

Produção de lipídeos por *R. Toruloides* em efluente sintético da produção de biohidrogênio

Production of lipids by *R. Toruloides* in synthetic effluent from biohydrogen production

RESUMO

George Betim de Campos
camposg@alunos.utfpr.edu.br
Universidade tecnológica federal do paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Eduardo Bittencourt Sydney
eduardosydney@utfpr.edu.br
Universidade tecnológica federal do paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

A sociedade atual vem sofrendo uma grande crise ecológica devido a utiliza o de combustíveis fósseis. A produ o de biohidrogênio se mostra uma importante alternativa para esta problemática, porem para sua produ o se tornar viável economicamente   necessário reaproveitar o efluente liquido gerado, ele   composto por subprodutos gerados da via metabólica sendo os de principal interesse os ácidos graxos voláteis (AGVs). Visando reutilizar o efluente gerado os microrganismos oleaginosos mostram grande potencial, pois têm a capacidade de converter a fonte de carbono em lipídeos microbianos, e estes lipídeos podem ser utilizados na produ o de biodiesel. Neste trabalho foi testado a utiliza o dos AGVs isolados e um fluente sintético como fonte de carbono na fase de crescimento celular e de acúmulo de lipídeo da levedura *Rhodospiridium toruloides*, eles apresentaram uma a o inibitória na fase de crescimento e o ácido butírico um resultado melhor que a da glicose, fonte tradicional de carbono, na fase de acúmulo de lipídeos.

PALAVRAS-CHAVE: Levedura. Oleaginosas. Biodiesel.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho est  licenciado sob os termos da Licen a Creative Commons-Atribui o 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Today's society has been experiencing a major ecological crisis due to the use of fossil fuels. The production of biohydrogen proves to be an important alternative to this problem, but for its production to become economically viable it is necessary to reuse the liquid effluent generated, it is composed of by-products generated from the metabolic pathway, with volatile fatty acids (VFAs) being of main interest. In order to reuse the effluent generated, oilseed microorganisms show great potential, as they have the ability to convert the carbon source into microbial lipids, and these lipids can be used in the production of biodiesel. In this work, the use of isolated VFAs and a synthetic fluent was tested as a carbon source in the cell growth and lipid accumulation phase of the yeast *Rhodospiridium toruloides*, they showed an inhibitory action in the growth phase and butyric acid a better result than the glucose, a traditional carbon source, in the lipid accumulation phase.

KEYWORDS: Yeast. Oilseeds. Biodiesel.



INTRODUÇÃO

Devido à grande crise ecológica que vivemos atualmente, gerada pelo uso de combustíveis fósseis, a procura o desenvolvimento de novos combustíveis e formas de sua produção sustentável vem aumentando a cada dia (RAIZER; MEIRELLES, 2012). Junto com a crise ecológica o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, definem um novo cenário para o século XXI e determinam que novas políticas referentes a fontes de energia sejam adotadas. Este novo cenário mundial possui o importante desafio de assegurar a geração de energia, sem causar maiores impactos ao meio ambiente (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

O hidrogênio possui um papel fundamental neste novo cenário para a geração de energia, pois ele possui alto valor energético por unidade de massa e sua combustão não libera os gases do efeito estufa (FERNANDES, 2015). Sendo ele utilizado tanto para geração de energia elétrica, em células a combustível, quanto para o transporte por motores a combustão interna. Porém deve ser considerada a matéria prima utilizada na sua produção, uma vez que ela pode ser oriunda de fontes renováveis ou não (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

A via de produção biológica do hidrogênio, o biohidrogênio, é muito promissora (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014). Entre os processos biológicos para a produção de biohidrogênio a fermentação anaeróbia se destaca pela sua simplicidade, requerer menos energia e ter uma maior taxa de produção (SYDNEY et al., 2014). Entretanto para ela se tornar viável economicamente é necessário reaproveitar o efluente líquido gerado. Este efluente líquido é composto principalmente por subprodutos secundários os ácidos graxos voláteis (AGVs), quadro 1 apresenta a concentração máxima dos AGVs presente em efluentes gerados na produção de biohidrogênio (FERNANDES, 2015).

