23 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 1.

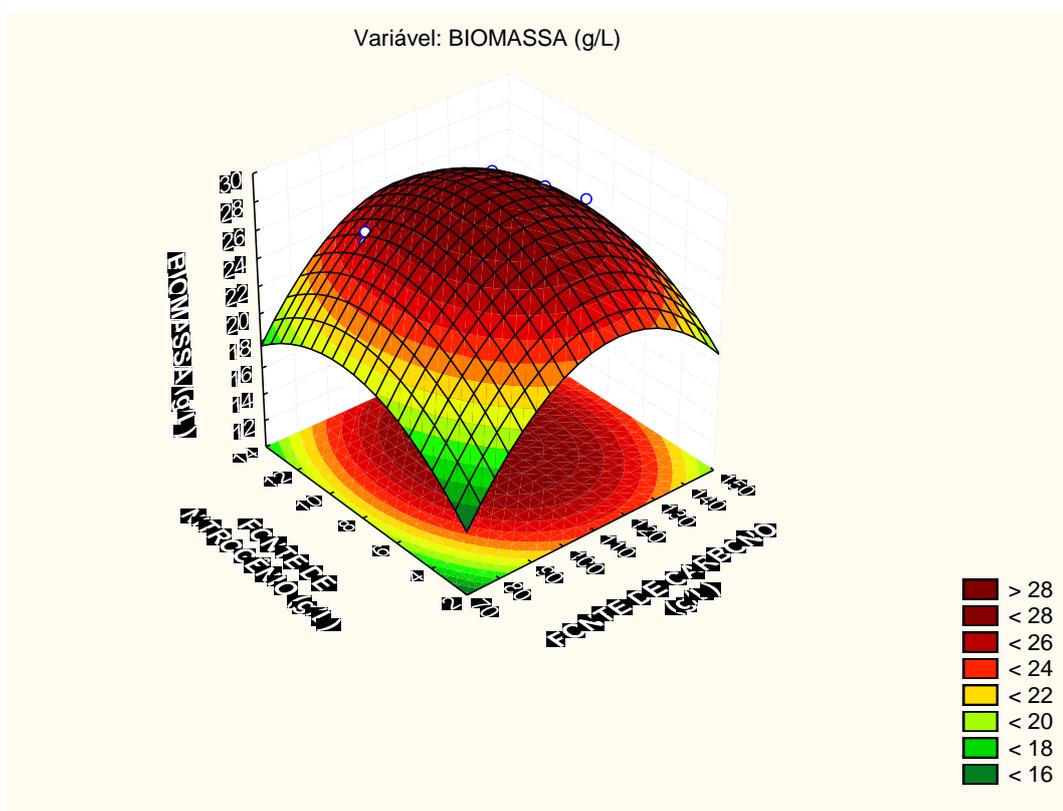


FIGURA 24 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (GLICEROL E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0.

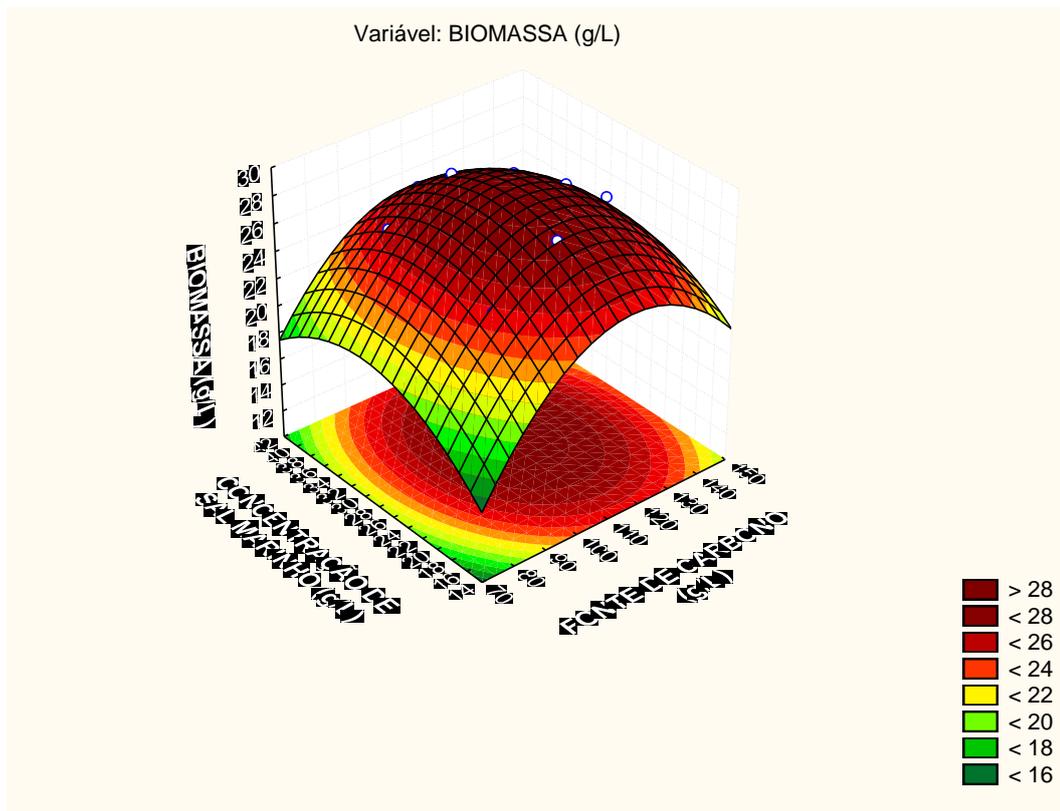


FIGURA 25 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (GLICEROL E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0

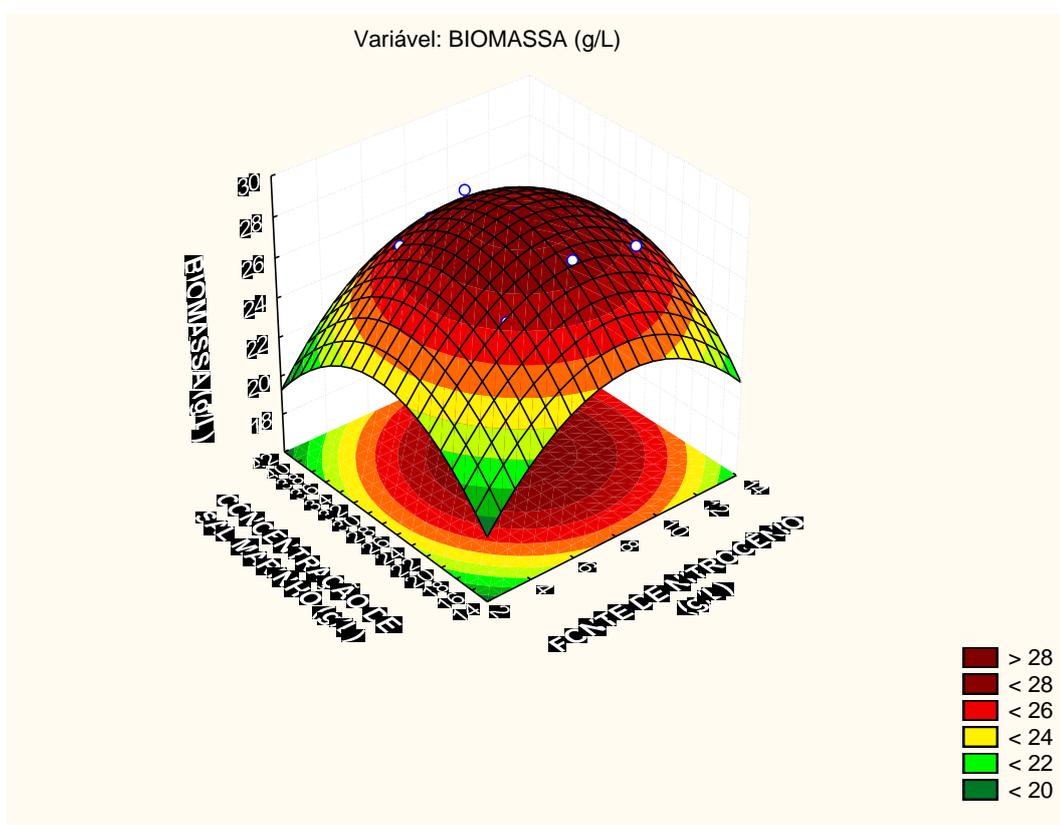


FIGURA 26 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (SAL MARINHO E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL GLICEROL MANTIDA NO NÍVEL 0.

O modelo matemático gerado que representa a produção de biomassa (g/L) em condições otimizadas é dado pela equação abaixo:

$$\text{Biomassa (g/L)} = - 26,69 + 0,82 \times [\text{glicerol}] - 3,60 \cdot 10^{-3} \times [\text{glicerol}]^2 + 1,55 \times [\text{nitrato de sódio}] - 0,08 \times [\text{nitrato de sódio}]^2 + 1,00 \cdot 10^{-4} \times [\text{sal marinho}]^2$$

A partir das superfícies de resposta e do modelo, pode-se verificar que os níveis das variáveis avaliadas proporcionaram a identificação da região ótima para produção de biomassa de *Schizochitrium limacinum sr 21*, sendo: glicerol 114,41 g/L, nitrato de sódio 8,72 g/L e sal marinho 28,32 g/L, que proporcionaria uma produção de biomassa de 27,45 g/L.

A Tabela 14 apresenta a análise das interações entre as variáveis estudadas em relação a produção de lipídeos.

TABELA 14 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 1 - GLICEROL + NITRATO DE SÓDIO (LIPÍDEOS)

Fator	Soma Dos Quadrados	Gráus De Liberdade	Médias Quadradas	Razão F	Razão p
Fonte de carbono (g/L) (L)	12,08754	1	12,08754	59,0374	0,000000
Fonte de carbono (g/L) (Q)	30,01287	1	30,01287	146,5876	0,000000
Fonte de Nitrogênio (g/L) (L)	0,61731	1	0,61731	3,0150	0,094333
Fonte de Nitrogênio (g/L) (Q)	13,40327	1	13,40327	65,4637	0,000000
Concentração de Sal Marinho (g/L) (L)	0,37894	1	0,37894	1,8508	0,185369
Concentração de Sal Marinho (g/L) (Q)	12,20442	1	12,20442	59,6083	0,000000
1L por 2L	0,50021	1	0,50021	2,4431	0,130134
1L por 3L	0,73507	1	0,73507	3,5902	0,069293
2L por 3L	0,18253	1	0,18253	0,8915	0,353758

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); L = interação linear; Q = interação quadrática. R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta; R<sup>2</sup> = 0,909

A tabela 14 da ANOVA do Meio de Cultivo 1 e o Diagrama de Pareto (Figura 27) apresentam as avaliações do experimento em relação a produção de lipídeos, no

qual as interações quadráticas do glicerol, do nitrato de sódio e do sal marinho e a interação linear do glicerol apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) nas condições avaliadas. As superfícies de resposta geradas em relação ao experimento comprovam as afirmações em relação a produção de lipídeos (Figuras 28, 29 e 30).

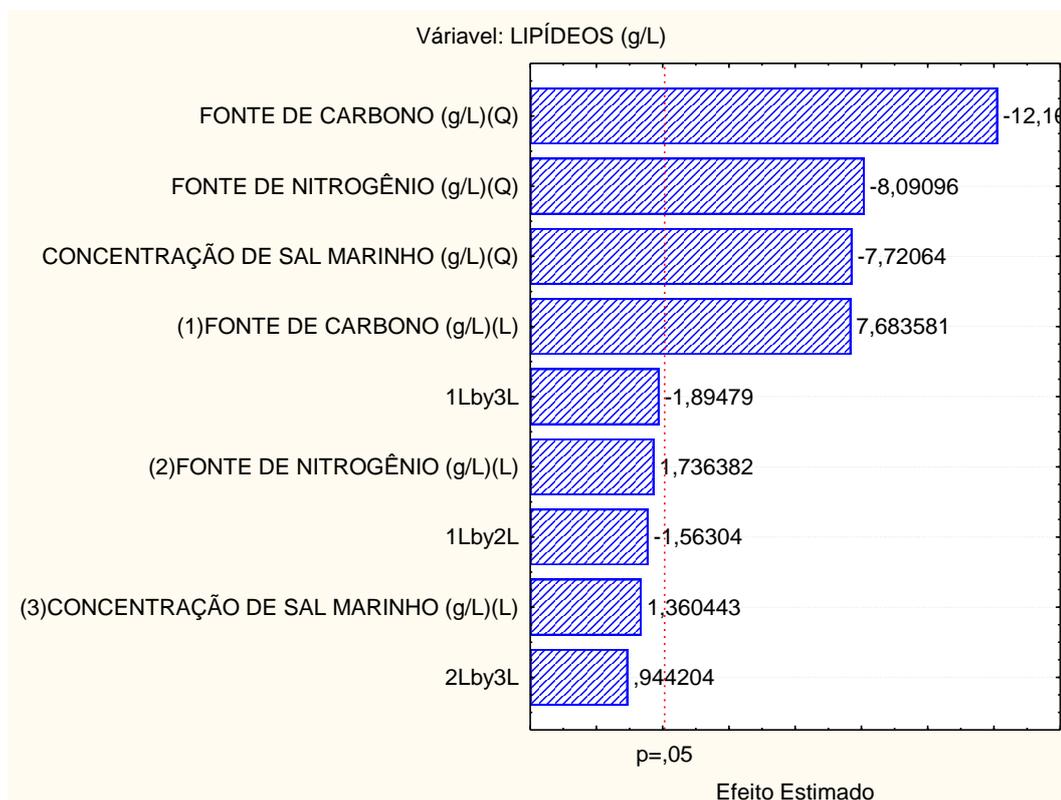


FIGURA 27 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 1

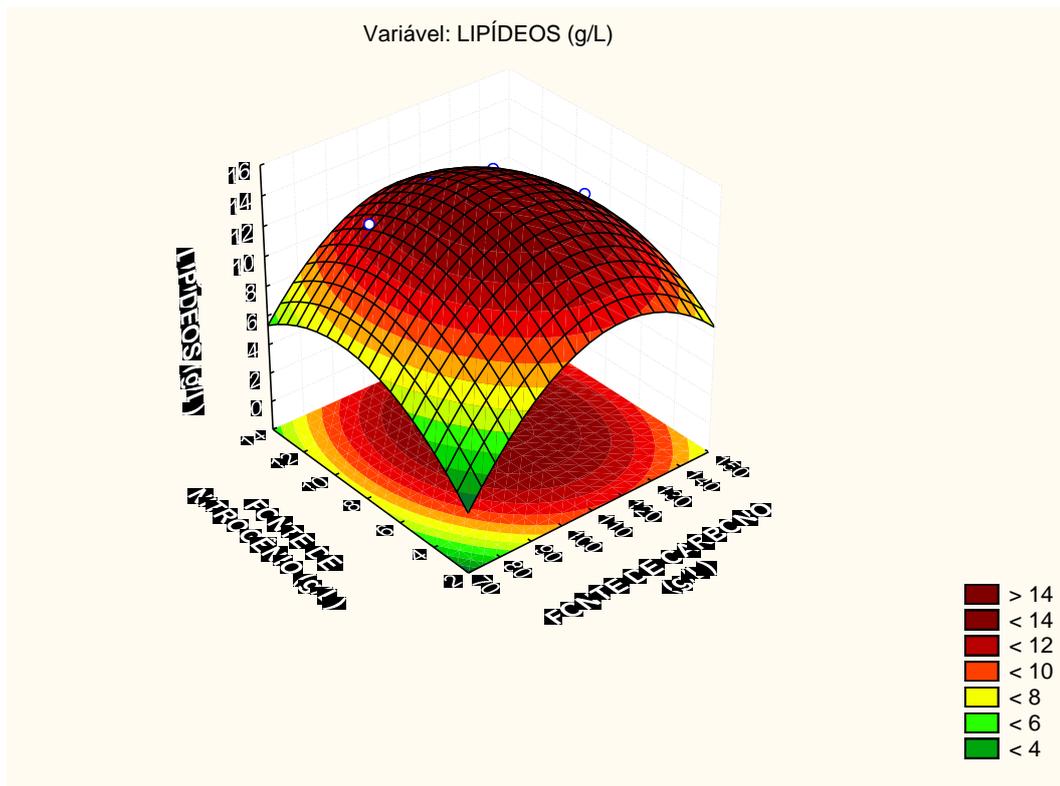


FIGURA 28 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (GLICEROL E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0.

