

## Produção de biomassa e bioóleo por *R. thoruloides* a partir de ácidos graxos voláteis.

### Biomass and bio oil production by *R. thoruloides* from volatile fatty acids

#### RESUMO

**George Betim de campos**  
[camposg@alunos.utfpr.edu.br](mailto:camposg@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade tecnológica federal do paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil  
**Dr. Eduardo Bittencourt Sydney**  
[eduardosydney@utfpr.edu.br](mailto:eduardosydney@utfpr.edu.br)  
Universidade tecnológica federal do paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

A sociedade atual vem sofrendo uma grande crise ecológica devido à utilização de combustíveis fósseis. A produção de biohidrogênio se mostra uma importante alternativa para esta problemática, porém, para sua produção se tornar viável economicamente é necessário reaproveitar os subprodutos gerados na fase líquida, sendo eles os ácidos graxos voláteis (AGVs). Visando reaproveitar esses AGVs, os microrganismos oleaginosos tem a capacidade de converter a fonte de carbono em lipídeos microbianos, e estes lipídeos podem ser utilizados na produção de biodiesel. Neste trabalho foi testada a utilização destes AGVs como fonte de carbono na fase de crescimento celular e de acúmulo de lipídeo da levedura *Rhodospiridium thoruloides*, eles apresentaram uma ação inibitória na fase de crescimento e um resultado melhor que a da glicose, fonte tradicional de carbono, na fase de acúmulo de lipídeos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leveduras oleaginosas. Lipídeos microbianos. AGVs..

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



#### ABSTRACT

Today's society has been suffering a major ecological crisis due to the use of fossil fuels. biohydrogen production is an important alternative to this problem, but for its production to become economically viable, it is necessary to reuse the liquid phase generated byproducts, such as volatile fatty acids (vfas). in order to reuse these vfAs, oilseed microorganisms have the ability to convert the carbon source into microbial lipids, and these lipids can be used in biodiesel production. in this work we tested the use of these vfAs as carbon source in the cell growth and lipid accumulation phase of *Rhodospiridium thoruloides*, they showed an inhibitory action in the growth phase and a better result than glucose, traditional carbon source in the lipid accumulation phase.

**KEYWORDS:** Oil yeast. Microbial lipids. VFAs.

## INTRODUÇÃO

A sociedade atual está vivendo uma imensa crise ecológica devido à utilização de combustíveis fósseis, com isso a busca por combustíveis renováveis e novas formas de produção vêm aumentando a cada dia (RAIZER; MEIRELLES, 2012).

O hidrogênio se mostra uma importante alternativa como combustível renovável, pois, ele possui alto valor energético por unidade de massa e sua combustão não libera gases do efeito estufa (FERNANDES, 2015). A sua produção pode ser via síntese química ou processos biológicos, entre os processos biológicos os mais estudados são fermentações clara e escura. A escura se destaca pela sua simplicidade, requerer menos energia e ter uma maior taxa de produção. Entretanto, para ela se tornar viável é necessário reaproveitar os subprodutos formados na fase líquida (SYDNEY et al., 2014).

Os microrganismos oleaginosos são capazes de converter fonte de carbono em lipídeos; as leveduras chegam a acumular valores superiores à 20% de sua biomassa seca. Alguns dos microrganismos oleaginosos são capazes de converter ácidos orgânicos diretamente em acetil-CoA, o principal intermediário da síntese de lipídeos. Isso é uma boa alternativa para a utilização dos ácidos orgânicos voláteis (AGVs) gerados na produção do hidrogênio, pois na produção de lipídeos por microrganismos oleaginosos 80% do valor do meio de cultivo é da fonte de carbono a glicose (FEI et al., 2011).

Visando utilizar os ácidos graxos voláteis gerados na produção de hidrogênio, a levedura *Rhodospiridium thurulooides* apresenta um grande potencial devido a sua característica de acumular lipídeos que podem ser utilizados na produção de biodiesel e outros bioprodutos de maior valor agregado. Tanto o hidrogênio como o biodiesel têm um papel fundamental em diversificar as fontes energéticas e diminuir o uso de combustíveis fósseis (SOCCOL et al., 2017).