Quadro 1. AGVs presentes no efluente da produção de biohidrogênio

AGVs	Concentração g/L
Ácido succínico	2,749
Ácido láctico	4,197
Ácido fórmico	1,393
Ácido propiônico	1,321
Ácido butírico	8,00
Ácido acético	4,709

Fonte: SYDNEY (2014).

Afim de reaproveitar este efluente como substrato para agregar valor ao processo de produção de biohidrogênio, pode se destacar o uso para os microrganismos oleaginosos. Estes possuem a capacidade de converter a fonte de carbono em lipídeos; as leveduras chegam a acumular valores superiores à 20% de sua biomassa seca. Alguns dos oleaginosos tem a característica de converter diretamente ácidos orgânicos em acetil-CoA, o principal intermediário na via metabólica da produção de lipídeos. Tal característica é importante pelo fato de o efluente possuir os AGVs (FEI et al., 2011).

Entres os microrganismos oleaginosos a *Rhodospiridium toruloides* apresenta um grande potencial devido a sua característica de acumular lipídeos que podem ser utilizados na produção 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 presente do efluente da produção de biohidrogênio, como fonte de carbono na fermentação da *Rhodospiridium toruloides* obtiveram uma maior taxa de acúmulo de lipídeos comparado a glicose (HUANG et al., 2016). Estudo com outro microrganismo oleaginosos *Cryptococcus albidus* utilizando como substrato uma mistura dos AGVs formado por ácido acético, propiônico e butírico, aponta que concentrações maiores de 2 g/L destes AGVs leva a inibição do crescimento celular e acúmulo de lipídeos.

Com base no potencial da levedura *Rhodospiridium thoruloides* em aproveitar os AGVs presentes no efluente da produção de hidrogênio, este trabalho busca analisar a influência deles em um meio sintético, 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 anaeróbia.

METODOLOGIA

Para analisar o comportamento da *Rhodospiridium toruloides* na presença dos subprodutos da produção de biohidrogênio, os 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 e 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; 0,5g/L; 0,6 g/L; 0,8g/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 0,3g/L; 0,5 g/L; 0,6g/L; 0,8g/L e 1 g/L.

Devido ao comportamento da produção dos lipídeos ser desassociada ao crescimento celular na *Rhodospiridium toruloides*, foi realizado o experimento de batelada alimentada. Nesse experimento foi preparado 600ml de meio YM ele foi inoculado de forma asséptica e mantido em estufa á 30°C e com oxigenação utilizando bomba de aquário até o número de células estar constante, fase

estacionaria. Após o crescimento celular, o cultivo foi dividido em 6 Erlenmeyer estéreis. 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. Para o cálculo da porcentagem de acúmulo de lipídios foi utilizado a equação 1.

$$\% \text{lipídeos} = \frac{\text{Lipídeos}}{\text{Biomassa seca}} \times (100) \quad (1)$$

Por fim, foi realizado o experimento de batelada alimentada para analisar o efeito da adição de um efluente sintético, composto por uma mistura de AGVs, após crescimento da *R. toruloides*, afim de analisar seu potencial como fonte de carbono na etapa de acúmulo de lipídeos. Nesse experimento foi preparado 5 Erlenmeyer com 100ml de meio YM, todos foram inoculados de forma asséptica e mantido em *shaker* a 28°C e com agitação de 140 rpm até o número de células estar constante, fase estacionaria. Após o crescimento celular, cada Erlenmeyer foi alimentado com uma porcentagem do meio sintético, apresentado na Quadro 2. Sendo 100%, 60%, 40%, 20% e o último foi alimentado com glicose 10 g/L. Após 5 dias foi feito a extração e quantificação dos lipídeos.