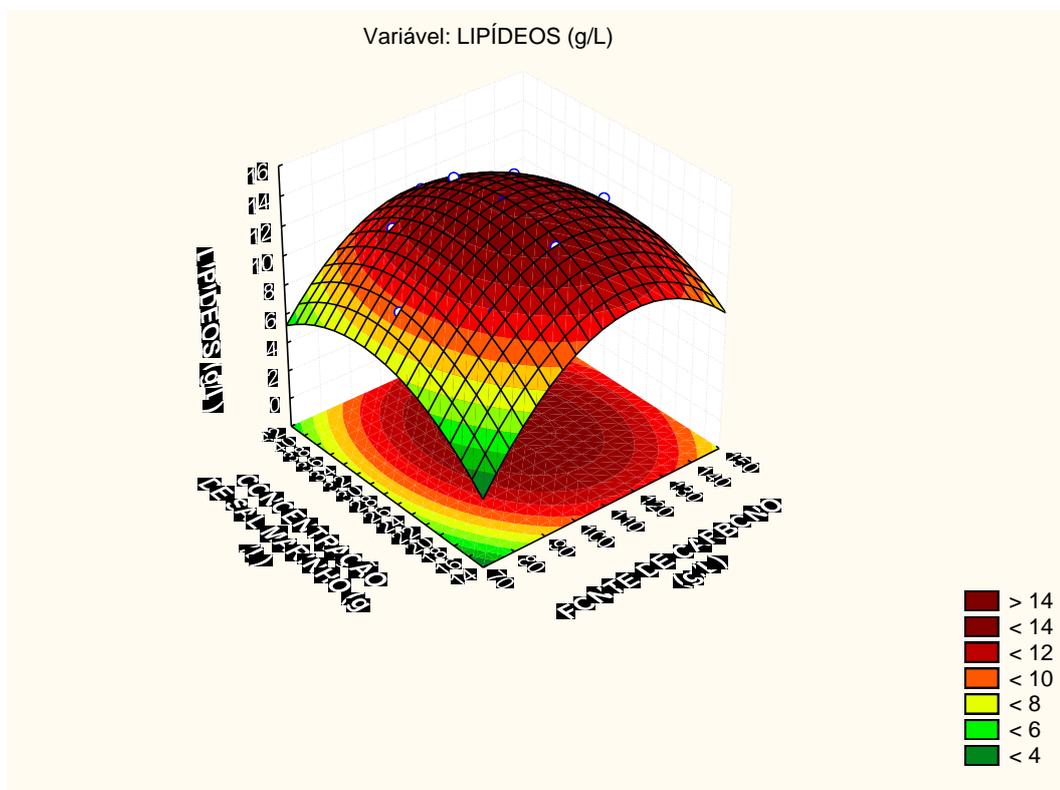


FIGURA 29 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (GLICEROL E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0.

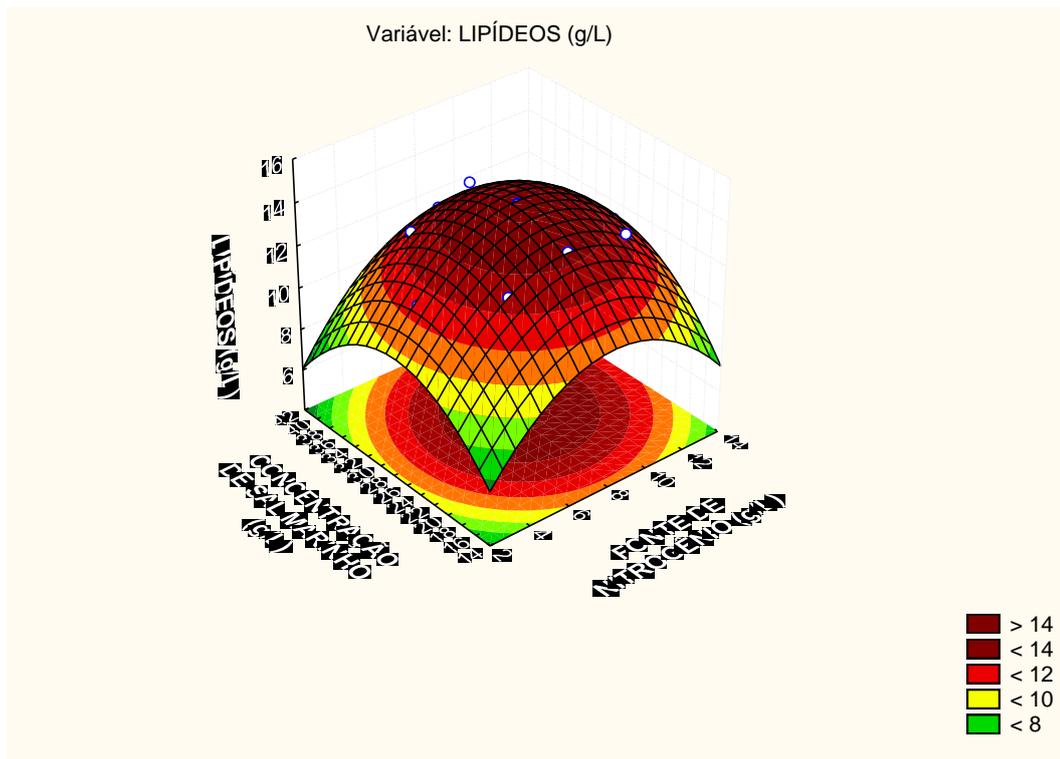


FIGURA 30 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 1. DCCR (SAL MARINHO E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL GLICEROL MANTIDA NO NÍVEL 0.

O modelo matemático gerado que representa a produção de lipídeos (g/L) em condições otimizadas é dado pela equação abaixo:

$$\text{Lipídeos (g/L)} = - 21,59 + 0,58 \times [\text{glicerol}] - 2,50 \cdot 10^{-3} \times [\text{glicerol}]^2 + 1,40 \cdot 10^{-3} \times [\text{nitrato de sódio}]^2 + 2,00 \cdot 10^{-4} \times [\text{sal marinho}]^2$$

De acordo com as superfícies de resposta, verificou-se que os níveis das variáveis avaliadas proporcionaram a identificação da região ótima para produção de lipídeos de *Schizochitrium limacinum sr 21*, sendo: glicerol 115,16 g/L, nitrato de sódio 8,59 g/L e sal marinho 28,28 g/L, que proporcionaria uma produção de lipídeos de 12,31 g/L. Esse ponto ótimo coincide com aquele encontrado para a produção de biomassa, o que é explicado pelo fato de que o teor de lipídios da biomassa tem forte correlação com a concentração de biomassa, variando de 40% a 50% para concentrações baixas e altas, respectivamente. Isso mostra como é importante conhecer condições adequadas para reprodução celular (aumento de biomassa), e aponta para a possibilidade de aumentar o teor lipídico de populações já desenvolvidas, em processos fed-batch.

Os resultados do planejamento experimental DCCR para o meio de cultivo Meio 2 - Glicose/Galactose + Nitrato De Sódio para a cepa *Schizochitrium limacinum sr 21* estão apresentados na Tabela 15.

TABELA 15 RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE LIPÍDEOS DO PLANEJAMENTO DCCR MEIO 2 - GLICOSE/GALACTOSE + NITRATO DE SÓDIO

ENSAIOS	FONTE DE CARBONO (G/L)	FONTE DE NITROGÊNIO (G/L)	CONCENTRAÇÃO DE SAL MARINHO (G/L)	BIOMASSA (G/L)	LIPÍDEOS (G/L)
1	90,00	5,40	21,00	21,22	8,81
2	90,00	5,40	28,00	22,05	9,62
3	90,00	5,40	35,00	21,58	9,04
4	90,00	8,40	21,00	22,25	9,44
5	90,00	8,40	28,00	24,57	10,71
6	90,00	8,40	35,00	23,10	10,02
7	90,00	11,40	21,00	22,31	9,39
8	90,00	11,40	28,00	23,54	10,30
9	90,00	11,40	35,00	24,14	10,68
10	110,00	5,40	21,00	24,21	10,89
11	110,00	5,40	28,00	25,36	11,61
12	110,00	5,40	35,00	24,74	11,07
13	110,00	8,40	21,00	25,33	11,71
14	110,00	8,40	28,00	26,34	12,52
15	110,00	8,40	35,00	26,78	12,62
16	110,00	11,40	21,00	25,26	11,55
17	110,00	11,40	28,00	25,47	11,72
18	110,00	11,40	35,00	24,68	11,05
19	130,00	5,40	21,00	23,28	10,20
20	130,00	5,40	28,00	24,65	11,04
21	130,00	5,40	35,00	23,16	10,04
22	130,00	8,40	21,00	24,39	10,97
23	130,00	8,40	28,00	25,45	11,75
24	130,00	8,40	35,00	24,27	10,79
25	130,00	11,40	21,00	23,48	10,30
26	130,00	11,40	28,00	24,78	10,96
27	130,00	11,40	35,00	23,84	10,47
28	110,00	8,40	28,00	26,57	12,43
29	110,00	8,40	28,00	26,87	12,60
30	110,00	8,40	28,00	26,31	12,27
31	76,40	8,40	28,00	22,45	8,87
32	143,64	8,40	28,00	24,11	10,58
33	110,00	3,35	28,00	23,10	10,09
34	110,00	13,44	28,00	24,25	10,66
35	110,00	8,40	16,22	23,69	10,30
36	110,00	8,40	39,77	24,49	10,70

Na tabela 15 fica evidente que o melhor resultado de produção de biomassa seca foi obtido quando o microrganismo *Schizochitrium limacinum sr 21* foi submetido as condições do ponto central nesse experimento glicose/galactose 110 g/L, nitrato de sódio 8,4 g/L e sal marinho 28 g/L, a produção média foi de 26,87 g/L. Em relação a produção de lipídeos a melhor condição de cultivo também ocorreu no ensaio 29 (ponto central), atingindo um valor de 12,60 g/L de lipídeos. Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, indicando uma boa repetibilidade do processo.

A Tabela 16 apresenta a análise das interações entre as variáveis estudadas em relação a produção de biomassa.

TABELA 16 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 2 - GLICOSE/GALACTOSE + NITRATO DE SÓDIO (BIOMASSA)

Fator	Soma Dos Quadrados	Graus De Liberdade	Médias Quadradas	Razão F	Razão p
Fonte de carbono (g/L) (L)	9,96018	1	9,96018	34,4504	0,000003
Fonte de carbono (g/L) (Q)	34,69920	1	34,69920	120,0180	0,000000
Fonte de Nitrogênio (g/L) (L)	3,54913	1	3,54913	12,2758	0,001680
Fonte de Nitrogênio (g/L) (Q)	19,47088	1	19,47088	67,3461	0,000000
Concentração de Sal Marinho (g/L) (L)	1,47008	1	1,47008	5,0847	0,032784
Concentração de Sal Marinho (g/L) (Q)	15,41087	1	15,41087	53,3033	0,000000
1L por 2L	1,42141	1	1,42141	4,9164	0,035553
1L por 3L	0,71053	1	0,71053	2,4576	0,129049
2L por 3L	0,05880	1	0,05880	0,2034	0,655747

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); L = interação linear; Q = interação quadrática.  $R^2$  = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta;  $R^2$  = 0,897.

A tabela 16 da ANOVA do Meio de Cultivo 2 e o Diagrama de Pareto (Figura 31) apresentam as avaliações do experimento em relação a produção de biomassa, no qual as interações quadráticas e as interações lineares da glicose/galactose, do nitrato de sódio e do sal marinho apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) nas condições avaliadas. As superfícies de resposta geradas em relação ao experimento comprovam as afirmações em relação a produção de biomassa (Figuras 32, 33 e 34).

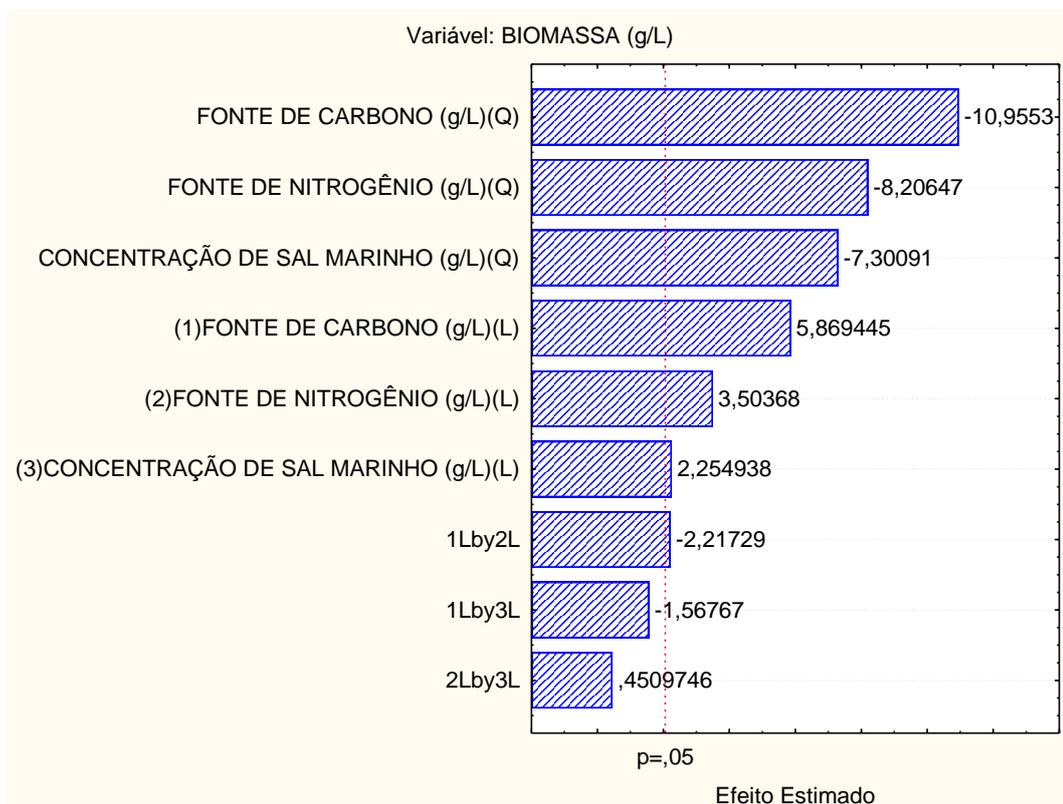


FIGURA 31 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 2.

