

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR RHODOTORULA MUCILAGINOSA EM BATELADA ALIMENTADA

Juliane Machado da Silveira¹

Renata Nunes Pereira²

Carlos André Veiga Burkert³

Joana da Costa Ores⁴

Resumo:

Os lipídios são importantes para diversos ramos da indústria, bem como na obtenção de biodiesel, utilizado como uma alternativa promissora em substituição aos combustíveis fósseis. Diante dessa necessidade, os óleos microbianos vêm sendo estudados como uma alternativa promissora de matéria-prima para este biocombustível, assim como para o uso em suplementos alimentares. Desta forma, o presente trabalho visa obter biomassa lipídica, avaliando diferentes estratégias de alimentação no cultivo em batelada alimentada da levedura silvestre *R. mucilaginosa* em meio à base de glicerol bruto. Os cultivos foram conduzidos em frascos agitados a 25 °C e 180 rpm, pH inicial de 4,5 e meio de cultivo composto por: 36,62 g L⁻¹ glicerol bruto, 5,0 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1,0 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 3,0 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O e 1,2 g L⁻¹ extrato de levedura). Duas estratégias de alimentação foram avaliadas para o processo em batelada alimentada: alimentação de 20 mL de meio em 48 h (B1) e alimentação de 20 mL de meio em 48 h e 10 mL em 96 h (B2), sendo que todas as alimentações foram 10 vezes mais concentradas que a do meio inicial. Além disso, também foi realizado o cultivo em batelada simples. Na batelada simples, os resultados obtidos para conteúdo lipídico, biomassa e lipídios totais produzidos foram de 42,9 ± 0,8 %, 8,16 ± 0,36 g L⁻¹, 3,50 ± 0,14 g L⁻¹ e 0,015 ± 0,001 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. O melhor resultado foi para batelada-alimentada com alimentação em 48 h de 20 mL de meio de cultivo, sendo obtidos valores de 42,0 ± 1,5 %, 13,42 ± 0,58 g.L⁻¹, 5,63 ± 0,11 g.L⁻¹ e 0,020 ±

Palavras-chave: Estratégias de alimentação; Lipídios microbianos; Glicerol bruto

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR RHODOTORULA MUCILAGINOSA EM BATELADA ALIMENTADA

¹ Aluno de graduação. julianemdasilveira@gmail.com. Autor principal

² Aluno de pós-graduação. renata.n.pereira@gmail.com. Co-autor

³ Docente. burkert@vetorial.net. Orientador

⁴ Aluno de pós-graduação. joanaores@gmail.com. Co-orientador



PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Rhodotorula mucilaginosa* EM BATELADA ALIMENTADA

1. INTRODUÇÃO

Os lipídios são importantes para diversos ramos da indústria, podendo ser utilizados na alimentação, como suplemento alimentar, bem como na obtenção de biocombustíveis, como o biodiesel. Atualmente, a principal matéria-prima para o biodiesel é de origem vegetal (ANP, 2016), instigando muitas discussões sobre a competitividade desta produção em detrimento do uso para alimentação humana (KOIZUMI, 2015). Desta forma, a busca por alternativas para produção desta matéria-prima por outras vias se torna atrativa, resultando em diversos estudos sobre a produção de lipídios microbianos (CHANG et al., 2013; LI.; ZHAO; BAI, 2007). Estes micro-organismos podem ser microalgas, leveduras oleaginosas, fungos filamentosos ou bactérias. Entretanto, as leveduras oleaginosas se sobressaem por apresentar uma alta taxa de crescimento, além de poderem assimilar uma vasta variedade de fontes de carbono (MOLINÉ; LIBKIND; BROOCK, 2012). O glicerol bruto, coproduto da produção de biodiesel, vem sendo utilizado em diversos estudos como principal fonte de carbono em cultivos microbianos, isto porque com a demanda crescente de biodiesel, há um aumento também da disponibilidade deste químico, sendo necessária a busca por alternativas para o seu uso. Neste contexto, Spier (2014) estudou a obtenção de lipídios pela levedura silvestre *Rhodotorula mucilaginosa* em batelada, utilizando como fonte de carbono o glicerol bruto proveniente da indústria de biodiesel.

Além da preocupação com a fonte de carbono do cultivo microbiano, é de interesse estabelecer condições que favoreçam o crescimento celular e o acúmulo de lipídios, como o modo de cultivo, que pode ser batelada, batelada alimentada ou contínuo. A diferença entre estes modos é a forma como se alimenta o biorreator. No processo em batelada alimentada, as alimentações são intermitentes. A vantagem de se utilizar o processo em batelada alimentada é a possibilidade de regular a alimentação do substrato, impedindo a ação inibitória do mesmo sobre o crescimento de biomassa e o acúmulo de lipídios (SHULER; KARGI, 2012).