Quadro 2. Composição do meio sintético

AGVs	Concentração g/L
Ácido succínico	2,749
Ácido láctico	4,197
Ácido fórmico	1,393
Ácido butírico	8,00
Ácido acético	4,709

Fonte: Autoria própria (2020).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os AGVs isoladamente obtiveram resultados diferentes durante a fase de crescimento, apresentados no quadro 3, os dados com traço não obtiveram resultados. Entre eles os que obtiveram piores resultados foi o ácido butírico e o fórmico, apresentando inibição no crescimento celular com concentrações

maiores que 1 g/L, já os demais apresentaram bons resultados nesta etapa de crescimento celular. Segundo a literatura o melhor rendimento se apresenta com 2g/L, porém não foi observado isso durante esse experimento pode ser possíveis variações entre cepas diferentes.

Quadro 3. Taxa de crescimento de cada AGV

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 (2020).

Estes resultados mostram que a utilização do efluente produzidos na produção de biohidrogênio por via anaeróbica na etapa de crescimento não é viável, pois a concentração de ácido butírico é superior a 1g/L no efluente o que levaria a inibição do crescimento celular. Porém os resultados presentes no quadro 4 mostram que o ácido butírico é viável como substrato na fase de acumulo de lipídeos, obtendo valores melhores que o substrato mais utilizado a glicose, na literatura não foi encontrado testes utilizando apenas ácido butírico em batelada alimenta.

Quadro 4. Produção de lipídeos utilizando ácido butírico

Substrato	Biomassa seca (g/L)	Massa lipídeos (g/L)	Porcentagem acumulo de lipídeos
Glicose 10g/L	3,37	1,223	36,31
Butírico 0,5 g/L	2,835	1,14	40,21
Butírico 2 g/L	2,54	1,023	40,30
Butírico 3 g/L	2,57	1,61	62,64

Fonte: Autoria própria (2020).

No experimento utilizando efluente sintético o acumulo de lipídeos foi menor que o obtido utilizando apenas ácido butírico, isso pode ser devido a interferência negativa de outro AGV, os resultados estão apresentados no quadro 5. Pois com o aumento da concentração utilizada do efluente teve um menor acumulo de lipídeos.

Quadro 5. Produção de lipídeos utilizando ácido butírico

Substrato	Biomassa seca (g/L)	Massa lipídeos (g/L)	Porcentagem acumulo de lipídeos
Glicose 10g/L	3,37	1,223	36,31
Meio sintético 20%	5,505	0,5134	9,32

Substrato	Biomassa seca (g/L)	Massa lipídeos (g/L)	Porcentagem acumulo de lipídeos
Meio sintético 40%	4,905	0,2735	5,57
Meio sintético 60%	5,02	0,2212	4,40
Meio sintético 100%	5,05	0,1235	2,44

Fonte: Autoria própria (2020).

Devido a pandemia causada pelo Covid-19 não foi possível realizar mais testes previstos, como a análise química dos lipídeos produzidos com a utilização do efluente sintético.

CONCLUSÕES

Este trabalho mostra o potencial na utilização do efluente gerado na produção de biohidrogênio na produção de lipídeos pela levedura *Rhodospiridium toruloides*. Apesar de apresentar resultados inferiores no acumulo de lipídeos o efluente sintético, este trabalho abre a oportunidade de se estudar a melhor forma de reaproveitar os subprodutos gerados na fermentação anaeróbica da produção de lipídeos, pois o ácido butírico AGV com maior concentração no efluente apresentou um rendimento maior que o da glicose (substrato mais utilizado e mais caro do meio de cultivo). Além de criar uma proposta de integração dos bioprocessos visando a produção de biocombustíveis fósseis gasosos (biohidrogênio) e líquidos (biodiesel), contribuindo para economia circular e redução do uso de combustíveis fósseis.

REFERÊNCIAS

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

SÁ, Lívian R.; CAMMAROTA, Magali C.; FERREIRA-LEITÃO, Viridiana S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia-aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.

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 *Rhodospiridium 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 *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 141–149, 2016.