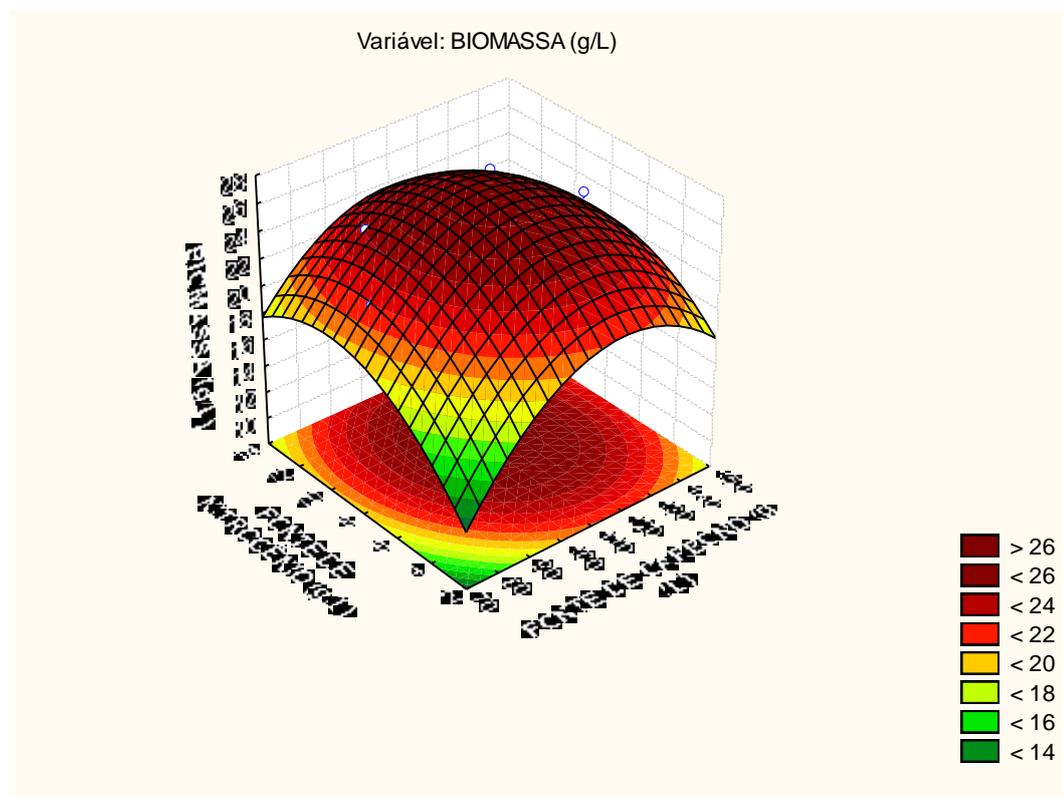


FIGURA 32 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (GLICOSE/GALACTOSE E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0.

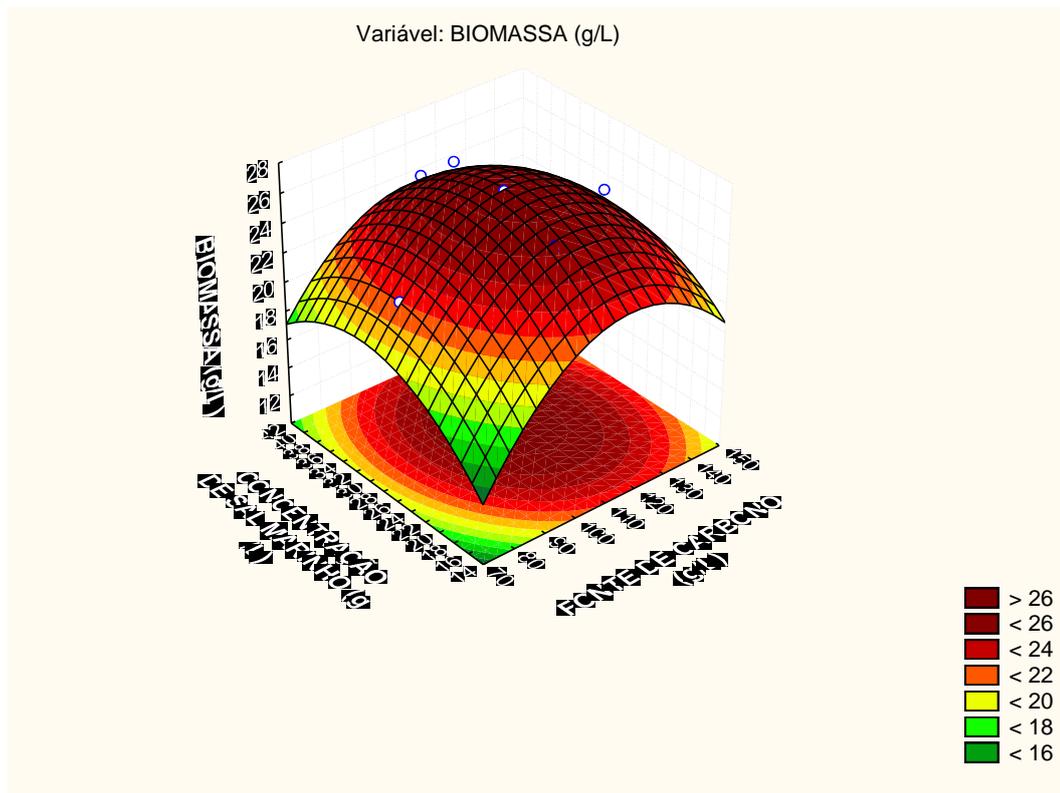


FIGURA 33 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (GLICOSE/GALACTOSE E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0.

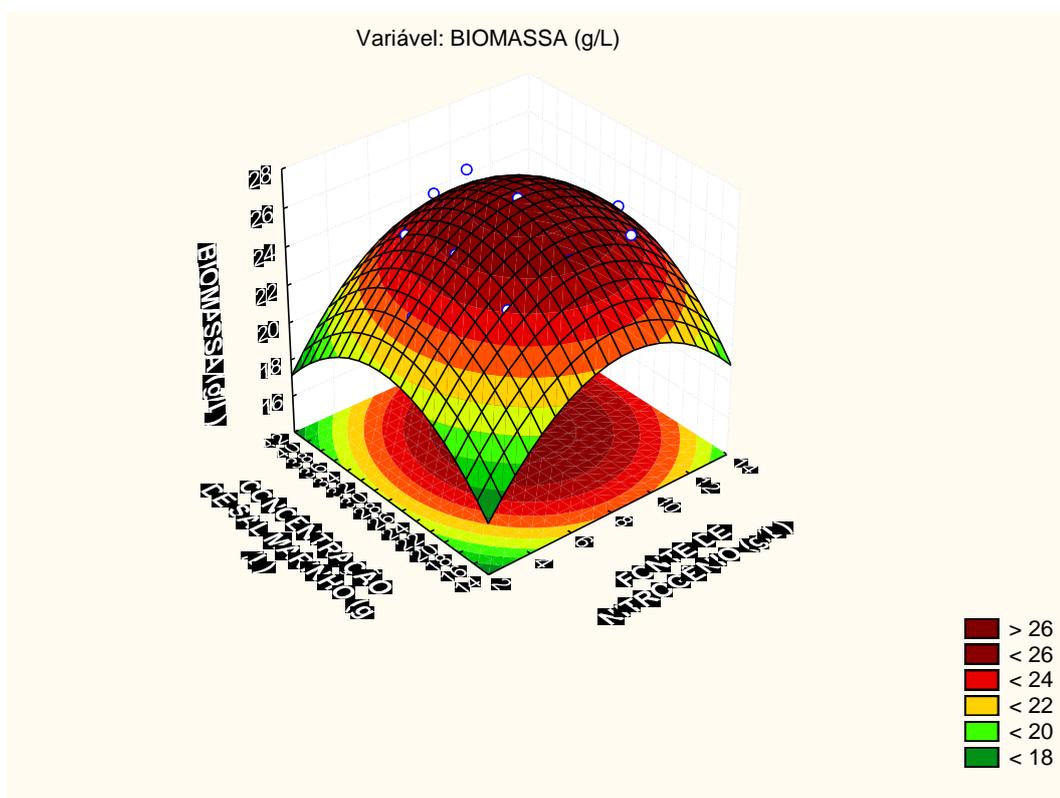


FIGURA 34 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (NITRATO DE SÓDIO E SAL MARINHO) VARIÁVEL GLICOSE/GALACTOSE MANTIDA NO NÍVEL 0.

O modelo matemático gerado que representa a produção de biomassa (g/L) em condições otimizadas é dado pela equação abaixo:

$$\text{Biomassa (g/L)} = - 51,76 + 0,87 \times [\text{glicose/galactose}] - 3,60 \cdot 10^{-3} \times [\text{glicose/galactose}]^2 + 2,77 \times [\text{nitrato de sódio}] - 0,11 \times [\text{nitrato de sódio}]^2 + 1,13 \times [\text{sal marinho}] - 1,96 \cdot 10^{-2} \times [\text{sal marinho}]^2 - 5,70 \cdot 10^{-3} [\text{glicose/galactose}] \times [\text{nitrato de sódio}]$$

De acordo com as superfícies de resposta, verificou-se que os níveis das variáveis avaliadas proporcionaram a identificação da região ótima para produção de biomassa de *Schizochitrium limacinum sr 21*, sendo: glicose/galactose 113,95 g/L, nitrato de sódio 8,85 g/L e sal marinho 28,77 g/L, que proporcionaria uma produção de biomassa de 27,08 g/L.

A Tabela 17 apresenta a análise das interações entre as variáveis estudadas em relação a produção de lipídeos.

TABELA 17 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 2 - GLICOSE/GALACTOSE + NITRATO DE SÓDIO (LIPÍDEOS)

Fator	Soma Dos Quadrados	Graus De Liberdade	Médias Quadradas	Razão F	Razão p
Fonte de carbono (g/L) (L)	5,49269	1	5,49269	56,9745	0,000000
Fonte de carbono (g/L) (Q)	20,52725	1	20,52725	212,9251	0,000000
Fonte de Nitrogênio (g/L) (L)	1,07563	1	1,07563	11,1573	0,002539
Fonte de Nitrogênio (g/L) (Q)	9,36985	1	9,36985	97,1916	0,000000
Concentração de Sal Marinho (g/L) (L)	0,42934	1	0,42934	4,4535	0,044607
Concentração de Sal Marinho (g/L) (Q)	8,25888	1	8,25888	85,6677	0,000000
1L por 2L	0,50021	1	0,50021	5,1886	0,031196
1L por 3L	0,42941	1	0,42941	4,4542	0,044591
2L por 3L	0,04201	1	0,04201	0,4357	0,514990

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); L = interação linear; Q = interação quadrática. R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta; R<sup>2</sup> = 0,932.

A tabela 17 da ANOVA do Meio de Cultivo 2 e o Diagrama de Pareto (Figura 35) apresentam as avaliações do experimento em relação a produção de lipídeos, no

qual as interações quadráticas e as interações lineares da glicose/galactose, do nitrato de sódio e do sal marinho apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) nas condições avaliadas. As superfícies de resposta geradas em relação ao experimento comprovam as afirmações em relação a produção de lipídeos (Figuras 36, 37e 38).