Desta forma, o presente trabalho propõe avaliar diferentes estratégias de alimentação no cultivo em batelada alimentada da levedura silvestre *R. mucilaginosa* em meio à base de glicerol bruto, verificando os efeitos sobre a biomassa, o teor de lipídios e os lipídios totais produzidos.

2. METODOLOGIA

A levedura silvestre *R. mucilaginosa* foi utilizada no cultivo (OTERO, 2011), estando depositada na Fundação André Tosello (nº 7688). A mesma foi reativada em ágar YM (Yeast Malt), composto por 10 g L⁻¹ glicose, 5 g L⁻¹ peptona, 3 g L⁻¹ extrato de malte, 3 g L⁻¹ extrato de levedura e 20 g L⁻¹ ágar bacteriológico, incubando-se em estufa a 25 °C. A partir da raspagem de dois tubos da cultura

microbiana foi preparado o pré-inóculo, com a adição de 10 mL de água peptonada 0,1% em cada tubo, e posterior transferência para 180 mL de caldo YM contido em um frasco *Erlenmeyer*. Após incubação a 30 °C e 180 rpm em incubadora rotatória (Tecnal TE-424, Brasil), por 48 h, 20 mL de pré-inóculo foram transferidos para o inóculo, mantendo-se as mesmas condições de incubação, até atingir no mínimo 1×10^8 células mL⁻¹, pelo acompanhamento em câmara de Neubauer (SPIER, 2014).

O glicerol utilizado como fonte de carbono foi fornecido da empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo-RS.

O processo em batelada alimentada foi conduzido em frascos *Erlenmeyer* dispostos em incubadora rotatória a 25 °C e 180 rpm (Tecnal TE-424, Brasil), com volume inicial de meio de 200 mL, pH inicial de 4,5 e concentração de células de 10^7 células mL⁻¹. O meio de cultivo foi o proposto por Spier (2014): 36,62 g L⁻¹ glicerol bruto, 5,0 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1,0 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 3,0 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O e 1,2 g L⁻¹ extrato de levedura. As estratégias em batelada alimentada estabelecidas foram B1 e B2, onde B1 foi com alimentação de 20 mL de meio em 48 h e B2 foi com alimentação de 20 mL de meio em 48 h e 10 mL em 96 h, sendo que todas as alimentações foram 10 vezes mais concentradas que a do meio inicial. Além disso, também foi realizado o cultivo em batelada simples.

Para a determinação da biomassa, foi utilizado o método de Choi e Park (2003). Ao final do cultivo, os lipídios foram quantificados pelo método de Bligh e Dyer (1959), modificado por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001).

Os experimentos foram realizados em triplicata, empregando-se o teste de Tukey para verificação de diferenças significativas entre as condições de cultivo testadas, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

As curvas de crescimento microbiano estão apresentadas na Figura 1, onde as setas indicam as alimentações, observando-se claramente um prolongamento do crescimento microbiano nos cultivos em batelada alimentada em comparação com a batelada simples.

Os resultados obtidos para o processo em batelada simples para conteúdo lipídico, biomassa, lipídios totais produzidos e produtividade de lipídios foram $42,9 \pm 0,8$ %, $8,16 \pm 0,36$ g L⁻¹, $3,50 \pm 0,14$ g L⁻¹ e $0,015 \pm 0,001$ g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente (Tabela 1). A partir destes resultados, confirmou-se que não só a levedura *R. mucilaginosa* apresentou a capacidade de crescer em um meio contendo glicerol bruto como fonte de carbono, como também, a concentração de biomassa e os lipídios totais produzidos foram similares aos valores encontrados por outros pesquisadores. Li et al. (2010) verificaram que a levedura *R. mucilaginosa* TJY15a, quando cultivada em meio contendo hidrolisado de amido de mandioca como fonte de carbono, apresentou o maior acúmulo de lipídios (45,9% de conteúdo lipídico e 10,9 g L⁻¹ de concentração de biomassa) em relação a outras fontes de carbono.

Os resultados dos cultivos estão apresentados na Tabela 1. Os cultivos B1 e B2 apresentaram resultados iguais de lipídios totais e conteúdo lipídico ($p > 0,05$). Desta forma, o cultivo B1 pode ser visto como a melhor estratégia, uma vez que é possível afirmar que novas alimentações no meio não favoreceram um maior acúmulo de lipídios. O emprego desta estratégia de alimentação (B1) comparado ao cultivo em batelada (Tabela 1) representou um aumento de aproximadamente

64 % na biomassa, 61 % nos lipídios totais produzidos e 33 % na produtividade de lipídios. Este comportamento pode ser explicado pelo aumento da disponibilidade da fonte de carbono e nitrogênio, permitindo um maior crescimento microbiano. O mesmo foi observado por Saenge et al. (2011), que compararam o crescimento da levedura *R. glutinis* utilizando glicerol bruto em batelada e em batelada alimentada, verificando um aumento na produção de biomassa de 8,17 g L⁻¹ para 10,05 g L⁻¹, e também, consequentemente, um aumento nos lipídios totais de 4,33 g L⁻¹ para 6,10 g L⁻¹, sendo que em relação à produtividade o aumento foi de aproximadamente 46 %.