Estudos utilizando ácido acético, um dos AGVs, como única fonte de carbono na fermentação da *Rhodospiridium thurulooides* obtiveram uma maior taxa de acúmulo de lipídeos comparado ao meio utilizando glicose (HUANG et al., 2016). Outro estudo utilizando microrganismo oleaginoso *Cryptococcus albidus* e uma combinação de AGVs como única fonte de carbono, formada por ácido acético, propiônico e butírico, aponta que a concentração ideal de AGVs é de 2g/L e níveis maiores levam a inibição do crescimento e acúmulo de lipídeos (CHRISTOPHE et al., 2012).

Com base no potencial da levedura *Rhodospiridium thurulooides* em aproveitar os AGVs gerados na produção de hidrogênio, este trabalho busca analisar a influência deles, na fase de crescimento celular e durante acúmulo de lipídeos, visando proporcionar um sistema integrado de produção de lipídeos microbianos com a produção de biohidrogênio por fermentação escura.

## METODOLOGIA

Para analisar o comportamento da *Rhodosporidium thoruloides* na presença dos AGVs durante a fase de crescimento, foi realizada a fermentação de 100 ml em Erlenmeyer de 250 ml. O meio de cultivo utilizado foi YM com acréscimo de AGVs, um sem AGVs sendo o branco..

O meio foi preparado sem a adição do AGVs e ajustado pH para 5 após foi levado para ser esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Os AGVs foram esterilizados separadamente também em autoclave a 121 °C por 15 minutos, em tubos vedados para evitar perda por evaporação durante o processo. Em fluxo laminar o AGV foi adicionado no meio utilizando micropipetas com ponteiros estéreis.

O inóculo utilizado foi preparado em um meio líquido de YM (peptona 5 g/L; extrato de levedura 3 g/L; extrato de malte 3 g/L; glicose 10 g/L) e adicionado 1 mL em cada Erlenmeyer em condições assépticas. O cultivo foi mantido em estufa a 30 °C sem agitação por 4 dias. Para analisar o crescimento celular foi realizado contagem de células em câmara Neubauer, no momento do inóculo e nos dias dois e quatro após inoculação.

AGVs testados foram: Ácido acético 1 g/L e 2 g/L. Ácido butírico 0,3 g/L; 0,5 g/L; 0,6 g/L; 0,8 g/L; 1 g/L e 2 g/L. Ácido láctico 1 g/L e 2 g/L. Ácido Succínico 0,5 g/L; 1 g/L; 1,5 g/L e 2 g/L. Fórmico 0,3 g/L; 0,5 g/L; 0,6 g/L; 0,8 g/L e 1 g/L..

Para análise da influência do ácido butírico durante a fase de acúmulo de lipídeos. Nesse experimento foi preparado 600ml de um cultivo mãe em meio YM (com oxigenação utilizando bomba de aquário) mantido até a fase de crescimento celular. Após a fase de crescimento celular, o cultivo mãe foi dividido em 6 cultivos. Em 5 foi adicionado ácido butírico nas concentrações de 0,5 g/L, 1,5 g/L, 2 g/L, 3 g/L e 6 g/L. No último foi adicionado 10 g/L de glicose.

Foi realizada a contagem de células em câmara Neubauer nos dias zeros, dois e quatro após adição de ácido butírico e glicose. Paralelamente à contagem de células foi realizado peso seco dos cultivos. Os tubos falcon foram secos por 24 horas em estufa de 80 °C e colocados em dessecador até atingirem a temperatura ambiente, para então serem pesados. Foram adicionados em cada tubo 20mL de amostra. Após centrifugação a 3500G por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e tubos foram levados para a estufa de 80 °C por 24 horas, após esse tempo foi levado para dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesados.

Para quantificar a produção de lipídeos, os cultivos tiveram seus pHs ajustados para 1 utilizando ácido sulfúrico e levados para aquecimento a 121 °C por 15 minutos. Após a digestão ácida foi feita extração líquido-líquido com clorofórmio. A fase com clorofórmio foi seca em estufa a 80 °C até peso constante.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

O ácido butírico teve uma ação inibitória no crescimento da levedura em concentração a partir de 1 g/L (tabela 1). Já os ácidos láctico, succínico e acético apresentaram bons resultados na etapa de crescimento tendo sua maior taxa de crescimento celular com 1 g/L. Na literatura indica melhor rendimento com 2 g/L para o ácido acético (FEI et al., 2011), isso pode ser uma variação entre diferentes cepas.