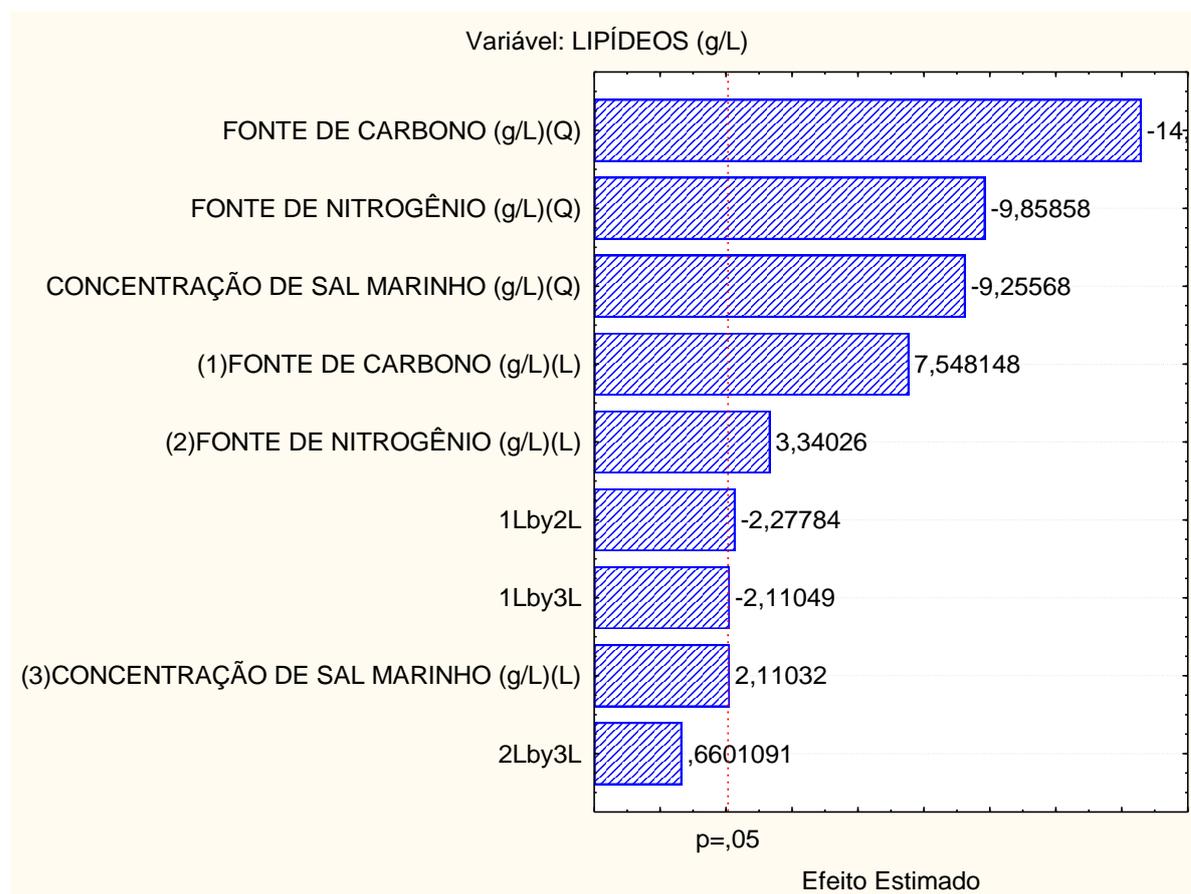


FIGURA 35 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 2

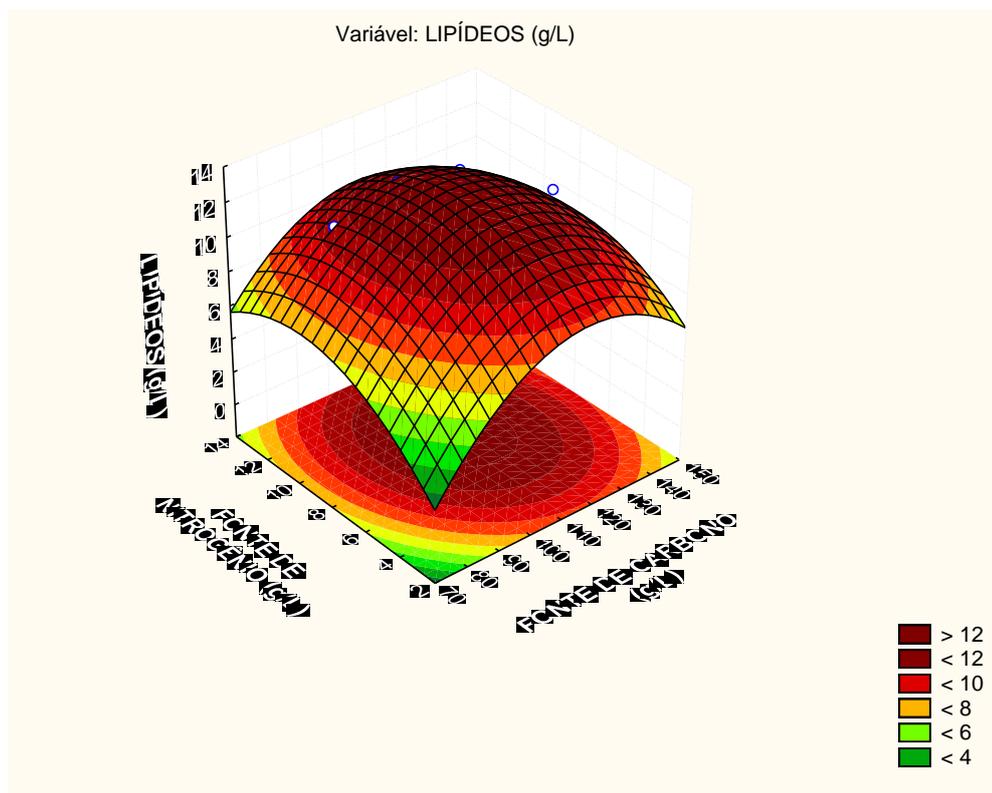


FIGURA 36 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (GLICOSE/GALACTOSE E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0.

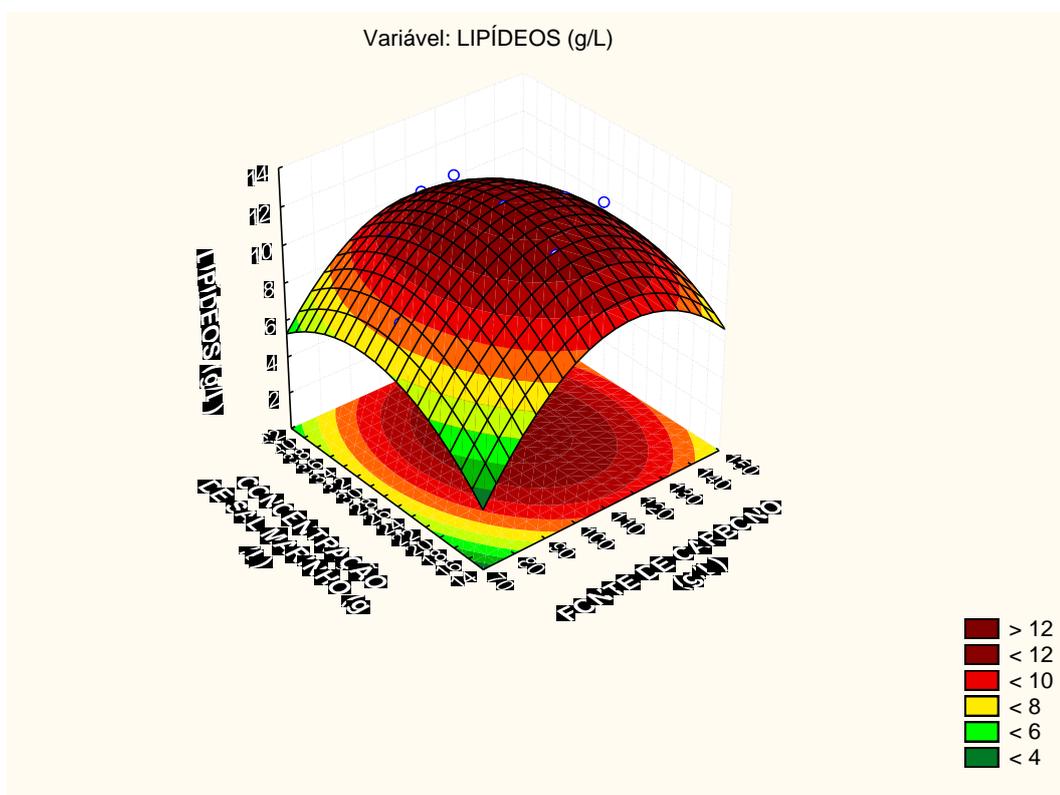


FIGURA 37 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (GLICOSE/GALACTOSE E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0.

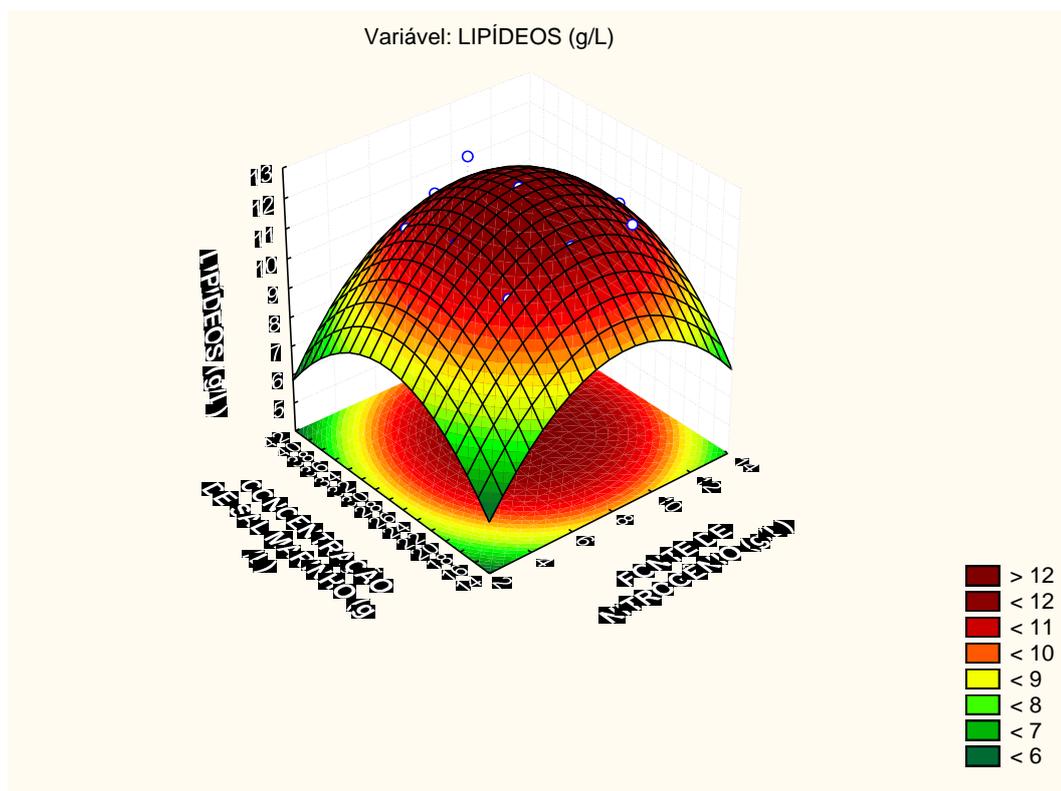


FIGURA 38 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 2. DCCR (NITRATO DE SÓDIO E SAL MARINHO) VARIÁVEL GLICOSE/GALACTOSE MANTIDA NO NÍVEL 0.

O modelo matemático gerado que representa a produção de lipídeos (g/L) em condições otimizadas é dado pela equação abaixo:

$$\begin{aligned} \text{Lipídeos (g/L)} = & - 49,21 + 0,69 \times [\text{glicose/galactose}] - 2,80 \cdot 10^{-3} \times [\text{glicose/galactose}]^2 \\ & + 1,84 \times [\text{nitrato de sódio}] - 8,31 \cdot 10^{-2} \times [\text{nitrato de sódio}]^2 + 0,96 \times [\text{sal marinho}] - \\ & 1,43 \cdot 10^{-2} \times [\text{sal marinho}]^2 - 3,40 \cdot 10^{-3} \times [\text{glicose/galactose}] \times [\text{nitrato de sódio}] - 1,40 \cdot 10^{-3} \\ & \times [\text{glicose/galactose}] \times [\text{sal marinho}] \end{aligned}$$

De acordo com as superfícies de resposta, verificou-se que os níveis das variáveis avaliadas proporcionaram a identificação da região ótima para produção de lipídeos de *Schizochitrium limacinum* sr 21, sendo: glicose/galactose 114,00 g/L, nitrato de sódio 8,75 g/L e sal marinho 28,51 g/L, que proporcionaria uma produção de lipídeos de 10,61 g/L.

Os resultados do planejamento experimental DCCR do meio de cultivo Meio 3 - Frutose + Nitrato De Sódio para a cepa *Schizochitrium limacinum* sr 21 estão apresentados na Tabela 18.

TABELA 18 RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE LIPÍDEOS DO PLANEJAMENTO DCCR MEIO 3 - FRUTOSE + NITRATO DE SÓDIO

ENSAIOS	FONTE DE CARBONO (G/L)	FONTE DE NITROGÊNIO (G/L)	CONCENTRAÇÃO DE SAL MARINHO (G/L)	BIOMASSA (G/L)	LIPÍDEOS (G/L)
1	90,00	5,40	21,00	19,75	7,31
2	90,00	5,40	28,00	20,34	8,35
3	90,00	5,40	35,00	20,01	7,54
4	90,00	8,40	21,00	21,15	7,99
5	90,00	8,40	28,00	21,62	8,56
6	90,00	8,40	35,00	21,58	8,29
7	90,00	11,40	21,00	19,32	7,59
8	90,00	11,40	28,00	21,6	8,46
9	90,00	11,40	35,00	20,75	8,86
10	110,00	5,40	21,00	21,61	9,06
11	110,00	5,40	28,00	23,12	9,57
12	110,00	5,40	35,00	21,47	9,13
13	110,00	8,40	21,00	23,66	9,94
14	110,00	8,40	28,00	25,02	10,55
15	110,00	8,40	35,00	24,45	10,28
16	110,00	11,40	21,00	21,87	9,58
17	110,00	11,40	28,00	23,97	9,71
18	110,00	11,40	35,00	21,81	8,96
19	130,00	5,40	21,00	20,74	8,43
20	130,00	5,40	28,00	21,54	9,15
21	130,00	5,40	35,00	21,01	8,31
22	130,00	8,40	21,00	21,68	9,18
23	130,00	8,40	28,00	22,01	9,96
24	130,00	8,40	35,00	21,89	9,01
25	130,00	11,40	21,00	21,59	8,60
26	130,00	11,40	28,00	21,61	9,05
27	130,00	11,40	35,00	21,98	8,75
28	110,00	8,40	28,00	25,54	10,44
29	110,00	8,40	28,00	25,66	10,45
30	110,00	8,40	28,00	25,31	10,34
31	76,40	8,40	28,00	20,35	6,55
32	143,64	8,40	28,00	21,36	8,59
33	110,00	3,35	28,00	21,21	8,47
34	110,00	13,44	28,00	23,8	8,70
35	110,00	8,40	16,22	22,87	8,43
36	110,00	8,40	39,77	23,74	8,59

Na tabela 18 fica evidente que o melhor resultado de produção de biomassa seca foi obtido quando o microrganismo *Schizochitrium limacinum sr 21* foi submetido as condições do ponto central nesse experimento frutose 110 g/L, nitrato de sódio 8,4

g/L e sal marinho 28 g/L, a produção média foi de 25,66 g/L. Em relação a produção de lipídeos a melhor condição de cultivo ocorreu no ensaio 14 (ponto central), atingindo um valor de 10,55 g/L de lipídeos. Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, indicando uma boa repetibilidade do processo.

A Tabela 19 apresenta a análise das interações entre as variáveis estudadas em relação a produção de biomassa.

TABELA 19 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 3 - FRUTOSE + NITRATO DE SÓDIO (BIOMASSA)

<b>Fator</b>	<b>Soma Dos Quadrados</b>	<b>Graus De Liberdade</b>	<b>Médias Quadradas</b>	<b>Razão F</b>	<b>Razão p</b>
<b>Fonte de carbono (g/L) (L)</b>	3,93761	1	3,93761	4,75394	0,038473
<b>Fonte de carbono (g/L) (Q)</b>	53,16393	1	53,16393	64,18567	0,000000
<b>Fonte de Nitrogênio (g/L) (L)</b>	3,60863	1	3,60863	4,35676	0,046808
<b>Fonte de Nitrogênio (g/L) (Q)</b>	23,26017	1	23,26017	28,08238	0,000015
<b>Concentração de Sal Marinho (g/L) (L)</b>	1,07145	1	1,07145	1,29358	0,265763
<b>Concentração de Sal Marinho (g/L) (Q)</b>	12,70137	1	12,70137	15,33457	0,000582
<b>1L por 2L</b>	0,00853	1	0,00853	0,01030	0,919932
<b>1L por 3L</b>	0,13021	1	0,13021	0,15720	0,694981
<b>2L por 3L</b>	0,15641	1	0,15641	0,18883	0,667474

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); L = interação linear; Q = interação quadrática.  $R^2$  = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta;  $R^2 = 0,774$

A tabela 19 da ANOVA do Meio de Cultivo 3 e o Diagrama de Pareto (Figura 39) apresentam as avaliações do experimento em relação a produção de biomassa, no qual as interações quadráticas da frutose, do nitrato de sódio e do sal marinho e as interações lineares da frutose, do nitrato de sódio apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) nas condições avaliadas. As superfícies de resposta geradas em relação ao experimento comprovam as afirmações em relação a produção de biomassa (Figuras 40, 41 e 42).