Tabela 1: Comparação dos cultivos em batelada simples e batelada alimentada.

Ensaio	Lipídios (%)	Lipídios totais (g L ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹)	Produtividade de lipídios (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Batelada	42,9 ^a ± 0,8	3,50 ^b ± 0,14	8,16 ^c ± 0,36	0,015 ^b ± 0,001
B1	42,0 ^a ± 1,5	5,63 ^a ± 0,11	13,42 ^b ± 0,58	0,020 ^a ± < 0,001
B2	42,5 ^a ± 2,5	6,72 ^a ± 0,79	15,76 ^a ± 1,00	0,023 ^a ± 0,003

B1: alimentação de 20 mL de meio em 48 h. B2: alimentação de 20 mL de meio em 48 h e 10 mL em 96 h. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias.

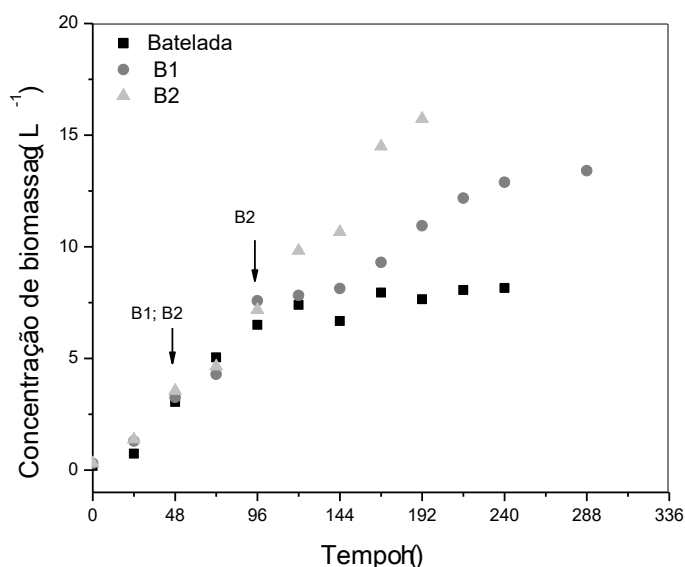


Figura 1. Curvas de biomassa x tempo. As setas representam os pontos de alimentação. B1: alimentação de 20 mL de meio em 48 h. B2: alimentação de 20 mL de meio em 48 h e 10 mL em 96 h.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferentes estratégias de alimentação foram avaliadas no cultivo de *R. mucilaginosa* em meio contendo glicerol bruto como fonte de carbono. Dentre estas, B1, correspondendo à alimentação de 20 mL de meio concentrado em 48 h, foi a que apresentou os melhores resultados, com incrementos de 64 % na concentração

de biomassa, 61 % nos lipídios totais produzidos e 33 % na produtividade de lipídios quando comparado com a batelada simples.

Desta forma, a produção de lipídios por *R. mucilaginosa* em batelada alimentada pode ser vista como uma alternativa promissora para a produção de óleos vegetais. Além disso, o uso de glicerol bruto como fonte de carbono demonstra que este processo pode agregar valor à cadeia produtiva do biodiesel.

5. REFERÊNCIAS

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Brasília – DF, Brasil. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 25 set. 2016.

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

CHANG, Y.; CHANG, K.; HSU, C.; CHUANG, L.; CHEN, C.; HUANG, F.; JANG, H. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corn cob hydrolysate for microbial oil production. Fuel, v. 105, p. 711–717, 2013.

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

KOIZUMI, T. Biofuels and food security. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 52, p. 829 – 841, 2015.

LI, M.; LIU, G. L.; CHI, Z.; CHI, Z. M. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. Biomass and Bioenergy, v. 34, p. 101 – 107, 2010.

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

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

MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; BROOCK, M. V. Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts. Methods in Molecular Biology, v. 898, p. 275–283, 2012.

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

SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROGGE, T.T.; BOURTOOM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 210–218, 2011.

SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess engineering*. 2nd ed. New York, Prentice Hall PTR, 2012. 553p.

SPIER, F. Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto gerado na síntese de biodiesel. 2014. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.