

## PRODUÇÃO DE RNA E DE BIOMASSA EMPREGANDO GLICEROL PROVENIENTE DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL: UM ESTUDO COMPARATIVO

**Thais S. S. Milessi, Ricardo de Freitas Branco e Silvio Silvério da Silva**

<sup>1</sup>Escola de Engenharia de Lorena - EEL USP/ Departamento de Biotecnologia, CP 116 - CEP: 12602-810 Lorena-SP, thais.milessi@alunos.eel.usp.br

**Resumo-** Quando submetida a devido tratamento, a glicerina residual da produção de biodiesel pode ser empregada como fonte de carbono para microorganismos visando a produção de insumos de valor agregado, como o ácido ribonucléico (RNA). Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* CCT 4086 e a produção de RNA em glicerol sintético e em glicerina residual de óleo misto de soja e algodão previamente tratada. Para isso, realizaram-se ensaios fermentativos utilizando como substrato glicerina tratada ou glicerol sintético, ambos com concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e sob as mesmas condições de temperatura e agitação (30°C e 200 rpm). Observou-se após 24h de fermentação uma concentração celular de 4,85 g.L<sup>-1</sup> no ensaio empregando a glicerina tratada, o que representou um crescimento celular 21% maior do que o observado no meio contendo glicerol sintético (4,0 g.L<sup>-1</sup>). Observou-se ainda uma maior obtenção de RNA utilizando-se a glicerina tratada. Tais resultados demonstraram a possível viabilidade técnica do emprego de glicerina tratada como fonte de carbono para o cultivo dessa levedura e obtenção de RNA.

**Palavras-chave:** Aproveitamento de subprodutos, sustentabilidade, biotecnologia, ribonucleotídeos.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas

### Introdução

A crescente busca por energias sustentáveis tem despertado um grande interesse mundial em fontes de energia limpa, como os biocombustíveis. (DEMIRBAS, 2009; RIVALDI *et al*, 2007). O biodiesel é visto como uma alternativa viável de combustível renovável, possuindo como principal via de produção a transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois, usando catalisador básico (MOTA *et al*, 2009; SILVA *et al*, 2009; MA *et al*, 1999). A Figura 1 apresenta um esquema da reação de transesterificação na produção de biodiesel.

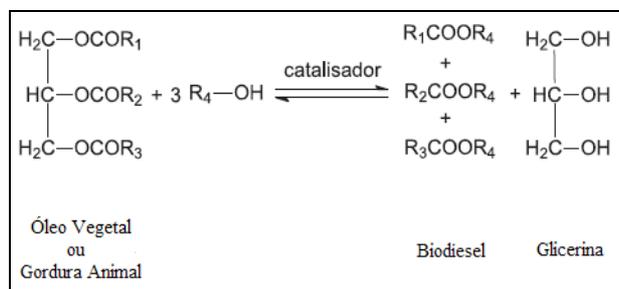


Figura 1- Reação global de transesterificação de triacilglicerídeos para produção de biodiesel.

O principal subproduto da produção de biodiesel é a glicerina, representando aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido (RIVALDI *et al*, 2007; DASARI *et al*, 2005; MA *et al*, 1999). Desta maneira, surge

a necessidade do desenvolvimento de novas vias de utilização deste composto uma vez que as indústrias que utilizam o glicerol não terão capacidade de absorver esse excesso de glicerina produzida (GONÇALVES *et al*, 2009).

Uma alternativa é o emprego do glicerol como substrato em processos fermentativos, uma vez que este composto pode ser utilizado como fonte de carbono sob condições aeróbicas por muitas espécies de microorganismos para produção de produtos de interesse comercial como ácido succínico e ácido propiônico (SILVA *et al* 2009; ARRUDA *et al*, 2007; WANG *et al.*, 2001; NEVOIGT, 1997). O termo glicerol refere-se ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados contendo pelo menos 95% de glicerol (MOTA *et al*, 2009; ARRUDA *et al*, 2007). A chamada glicerina loira é utilizada para a glicerina originada nos processos de produção de biodiesel, a qual normalmente é constituída de cerca de 80% de glicerol, além de água, metanol e sais dissolvidos (MOTA *et al*, 2009). Assim, para sua utilização em processos fermentativos necessita-se de tratamento prévio para remoção dos demais compostos (HAJEK e SKOPAL, 2010; ÇELIK *et al*, 2008).

Após passar por tratamento, o glicerol recuperado alcança concentrações superiores a 80 % (m.m<sup>-1</sup>), podendo então ser utilizado como substrato na obtenção de diversos produtos de alto interesse comercial, como os ribonucleotídeos (RIVALDI *et al*, 2007).