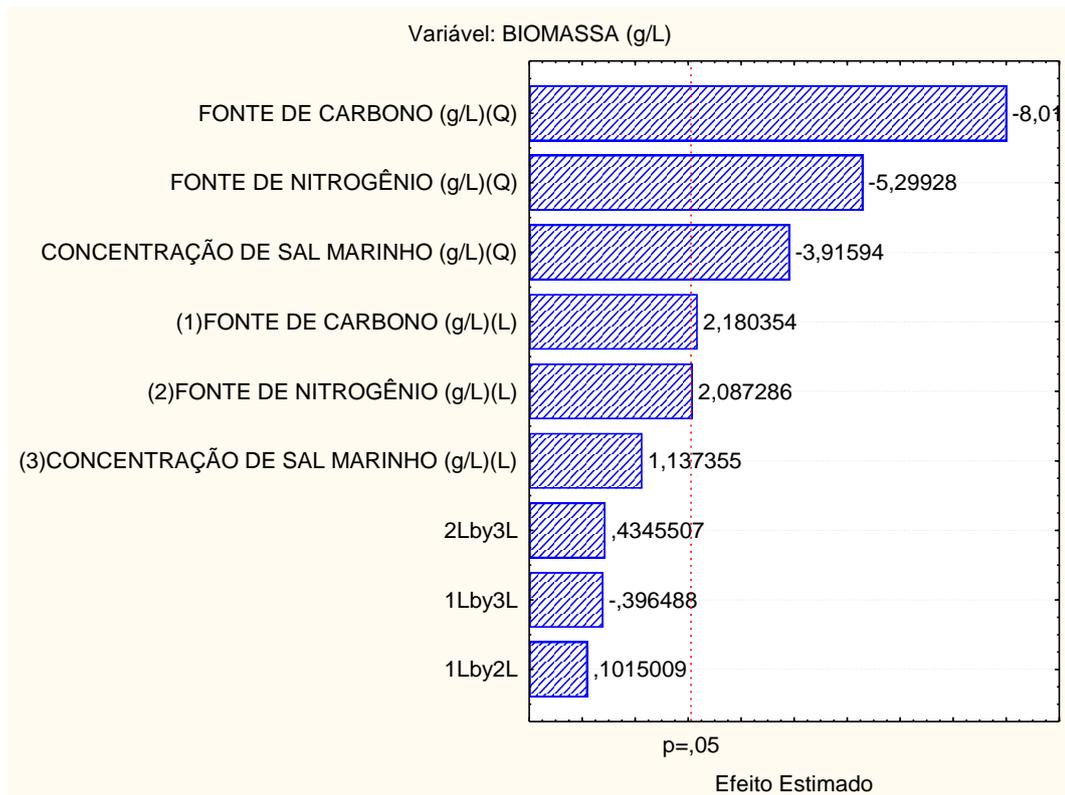


FIGURA 39 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 3

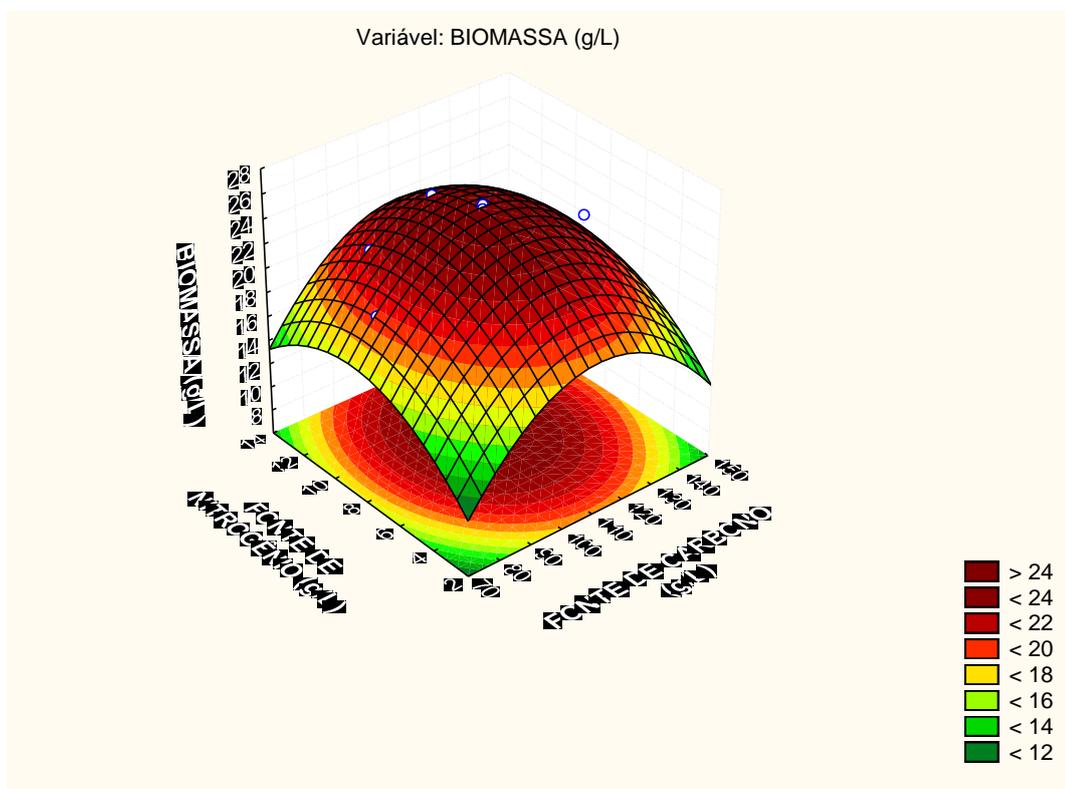


FIGURA 40 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (FRUTOSE E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0.

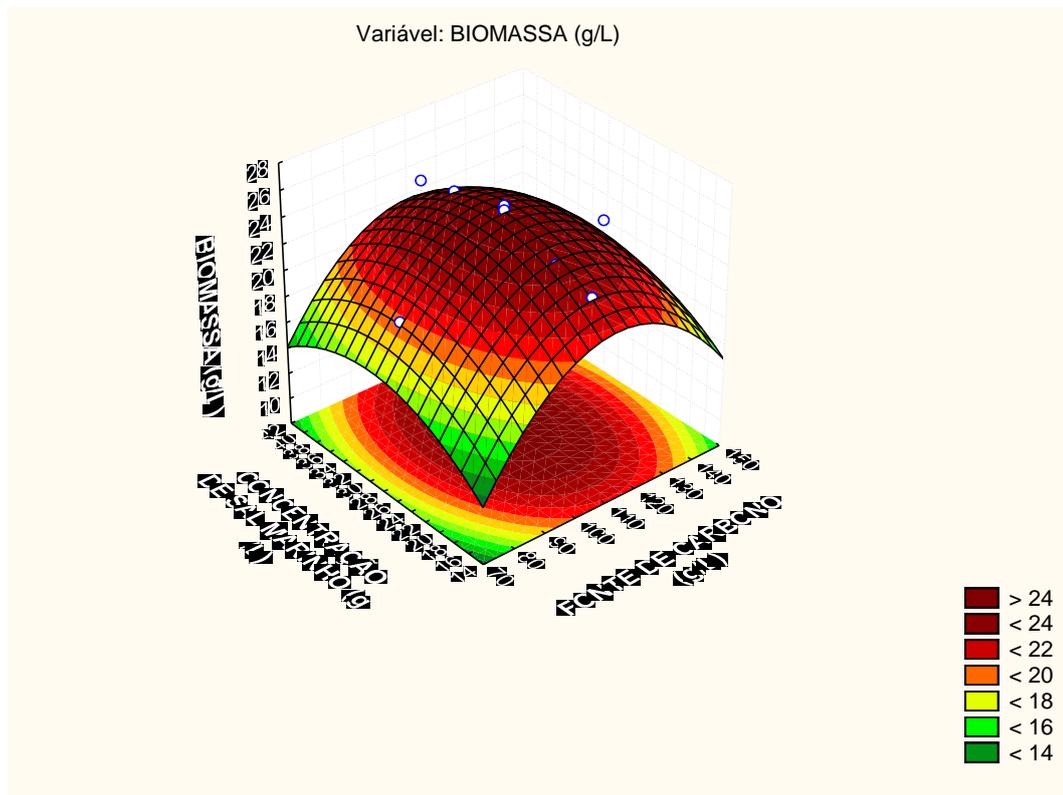


FIGURA 41 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (FRUTOSE E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0.

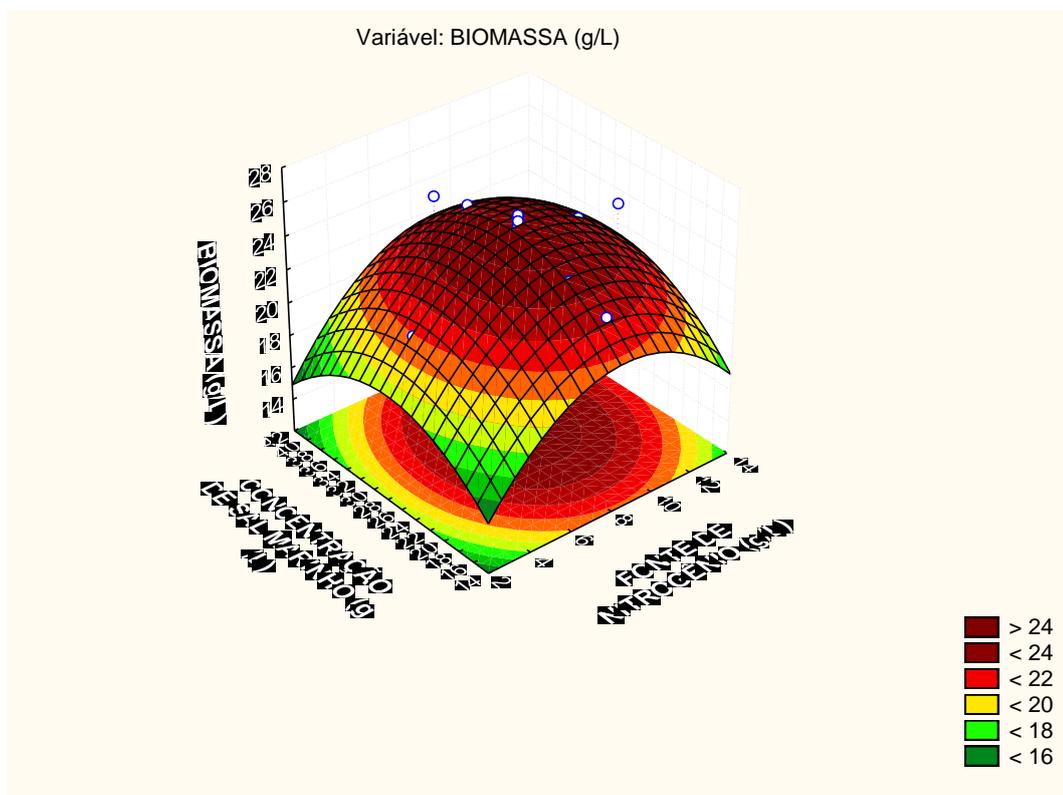


FIGURA 42 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (NITRATO DE SÓDIO E SAL MARINHO) VARIÁVEL FRUTOSE MANTIDA NO NÍVEL 0.

O modelo matemático gerado que representa a produção de biomassa (g/L) em condições otimizadas é dado pela equação abaixo:

$$\text{Biomassa (g/L)} = - 34,09 + 0,88 \times [\text{frutose}] - 3,90.10^{-3} \times [\text{frutose}]^2 + 1,93 \times [\text{nitrato de sódio}] - 0,10 \times [\text{nitrato de sódio}]^2 + 3,00.10^{-4} \times [\text{sal marinho}]$$

De acordo com as superfícies de resposta, verificou-se que os níveis das variáveis avaliadas proporcionaram a identificação da região ótima para produção de biomassa de *Schizochitrium limacinum sr 21*, sendo: frutose 112,24 g/L, nitrato de sódio 8,91 g/L e sal marinho 28,88 g/L, que proporcionaria uma produção de biomassa de 24,81 g/L.

A Tabela 20 apresenta a análise das interações entre as variáveis estudadas em relação a produção de lipídeos.

TABELA 20 ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR: MEIO 3 - FRUTOSE + NITRATO DE SÓDIO (LIPÍDEOS)

Fator	Soma Dos Quadrados	Graus De Liberdade	Médias Quadradas	Razão F	Razão p
Fonte de carbono (g/L) (L)	5,05201	1	5,05201	71,6095	0,000000
Fonte de carbono (g/L) (Q)	17,87039	1	17,87039	253,3030	0,000000
Fonte de Nitrogênio (g/L) (L)	0,40231	1	0,40231	5,7025	0,024495
Fonte de Nitrogênio (g/L) (Q)	6,73675	1	6,73675	95,4898	0,000000
Concentração de Sal Marinho (g/L) (L)	0,12420	1	0,12420	1,7604	0,196108
Concentração de Sal Marinho (g/L) (Q)	6,76180	1	6,76180	95,8448	0,000000
1L por 2L	0,12000	1	0,12000	1,7009	0,203594
1L por 3L	0,31363	1	0,31363	4,4456	0,044782
2L por 3L	0,03203	1	0,03203	0,4541	0,506362

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); L = interação linear; Q = interação quadrática.  $R^2$  = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta;  $R^2 = 0,939$

A tabela 20 da ANOVA do Meio de Cultivo 3 e o Diagrama de Pareto (Figura 43) apresentam as avaliações do experimento em relação a produção de lipídeos, no qual as interações quadráticas da frutose, do nitrato de sódio e do sal marinho e as

interações lineares da frutose, do nitrato de sódio apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) nas condições avaliadas. As superfícies de resposta geradas em relação ao experimento comprovam as afirmações em relação a produção de lipídeos (Figuras 44, 45 e 46).

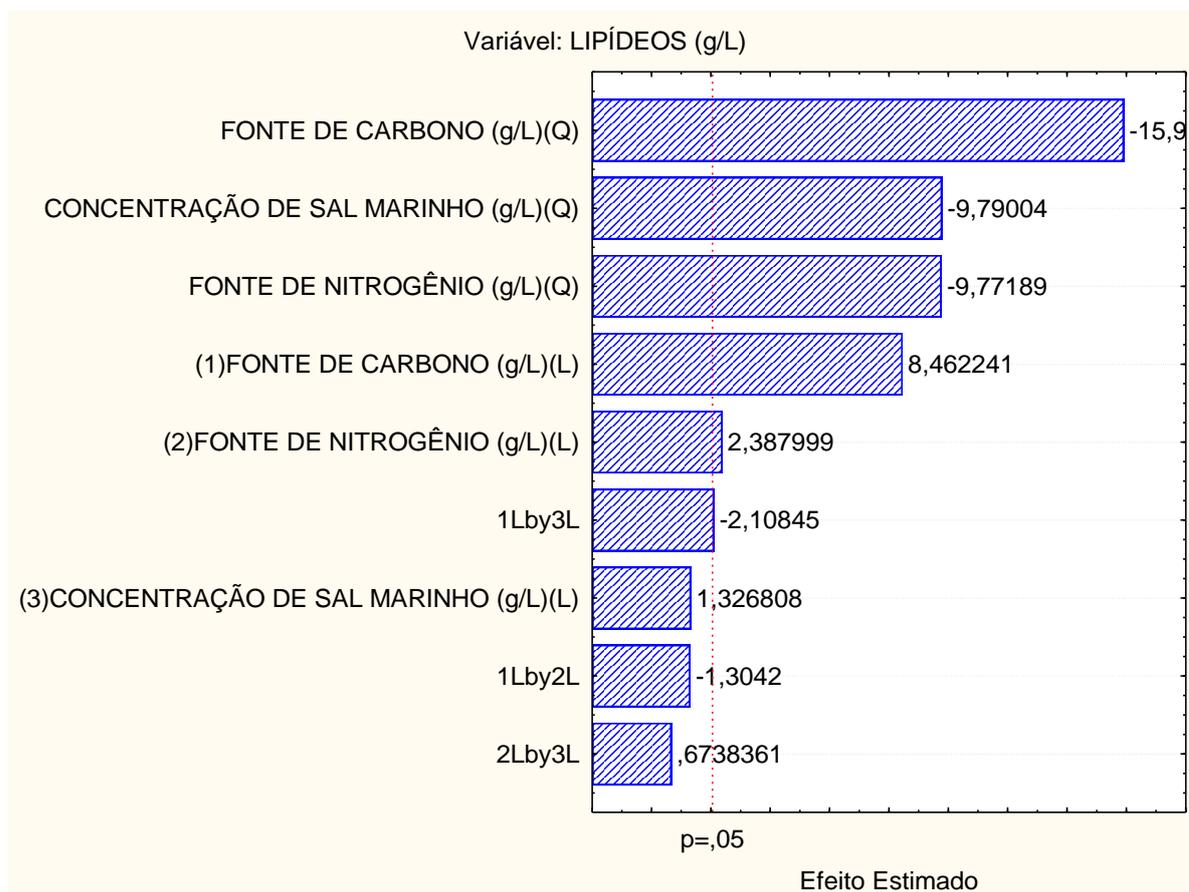


FIGURA 43 DIAGRAMA DE PARETO –VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 3.