Tabela 1 – Numero de gerações entre dois dias. As concentrações com traço não foram testadas.

Concentração (g/L)	Acético	Butírico	Lático	Fórmico	Succínico
0,3	-	2,34	-	1,73	-
0,5	-	1,21	-	3,47	1,93
0,6	-	1,61	-	1,3	-
0,8	-	1,1	-	0,67	-
1	4,77	0	2,71	0	3,4
1,5	-	0	-	0	-
2	4,35	0	2,49	0	3,1

Fonte: Autoria própria (2019).

Visando a utilização dos resíduos produzidos nas fermentações anaeróbicas para produção de biohidrogênio, podemos concluir que aquelas que possuem uma concentração de ácido butírico superior 1 g/L não são viáveis para o crescimento celular de *R.thoruloides*. A tabela 2 e 3 apresentam os dados de produção de lipídeos após a fase de crescimento. Podemos observar que, diferentemente do efeito no crescimento, o ácido butírico é um substrato viável, superando a produtividade da glicose em todas as concentrações, sendo na concentração de 0,5 g/L seu maior rendimento. Na literatura não foram relatados dados sobre utilização de ácido butírico para cultivo da *R.thoruloides*.

Tabela 2 – Produção de lipídeos após a fase de crescimento.

Substrato	Peso seco antes (g)	Peso após extração (g)	Lipídeos produzidos (g/L)
Glicose 10g/L	0,0674	0,0979	0,38125
Butírico 0,5g/L	0,0567	0,0912	0,43125
Butírico 2g/L	0,0508	0,0819	0,38875
Butírico 3g/L	0,0514	0,1288	0,9675
Butírico 6g/L	0,0435	0,1703	1,585

Fonte: Autoria própria (2019).

Tabela 3 Produção de lipídeos relação a concentração de Carbono.

Concentração de Carbono	Lipídeos produzidos (g/L)	Produção de Lipídeo/substrato (g/g)
Glicose 4g/L	0,38125	0,095
Butírico 0,27g/L	0,43125	1,60
Butírico 1,01 g/L	0,38875	0,39
Butírico 1,64 g/L	0,9675	0,59
Butírico 3,2 g/L	1,585	0,49

Fonte: Autoria própria (2019).

## CONCLUSÕES

Este trabalho mostra o grande potencial na utilização do resíduo das fermentações anaeróbicas de produção de hidrogênio para a produção de lipídeos pela levedura *Rhodosporidium toruloides*. Enquanto a presença de ácido butírico foi altamente inibitória da produção biomassa, na fase de acúmulo sua presença resultou em um melhor rendimento quando comparado com a fonte tradicional a glicose (que é o nutriente mais caro do meio de cultivo). Este trabalho abre a oportunidade de se estudar uma proposta de integração de bioprocessos visando a produção de biocombustíveis gasosos (biohidrogênio) e líquidos (biodiesel a partir do óleo microbiano), contribuindo para a economia circular e para a substituição de combustíveis fósseis.

## REFERÊNCIAS

RAIZER, L.; MEIRELLES, M. Sociedade, energia e meio ambiente. v. II, p. 0–17, 2012.

FERNANDES, BRUNA SOARES. Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, n. 7, p. 4374–4381, 2015.

SYDNEY, E. B. et al. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. *Bioresource Technology*, v. 159, p. 380–386, 2014.

FEI, Q. et al. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, p. 2695–2701, 2011.

SOCCOL, C. R. et al. Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodosporidium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresource Technology*, v. 223, p. 259–268, 2017.

HUANG, X. F. et al. Culture strategies for lipid production using acetic acid as sole carbon source by *Rhodosporidium toruloides*. *Bioresource Technology*, v. 206, p. 141–149, 2016.

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. 1, p. 29–46, 2012.