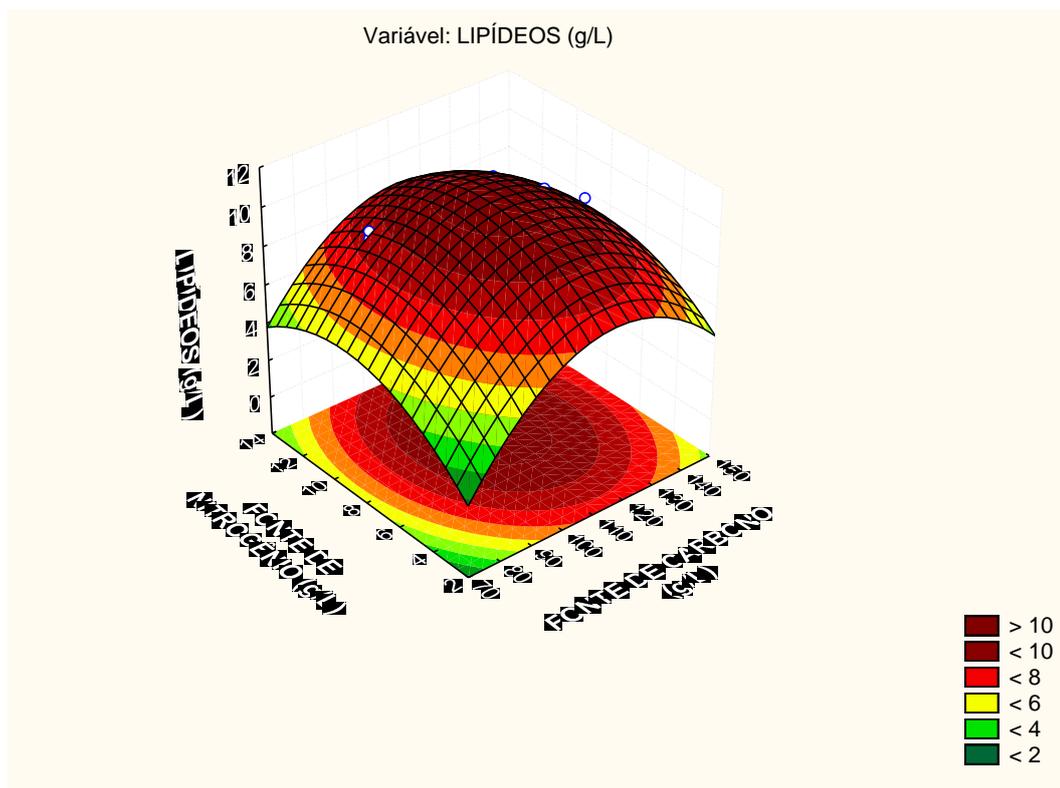


FIGURA 44 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (FRUTOSE E NITRATO DE SÓDIO) VARIÁVEL SAL MARINHO MANTIDA NO NÍVEL 0.

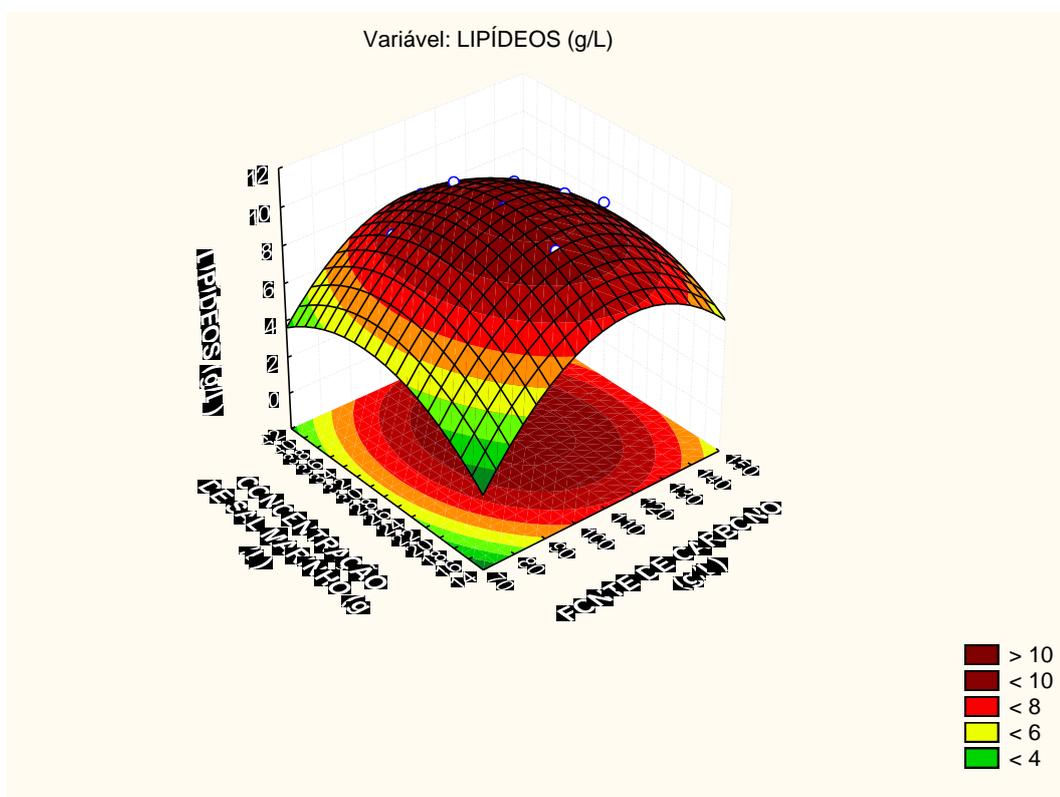


FIGURA 45 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (FRUTOSE E SAL MARINHO) VARIÁVEL NITRATO DE SÓDIO MANTIDA NO NÍVEL 0.

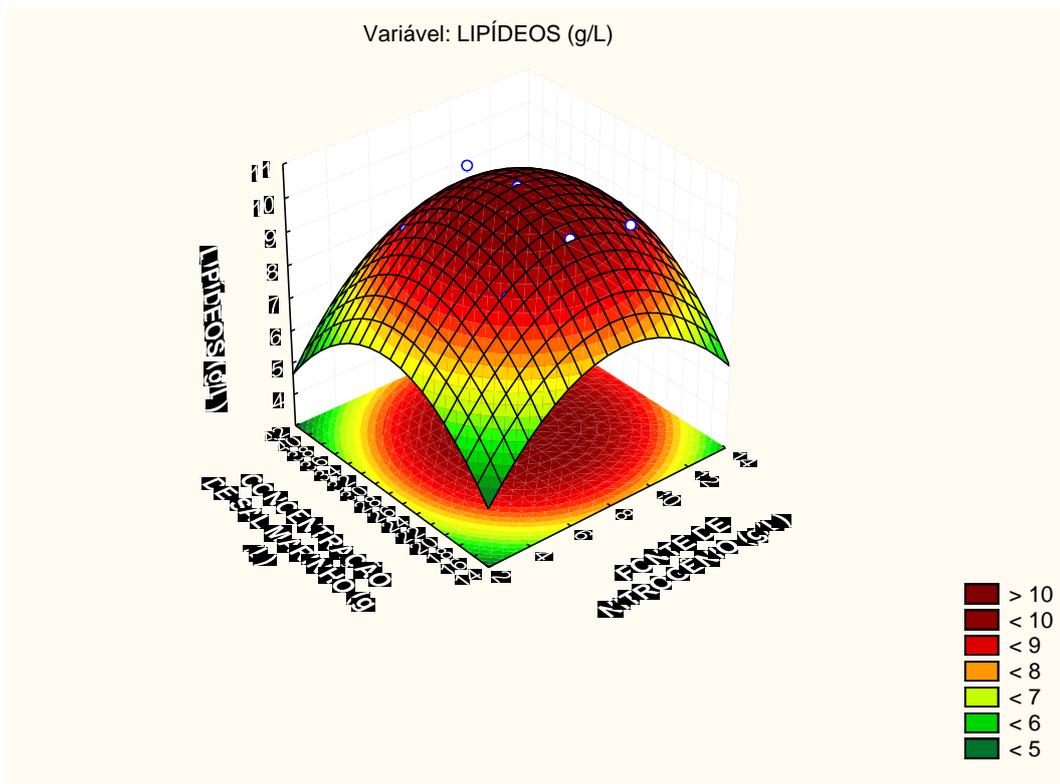


FIGURA 46 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM MEIO DE CULTIVO 3. DCCR (NITRATO DE SÓDIO E SAL MARINHO) VARIÁVEL FRUTOSE MANTIDA NO NÍVEL 0.

O modelo matemático gerado que representa a produção de lipídeos (g/L) em condições otimizadas é dado pela equação abaixo:

$$\text{Lipídeos (g/L)} = - 22,11 + 0,47 \times [\text{frutose}] - 2,30 \cdot 10^{-3} \times [\text{frutose}]^2 + 1,02 \times [\text{nitrato de sódio}] - 5,85 \cdot 10^{-2} \times [\text{nitrato de sódio}]^2 - 3,70 \cdot 10^{-3} \times [\text{sal marinho}]^2 + 1,90 \cdot 10^{-3} \times [\text{frutose}] \times [\text{sal marinho}]$$

De acordo com as superfícies de resposta, verificou-se que os níveis das variáveis avaliadas proporcionaram a identificação da região ótima para produção de lipídeos de *Schizochitrium limacinum sr 21*, sendo: frutose 114,33 g/L, nitrato de sódio 8,66 g/L e sal marinho 28,23 g/L, que proporcionaria uma produção de lipídeos de 9,2 g/L.

Avaliando os experimentos e os modelos de forma global, verifica-se que a concentração ótima das fontes de carbono, nitrogênio e sal ficam em uma faixa estreita, o que é explicado pela escolha das faixas de ensaio a partir de experimentos preliminares anteriores. É notável que a produção de lipídios esteja atrelada à produção de biomassa para além da concentração absoluta de células, isto é, com o

aumento da concentração celular aumenta também o teor lipídico. Essa correlação provavelmente reflete algum outro fenômeno, como a inibição por excesso de substrato, a proporção C:N do meio, ou a idade da cultura, e aponta para possibilidade de aumentar ainda mais a produção de lipídeos com estratégias de alimentação a manipulação da composição como em processos fed-batch. Finalmente, esse conjunto de experimentos comprova que as fontes de carbono testadas são, de fato, igualmente eficientes para a produção de lipídeos de *Schyzochitrium limacinum sr21*.

Os meios de cultivo otimizados permitem uma produção em batch de até 28,54 g/L de biomassa, com 50 % de lipídios, e uma produtividade de lipídios de 2,86 g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. A conversão de substrato em biomassa nesse processo é de cerca de 40%, e a conversão em fração lipídica é de 20 %.

#### 4.4 VALIDAÇÃO DO MODELO DA OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

A validação da otimização dos meios de cultivo, foi realizada em triplicata e as fermentações foram avaliadas nas condições do ensaio 14 para o Meio 1 – glicerol + nitrato de sódio (glicerol 110g/L, nitrato de sódio 8,4 g/L e sal marinho 28 g/L), do ensaio 29 para o Meio 2 – glicose/galactose + nitrato de sódio (glicose/galactose 110g/L, nitrato de sódio 8,4 g/L e sal marinho 28 g/L) e do ensaio 14 para o Meio 3 – frutose + nitrato de sódio (frutose 110g/L, nitrato de sódio 8,4 g/L e sal marinho 28 g/L) Foi realizada uma comparação com os resultados obtidos no planejamento DCCR e com os resultados teóricos obtidos através dos modelos matemáticos. Os resultados obtidos estão na Tabela 21.

TABELA 21 VALIDAÇÃO DO DCCR

Meios de Cultivo	Biomassa (g/L)			Lipídeos (g/L)		
	Valor Experimental	Valor Teórico	Valor no DCCR	Valor Experimental	Valor Teórico	Valor no DCCR
<b>1</b>	28,13 ± 0,14	27,45	28,54	14,10 ± 0,17	12,31	14,30
<b>2</b>	27,10 ± 0,10	27,08	26,87	12,09 ± 0,21	10,61	12,60
<b>3</b>	24,10 ± 0,26	24,81	25,66	10,23 ± 0,15	9,20	10,55

A otimização do meio de cultivo através do planejamento DCCR foi validada, visto que os valores teóricos, obtidos através dos modelos matemáticos, são muito próximos dos obtidos experimentalmente. Ao analisar a tabela 21 fica evidente que o meio de cultivo 1 apresentou os melhores resultados de validação. Além disso, o meio de cultivo 1 quando analisado em um aspecto econômico se torna mais viável para escalonamento devido ao fato de custo da fonte de carbono glicerol ser mais barato que as outras fontes. Assim o próximo tópico apresenta a fermentação do *Schizochitrium Limacinum Sr 21* no meio de cultivo 1 em fermentador em escala de bancada.

A Tabela 22 apresenta o resumo da evolução das etapas de otimização que levaram a um aumento de biomassa (g/L), resultando em ganhos de produtividade.

TABELA 22 GANHOS DE PRODUTIVIDADE

<b>Etapa</b>	<b>Biomassa (g/L.h)</b>	<b>GANHOS DE PRODUTIVIDADE e biomassa</b>	<b>Lipídeos (g/L.dia)</b>	<b>GANHOS DE PRODUTIVIDADE de lipídeos</b>
<b>Planejamentos iniciais</b>	3,07		1,18	
<b>Otimização DCCR</b>	5,70	Aumento de 85% na produtividade em relação à condição inicial	2,86	Aumento de 142% na produtividade em relação à condição inicial
<b>Cinética em biorreator STR</b>	6,71	Aumento de 118% na produtividade em relação à condição inicial	3,36	Aumento de 184% na produtividade em relação à condição inicial

#### 4.5 PRODUÇÃO DE *SCHIZOCHITRIUM LIMACINUM SR 21* EM BATELADA EM BIORREATOR DO TIPO STR

A avaliação da produção de biomassa e de lipídeos de *Schizochitrium Limacinum Sr 21* foi realizada em diferentes condições de agitação e diferentes concentrações de inóculo, utilizando o meio de cultivo de glicerol e nitrato de sódio nas concentrações ótimas encontradas no DCCR. A realização da fermentação submersa foi em modo batelada em biorreator tipo tanque agitado (*Stirred Tank Reactor* - STR) como mostrado na figura 47.



FIGURA 47 FERMENTAÇÃO DE *S. LIMACINUM* EM BIORREATOR STR.

Os resultados do acompanhamento do processo estão na tabela 23.

TABELA 23 FERMENTAÇÕES EM BATELADA EM BIORREATOR STR

Ensaio	Concentração do inóculo (g/L)	Agitação (rpm)	Biomassa (g/L)	Lipídeos (g/L)	DHA (g/L)
1	1,92	150	6,68	1,88	0,22
2	1,80	300	8,06	2,41	0,37
3	6,70	150	29,54	12,65	3,79
4	6,66	300	33,58	16,80	6,40

De acordo com a tabela 23, fica evidente que a concentração de inóculo tem grande influência na produção de biomassa gerando um aumento em 319% com uma concentração cinco vezes maior de inoculo quando compara-se o ensaio 4 ao ensaio 1, isso contraria o experimento realizado anteriormente sobre a taxa de inoculação, sendo necessário aprofundar os experimentos em relação a esse parâmetro da fermentação. Esse resultado é corroborado por (PATIL; GOGATE, 2015) que aumentou a produção de biomassa em 169% com um aumento de 5% do inóculo. Em relação a agitação, quando comparamos o ensaio 4 ao ensaio 3 temos um acréscimo

de 13 % em biomassa, 33% em lipídeos e 72 % em DHA, isso evidencia a forte influência desse parâmetro durante a fermentação. Esse fato foi apresentado também por (CHI et al., 2009) onde a estratégia de aeração conseguiu aumentar a produção de biomassa e lipídeos de *S. limacinum* em 54%. Em Yokochi 2003 com um aumento de 200rpm na fermentação houve um incremento de 33% em biomassa e 21% em DHA.

#### 4.6 CINÉTICA DA PRODUÇÃO EM BIORREATOR

A cinética de produção de biomassa e lipídeos de *S. limacinum* foi realizada nas condições otimizadas para crescimento e acúmulo de lipídeos. Os resultados das análises de biomassa por peso seco, consumo de glicerol e acúmulo de lipídeos estão apresentados na figura 48.

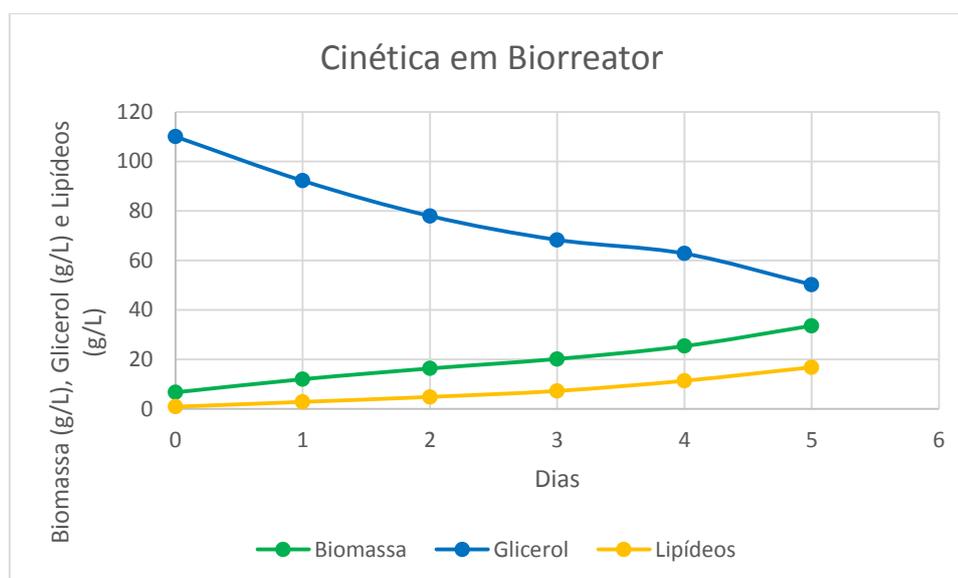


FIGURA 48 CINÉTICA DE SCHIZOCHYTRIUM LIMACINUM SR 21 EM BIORREATOR STR

Quanto ao consumo de substrato realizado pelo microrganismo durante a fermentação, é importante investigar o fato de ele não ser capaz de consumi-lo por completo, afinal consumiu em média 54% do substrato disponível, restando uma parcela considerável a ser consumida. A produção de biomassa foi de 33,58 g/L e a de lipídeos foi 16,80 g/L. Esses resultados são satisfatórios quando comparados aos encontrados por (CHI et al., 2007) chegando a uma biomassa de 22,1 g/L e concentração de DHA de 4,91 g/L. Já (PYLE; GARCIA; WEN, 2008) encontrou uma

biomassa de 11,49 g/L e 1,68 g/L de DHA. Em (ETHIER et al., 2011) a biomassa encontrada foi de 11,78 g/L e 1,74 g/L de DHA. Ao analisar os resultados encontrados com os trabalhos de (HUANG; LU; CHU, 2012b; LI et al., 2015; PATIL; GOGATE, 2015; ROSA et al., 2010) é possível afirmar que os resultados encontrados nesse experimento (figura 49) são inferiores mas isso porque as pesquisas supracitadas utilizaram de fermentação em batelada alimentada e de misturas de fontes de carbono, enquanto o presente experimento utilizou apenas de uma fonte de carbono e o processo foi em batelada.

#### 4.7 AVALIAÇÃO ECONÔMICA

Foi realizada uma simples avaliação dos custos do bioprocesso para produzir DHA a partir do microrganismo *Schizochytrium limacinum sr 21* conforme os custos do meio de cultivo apresentados na tabela 24.

TABELA 24 CUSTOS DO MEIO DE CULTIVO

<b>Composição do meio</b>	<b>Quantidade (ton/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Custo (U\$/ton)</b>	<b>Custo do meio (U\$/m<sup>3</sup>)</b>
Glicerol	0,130	600,00*	78,00
NaNO <sub>3</sub>	0,011	350,00*	3,85
Sal Marinho	0,035	750,00*	26,25
		TOTAL	108,10

\*Preços pesquisados em alibaba.com

A hipótese de custos para a produção de DHA seria que se o meio de cultivo corresponde a 1/5 dos custos de produção, o que dá um custo total de produção de U\$/m<sup>3</sup> 540,50. O óleo produzido nesse experimento é composto de 38% de DHA. Se produzimos 16,8 kg/m<sup>3</sup> de óleo com 38% de pureza a um preço de U\$ 50,00 (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Então obteríamos um lucro de U\$ 300,00 por kg de óleo produzido.

## 5 Conclusões

O desenvolvimento de um bioprocesso para a produção de biomassa e lipídeos de *Schizochytrium limacinum sr 21* através de fermentação submersa utilizando o meio de cultivo composto de glicerol, nitrato de sódio e sal marinho foi atingido com sucesso.

As contribuições deste trabalho estão descritas nas seguintes conclusões:

- O microrganismo *Schizochytrium limacinum sr 21* produziu em meio otimizado 28,54 g/L de biomassa e 14,30 g/L de lipídeos em 120 horas de fermentação.
- O meio de cultivo otimizado para o microrganismo é composto de 110 g/L de glicerol, 8,4 g/L de nitrato de sódio e 28 g/L de sal marinho.
- A cinética do microrganismo realizada em fermentador tipo STR em batelada atingiu níveis satisfatórios de produção com 33,58 g/L de biomassa, 16,80 g/L de lipídeos e 6,40 g/L de DHA.
- As condições de fermentação otimizadas para o microrganismo foram temperatura de 28C, pH ótimo de valor 5, agitação a 300rpm, aeração de 1 vvm em 120 horas de processo.

## 6 Sugestões para trabalhos futuros

Os resultados dessa pesquisa são importantes visto que na literatura há pouquíssimos estudos sobre o desenvolvimento de bioprocessos para a obtenção de biolípídeos a partir do microrganismo *Schizochytrium limacinum* sr 21.

As seguintes sugestões são para trabalhos futuros, com a perspectiva de desenvolver processos tecnológicos para produção de DHA em escala industrial por meio de uma abordagem sustentável, complementando a investigação iniciada com esta dissertação:

- Investigar e otimizar os parâmetros de produção de ácido graxo ômega -3/ DHA em biorreator em escala de bancada.
- Investigar e otimizar os processos de extração e purificação do óleo de *Schizochytrium limacinum* sr 21 em escala de bancada.
- Investigar possíveis alternativas para a manipulação da rota metabólica de biolípídeos do microrganismo.
- Investigar possíveis resíduos agroindustriais que possam ser utilizados como substrato da fermentação.
- Escalonar o processo em planta piloto
- Realizar estudos de viabilidade econômica do processo desenvolvido.
- Extrair e caracterizar os exopolissacarídeos produzidos durante a fermentação.
- Prospectar novos microrganismos acumuladores de lipídeos em território nacional.

## Referências Bibliográficas

- ABE, E. et al. A novel phosphatidylcholine which contains pentadecanoic acid at sn-1 and docosahexaenoic acid at sn-2 in *Schizochytrium* sp. F26-b. **Journal of Biochemistry**, v. 140, p. 247–253, 2006.
- ABOU-SHANAB, R. A. I. et al. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 88, p. 3300–3306, 2011.
- ADARME-VEGA, T. C.; THOMAS-HALL, S. R.; SCHENK, P. M. Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 14–18, 2014.
- AKI, T. et al. Thraustochytrid as a potential source of carotenoids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 8, p. 789–794, 2003.
- ALVAREZ, H. M. et al. Biosynthesis of fatty acids and triacylglycerols by 2,6,10,14-tetramethyl pentadecane-grown cells of *Nocardia globberula* 432. **FEMS Microbiology Letters**, v. 200, p. 195–200, 2001.
- ANGERBAUER, C. et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3051–3056, 2008.
- ARABOLAZA, A. et al. Multiple pathways for triacylglycerol biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, p. 2573–2582, 2008.
- ARAUJO, G. S. et al. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5248–5250, 2011.
- ARMENTA, R. E.; VALENTINE, M. C. Single-cell oils as a source of omega-3 fatty acids: An overview of recent advances. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, p. 167–182, 2013.
- BACON, J. et al. Lipid composition and transcriptional response of *Mycobacterium tuberculosis* grown under iron-limitation in continuous culture: Identification of a novel wax ester. **Microbiology**, v. 153, p. 1435–1444, 2007.
- BAILEY, R. B. R. et al. **Enhanced production of lipids containing polyenoic fatty acid by very high density cultures of eukaryotic microbes in fermentors** US Patent ..., 2003.
- BARR, D. J. The phylogenetic and taxonomic implications of flagellar rootlet morphology among zoospore fungi. **Bio Systems**, v. 14, p. 359–370, 1981.
- BARROW, C.; SHAHIDI, F. **Marine Nutraceuticals and Functional Foods**. [s.l: s.n.]. v. 20071256p. 494

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Stryer Biochemie**. [s.l: s.n.]. p. 1120

BIBUS, D. M. Long-chain omega-3 from low-trophic-level fish provides value to farmed seafood. **Lipid Technology**, v. 9999, p. n/a–n/a, 2015.

BIRCH, E. E. et al. Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula. **Early Human Development**, v. 83, p. 279–284, 2007.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. Extraction of Lipids in Solution by the Method of Bligh & Dyer. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 2, p. 911–917, 1959.

BOWLES, R. D. et al. Long-chain n - 3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 35, n. 99, p. 193–202, 1999.

BURJA, A. M. et al. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing Thraustochytrium species: Screening of strains and optimization of omega-3 production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 1161–1169, 2006.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 645–662, 2013.

CAVALIER-SMITH, T.; ALLSOPP, M. T. E. P.; CHAO, E. E. **Thraustochytrids are Chromists, not Fungi: 18s rRNA Signatures of Heterokonta** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1994.

CHANG, G. et al. Fatty acid shifts and metabolic activity changes of Schizochytrium sp. S31 cultured on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 255–260, 2013.

CHATZIFRAGKOU, A. et al. Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 1048–1057, 2010.

CHAUTON, M. S. et al. A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. **Aquaculture**, v. 436, p. 95–103, 2015.

CHEN, X. et al. Optimization of medium for enhancement of ??-Poly-L-Lysine production by *Streptomyces* sp. M-Z18 with glycerol as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1727–1732, 2011.

CHI, Z. et al. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. v. 42, p. 1537–1545, 2007.

CHI, Z. et al. Study of a two-stage growth of DHA-producing marine algae *Schizochytrium limacinum* SR21 with shifting dissolved oxygen level. p. 1141–1148, 2009.

CHIN, H. J. et al. Schizochytrium limacinum SR-21 as a source of docosahexaenoic acid: Optimal growth and use as a dietary supplement for laying hens. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 57, p. 13–20, 2006.

CHRISTOPHE, G. et al. Recent developments in microbial oils production: A possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. February, p. 29–46, 2012.

COLLINS, C. T. et al. Pre- and post-term growth in pre-term infants supplemented with higher-dose DHA: a randomised controlled trial. **The British journal of nutrition**, v. 105, p. 1635–1643, 2011.

COTTIN, S. C.; SANDERS, T. A.; HALL, W. L. The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, p. 215–231, 2011.

COUTO, R. M. et al. Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 2, p. 158–164, 2010.

DANIEL, C. R. et al. Dietary intake of omega-6 and omega-3 fatty acids and risk of colorectal cancer in a prospective cohort of U.S. men and women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 18, p. 516–25, 2009.

DECKELBAUM, R. J.; TORREJON, C. The Omega-3 Fatty Acid Nutritional Landscape: Health Benefits and Sources. **Journal of Nutrition**, v. 142, p. 587S–591S, 2012.

DELARUE, J.; GURIEC, N. Opportunities to enhance alternative sources of long-chain n-3 fatty acids within the diet. **The Proceedings of the Nutrition Society**, n. May 2013, p. 1–9, 2014.

DEWAPRIYA, P.; KIM, S. K. Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. **Food Research International**, v. 56, p. 115–125, 2014.

DIMRI, M. et al. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 489–495, 2010.

DUNBAR, B. S.; BOSIRE, R. V.; DECKELBAUM, R. J. Omega 3 and omega 6 fatty acids in human and animal health: An African perspective. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 398, p. 69–77, 2014.

ECONOMOU, C. N. et al. Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9737–9742, 2011.

ETHIER, S. et al. Bioresource Technology Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 88–93, 2011.

FAKAS, S. et al. Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1062–1070, 2008.

FAKAS, S. et al. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 573–580, 2009.

FAN, K.-W. et al. Lipid characterization of mangrove thraustochytrid--*Schizochytrium mangrovei*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 2906–2910, 2007.

FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (223 pp.).

GANUZA, E.; IZQUIERDO, M. S. Lipid accumulation in *Schizochytrium* G13 / 2S produced in continuous culture. p. 985–990, 2007.

GAO, C. et al. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Energy**, v. 87, p. 756–761, 2010.

GARAY, L. A.; BOUNDY-MILLS, K. L.; GERMAN, J. B. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: A mechanistic approach and future perspectives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2709–2727, 2014.

GLEISSMAN, H.; JOHNSEN, J. I.; KOGNER, P. **Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil?** **Experimental Cell Research**, 2010.

GLOBAL ORGANISATION FOR EPA AND DHA (GOED), 2014. Global recommendations for EPA and DHA intake (Rev 16 April 2014). <http://www.goedomega3.com/healthcare> (Accessed February 2015)

GOGUS, U.; SMITH, C. **N-3 omega fatty acids: a review of current knowledge** **International Journal of Food Science and Technology**, 2010.

GOUDA, M. K.; OMAR, S. H.; AOUAD, L. M. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1703–1711, 2008.

GOUVEIA, L. et al. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: A suitable renewable lipid source for biofuel production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 821–826, 2009.

GRAND VIEW RESEARCH - Omega 3 Market Analysis And Segment Forecasts To 2020. February 2014 | ISBN Code: 978-1-68038-079-8. <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/omega-3-market> (Accessed February, 2015)

GUL, K.; SINGH, A. K.; JABEEN, R. Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for Future World. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. February 2015, p. 00–00, 2015.

GUPTA, A.; BARROW, C. J.; PURI, M. Omega-3 biotechnology : Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1733–1745, 2012.

HAUVERMALE, A. et al. Fatty Acid Production in Schizochytrium sp. : Involvement of a Polyunsaturated Fatty Acid Synthase and a Type I Fatty Acid Synthase. v. 41, n. 8, p. 739–747, 2006.

HONDA, D. et al. Schizochytrium limacinum sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. **Mycological Research**, v. 102, n. 4, p. 439–448, 1998.

HONDA, D.; YOKOCHI, T.; NAKAHARA, T.; RAGHUKUMAR, S.; NAKAGIRI, A.; SCHAUMANN, K.; HIGASHIHARA, T. Molecular phylogeny of thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 46, 1999, pp. 637–647.

HONG, D. D.; ANH, H. T. L.; THU, N. T. H. Study on biological characteristics of heterotrophic marine microalga-schizochytrium mangrovei pq6 isolated from phu quoc island, kien giang province, vietnam. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 944–954, 2011.

HSIEH, C. H.; WU, W. T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3921–3926, 2009.

HUANG, C. et al. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4535–4538, 2009.

HUANG, C. et al. Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 711–714, 2012a.

HUANG, C. et al. Improving lipid production from bagasse hydrolysate with *Trichosporon fermentans* by response surface methodology. **New Biotechnology**, v. 29, p. 372–378, 2012b.

HUANG, C. et al. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 129–139, 2013.

HUANG, T. Y.; LU, W. C.; CHU, I. M. A fermentation strategy for producing docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 and increasing C22:6 proportions in total fatty acid. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 8–14, 2012a.

HUANG, T. Y.; LU, W. C.; CHU, I. M. A fermentation strategy for producing docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 and increasing C22:6 proportions in total fatty acid. **Bioresource technology**, v. 123, p. 8–14, nov. 2012b.

HUANG, Y. S.; PEREIRA, S. L.; LEONARD, A. E. Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Biochimie**, v. 86, p. 793–798, 2004.

IFFO, 2013. The Marine Ingredients Organisation: Fishmeal and Fish Oil Statistical Year- book 2013. IFFO ([online]. [www.iffo.net](http://www.iffo.net)).

INNIS, S. M. **Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain** *Brain Research*, 2008.

JANAKIRAM, N. B.; RAO, C. V. Role of lipoxins and resolvins as anti-inflammatory and proresolving mediators in colon cancer. **Current molecular medicine**, v. 9, p. 565–579, 2009.

JIANG, Y. et al. Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 1196–1200, 2004.

JOHNSON, M. B.; WEN, Z. Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass. **Energy and Fuels**, v. 23, n. 5, p. 5179–5183, 2009.

KALSCHEUER, R. et al. Analysis of storage lipid accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: Evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 918–928, 2007.

KAMLANGDEE, N.; FAN, K. W. Polyunsaturated fatty acids production by *Schizochytrium* sp . isolated from mangrove. **Songklanakar J. Sci. Technol**, v. 25, n. March 2003, p. 643–650, 2003.

KAWSAKUL, L.; YONGMANITCHAI, W.; CHONUDDOMKUL, D. Optimization of Growth and Production of Docosahexaenoic Acid Design and Central Composite Design with Response Surface Methodology. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, v. 46, p. 573–581, 2012.

KAZAMA, F. Y. Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp . Zoospores. **Archives of microbiology**, v. 83, p. 179–188, 1972.

KAZAMA, F. Y. ULTRASTRUCTURE OF THRAUSTOCHYTRIUM SP. ZOOSPORES. IV. EXTERNAL MORPHOLOGY WITH NOTES ON THE ZOOSPORES OF SCHIZOCHYTRIUM SP. **Mycologia**, v. 66, p. 272–280, 1974.

KIM, H. Y. Biochemical and biological functions of docosahexaenoic acid in the nervous system: modulation by ethanol. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 153, p. 34–46, 2008.

KITESSA, S. M. et al. DHA-containing oilseed: A timely solution for the sustainability issues surrounding fish oil sources of the health-benefitting long-chain omega-3 oils. **Nutrients**, v. 6, p. 2035–2058, 2014.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal**, v. 6, p. 52–63, 2014.

KUROSAWA, K. et al. High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production. **Journal of Biotechnology**, v. 147, p. 212–218, 2010.

LEE, J. H. et al. Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. **Nature reviews. Cardiology**, v. 6, p. 753–758, 2009.

LEIVA-CANDIA, D. E. et al. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. **Fuel**, v. 123, p. 33–42, 2014.

LI, J. et al. A strategy for the highly efficient production of docosahexaenoic acid by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 using glucose and glycerol as the mixed carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 51–57, 2015.

LI, Y.; ZHAO, Z. (KENT); BAI, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 312–317, 2007.

LIANG, M. H.; JIANG, J. G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 395–408, 2013.

LIANG, Y. et al. Bioresource Technology Use of sweet sorghum juice for lipid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3623–3627, 2010.

LIM, G. P. et al. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 12, p. 3032–3040, 2005.

LIU, J.; SUN, Z.; CHEN, F. Heterotrophic Production of Algal Oils. In: *Biofuels From Algae*. PANDEY, A.; LEE, D-J.; CHISTI, Y.; SOCCOL, C. R. (eds). Elsevier, USA, 2014, pp. 111-142.

MARIK, P. E.; VARON, J. **Omega-3 dietary supplements and the risk of cardiovascular events: A systematic review** **Clinical Cardiology**, 2009.

MARTINS, D. A. et al. Alternative sources of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in marine microalgae. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2259–2281, 2013.

MASSON, S. et al. Incorporation and washout of n-3 polyunsaturated fatty acids after diet supplementation in clinical studies. **Journal of cardiovascular medicine (Hagerstown, Md.)**, v. 8 Suppl 1, p. S4–S10, 2007.

MEESTERS, P. A. E. P.; HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 575–579, 1996.

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1–5, 2009.

METZ, J. G. et al. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 2001, p. 290–293, 2001.

MORITA, E. et al. Docosahexaenoic acid production and lipid-body formation in *Schizochytrium limacinum* SR21. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 319–327, 2006.

NAGANO, N. et al. Detection of genes involved in Fatty Acid elongation and desaturation in thraustochytrid marine eukaryotes. **Journal of oleo science**, v. 60, n. 9, p. 475–481, 2011.

NAKAI, R. et al. Genus-specific quantitative PCR of thraustochytrid protists. **Marine Ecology Progress Series**, v. 486, p. 1–12, 2013.

NIE, Z.-K. et al. Arachidonic acid-rich oil production by *Mortierella alpina* with different gas distributors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 30, p. 1127–1132, 2013.

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

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. **Current Microbiology**, v. 46, p. 398–402, 2003.

PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 287–291, 2004.

PATIL, K. P.; GOGATE, P. R. Improved synthesis of docosahexaenoic acid (DHA) using *Schizochytrium limacinum* SR21 and sustainable media. **Chemical Engineering Journal**, v. 268, p. 187–196, 2015.

PATTERSON, E. et al. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. **J Nutr Metab**, v. 2012, p. 539426, 2012.

PENG, X.-W.; CHEN, H.-Z. **Microbial oil accumulation and cellulase secretion of the endophytic fungi from oleaginous plants** *Annals of Microbiology*, 2007.

PLEISSNER, D. et al. Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 139–146, 2013.

PYLE, D. J.; GARCIA, R. A.; WEN, Z. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: Effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3933–3939, 2008.

QU, L. et al. Enhancement of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. using a two-stage oxygen supply control strategy based on oxygen transfer coefficient. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 22–27, 2011.

QU, L. et al. Batch, fed-batch and repeated fed-batch fermentation processes of the marine thraustochytrid *Schizochytrium* sp. For producing docosahexaenoic acid. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1905–1912, 2013.

QUILODRA, B. Evaluation of liquid residues from beer and potato processing for the production of docosahexaenoic acid ( C22 : 6n-3 , DHA ) by native thraustochytrid strains. p. 2121–2128, 2009.

RAGHUKUMAR, S. Ecology of the marine protists, the labyrinthulomycetes (thraustochytrids and labyrinthulids). **European Journal of Protistology**, v. 38, p. 127–145, 2002.

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

RATLEDGE, C. Microbial oils: an introductory overview of current status and future prospects. **Ocl**, v. 20, n. 6, p. D602, 2013.

RATLEDGE, C.; COHEN, Z. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? **Lipid Technology**, v. 20, n. 7, p. 155–160, 2008.

REN, L. J. et al. Utilization of cane molasses for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. CCTCC M209059. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 7, p. 787–789, 2013a.

REN, L. J. et al. Impact of phosphate concentration on docosahexaenoic acid production and related enzyme activities in fermentation of *Schizochytrium* sp. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 5, p. 1177–1183, 2013b.

ROSA, S. M. et al. Improvement of a two-stage fermentation process for docosahexaenoic acid production by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 applying statistical experimental designs and data analysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2367–2374, 2010.

RUIZ-LÓPEZ, N. et al. Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 7, p. 2397–2410, 2012.

SALEM, N.; EGGERSDORFER, M. Is the world supply of omega-3 fatty acids adequate for optimal human nutrition? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, p. 147–154, 2015.

SANTALA, S. et al. Improved triacylglycerol production in *Acinetobacter baylyi* ADP1 by metabolic engineering. **Microbial cell factories**, v. 10, p. 36, 2011.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Novel Functional Food Ingredients from Marine Sources. **Current Opinion in Food Science**, 2015.

SHIRASAKA, N. et al. Effect of cyanocobalamin and p-toluic acid on the fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycota). **Mycoscience**, v. 46, p. 358–363, 2005.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 233, p. 674–688, 2008.

SINCLAIR, A. J.; JAYASOORIYA, A. Nutritional aspects of single cell oils: applications of arachidonic acid and docosahexaenoic acid oils. In *Single Cell Oils*, COHEN, Z. AND RATLEDGE, C. (eds), AOCS Press, Champaign, IL, 2010, pp 351–368.

SONG, X. et al. Batch kinetics and modeling of DHA production by *S. limacinum* OUC88. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 26–30, 2010.

SONG, X.; ZANG, X.; ZHANG, X. Production of High Docosahexaenoic Acid by *Schizochytrium* sp. Using Low-cost Raw Materials from Food Industry. v. 2014, 2015.

SUN, L. et al. Differential effects of nutrient limitations on biochemical constituents and docosahexaenoic acid production of *Schizochytrium* sp. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 199–206, 2014.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Feed Matters: Satisfying the Feed Demand of Aquaculture. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 23, n. February, p. 1–10, 2015.

TAHA, A. I. B. H. M. et al. Growth optimization of thraustochytrid strain 12B for the commercial production of docosahexaenoic acid. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, p. 53–58, 2013.

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

TOCHER, D. R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. **Aquaculture**, 2015.

TSIGIE, Y. A. et al. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9216–9222, 2011.

UNAGUL, P. et al. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22:6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 281–287, 2007.

UTTARO, A. D. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in lower eukaryotes. **IUBMB life**, v. 58, n. October, p. 563–571, 2006.

VALENTINE, R. C.; VALENTINE, D. L. **Omega-3 fatty acids in cellular membranes: A unified concept** *Progress in Lipid Research*, 2004.

VAMVAKAKI, A. N. et al. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. *Engineering in Life Sciences*, v. 10, p. 348–360, 2010.

VENEGAS-CALERÓN, M.; SAYANOVA, O.; NAPIER, J. A. An alternative to fish oils: Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Progress in Lipid Research*, v. 49, n. 2, p. 108–119, 2010.

VIGANI, M. et al. Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology*, p. 1–12, 2015.

VOSS, I.; STEINBÜCHEL, A. High cell density cultivation of *Rhodococcus opacus* for lipid production at a pilot-plant scale. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 55, p. 547–555, 2001.

WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3 / 6 fatty acids : Alternative sources of production. v. 40, p. 3627–3652, 2005.

XUE, F. et al. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1699–1702, 2006.

XUE, F. et al. Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5923–5927, 2008.

XUE, F. et al. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6092–6095, 2010.

YAGUCHI, T. et al. Production of High Yields of Docosahexaenoic Acid. p. 5–8, [s.d.].

YAGUCHI, T. et al. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 74, p. 1431–1434, 1997.

YAMASAKI, T. et al. Utilization of Shochu distillery wastewater for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls using *Thraustochytrid*. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 102, n. 4, p. 323–327, 2006.

YOKOCHI, T. et al. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, p. 72–76, 1998.

YOKOCHI, T.; HONDA, D.; HIGASHIHARA, T. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. p. 72–76, 1998.

YOKOYAMA, R.; HONDA, D. Taxonomic rearrangement of the genus *Schizochytrium* sensu lato based on morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes): Emendation for *Schizochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and . **Mycoscience**, v. 48, p. 199–211, 2007.

YOUSUF, A. et al. Microbial conversion of olive oil mill wastewaters into lipids suitable for biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8630–8635, 2010.

YU, X. et al. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6134–6140, 2011.

ZHAO, X. et al. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 405–412, 2008.

ZHU, L. et al. Effects of culture conditions on growth and docosahexaenoic acid production from *Schizochytrium limacinum*. **Journal of Ocean University of China**, v. 7, n. 1, p. 83–88, 2008.

ZHU, L. Y.; ZONG, M. H.; WU, H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7881–7885, 2008.

ZHU, M.; YU, L.-J.; WU, Y.-X. An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpina*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 30, p. 75–79, 2003.