Os Ribonucleotídeos (RNA) são moléculas que ganharam importância nas últimas décadas devido às suas propriedades funcionais, sendo empregados principalmente nas indústrias alimentícias como realçador de sabor e nas indústrias farmacêuticas na composição de medicamentos devido ao pequeno efeito colateral se comparado com medicamentos tradicionais (RIVALDI, 2008; NORDAM *et al*, 2006 ; DAVIS *et al*, 1999).

Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus var lactis* CCT 4086 em glicerina tratada proveniente da produção de biodiesel a partir de óleo misto de soja e algodão, assim como a produção de RNA durante o processo.

## Metodologia

**Matéria prima e tratamento do glicerol bruto:** Utilizou-se glicerina gentilmente cedida pela Usina de Biodiesel Bioverde Indústria e Comércio de Biocombustíveis Ltda, localizada na cidade de Taubaté/SP.

A glicerina foi submetida a tratamento de acordo com metodologia determinada por Rivaldi (2008). Adicionou-se ácido fosfórico 85% sob aquecimento (70°C) e agitação constante, visando separar sabão e outras impurezas e neutralizar o excesso de NaOH utilizado como catalizador no processo de transesterificação. Ao observar-se a formação de duas fases, uma contendo glicerol e outra ácidos graxos, a mistura foi colocada em um funil de separação e decantada por 12h, período após o qual o glicerol foi obtido.

**Microorganismo e preparo do inóculo:** Foi utilizada a linhagem de levedura *Kluyveromyces marxianus var lactis* CCT 4086, proveniente da coleção de culturas do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (EEL-USP) e mantida em meio ágar extrato de malte à 4°C.

Tabela 1 – Composição do meio de inóculo.

Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Glicerol	10,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,021
Extrato de levedura	3,0

O inóculo foi preparado por cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50

mL de meio sintético com composição conforme Tabela 1.

As células foram cultivadas em incubadora com movimento rotatório por 24h a 200 rpm e 30° C.

**Fermentações:** Foram realizados ensaios fermentativos em duplicata em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50mL de meio com composição apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição do meio de fermentação.

Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Glicerol	30,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05
Extrato de levedura	3,0

A concentração de inóculo inicial utilizada foi de 0,01 g.L<sup>-1</sup> de células, as quais foram cultivadas em incubadora com movimento rotatório a 200 rpm e 30° C. Avaliou-se as concentrações de biomassa e de ribonucleotídeos nas primeiras 24h de cultivo.

**Rompimento celular e extração de RNA:** As células microbianas foram rompidas sob agitação em vórtice com auxílio de pérolas de vidro em tubos cônicos de 15 ml de volume útil sob condições de rompimento pré-determinadas por Gurpilhares (2006).

**Quantificação da Concentração celular:** A concentração de células livres foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro (BECKMAN 640B), a 600 nm, e correlacionada com o peso seco de células (g.L<sup>-1</sup>) através de uma curva de calibração correspondente. As medidas foram feitas em suspensões celulares devidamente diluídas, após centrifugação, lavagem e ressuspensão das células em água destilada.

**Quantificação de glicerol:** A determinação das concentrações de glicerol foi verificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo SCHIMADZU-LC 10 AD (Kyoto – Japão), equipado com coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), acoplado a um detector de índice de refração RID-6A, com eluente ácido sulfúrico 0,01N a um fluxo de 0,6 µl/min, temperatura da coluna de 45 °C e volume de amostra injetado de 20µl.

**Quantificação de ribonucleotídeos (RNA):** A determinação de RNA foi realizada pelo método do Orcinol de acordo com a metodologia descrita por Herbert *et al* (1977) e modificada por Rivaldi (2008).

## Resultados

Foram realizados ensaios fermentativos com a levedura *Kluyveromyces marxianus* empregando como substrato glicerol sintético ou glicerina tratada proveniente da produção de biodiesel. Comparou-se o crescimento de celular, a produção de RNA e o consumo de glicerol entre os diferentes substratos. A Figura 2 apresenta o crescimento de biomassa em função do tempo de fermentação observados em glicerol sintético e em glicerina previamente tratada.

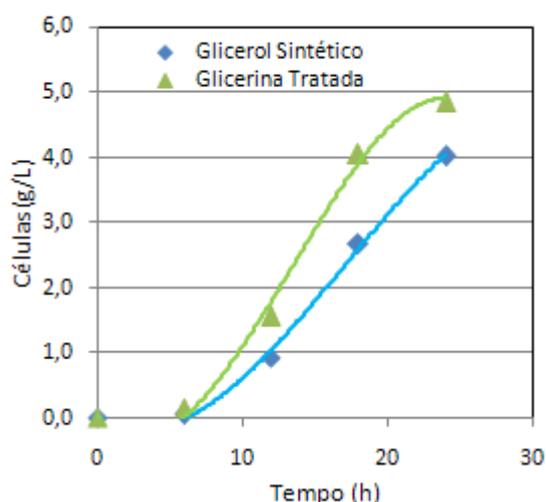


Figura 2- Crescimento celular em função do tempo de fermentação.

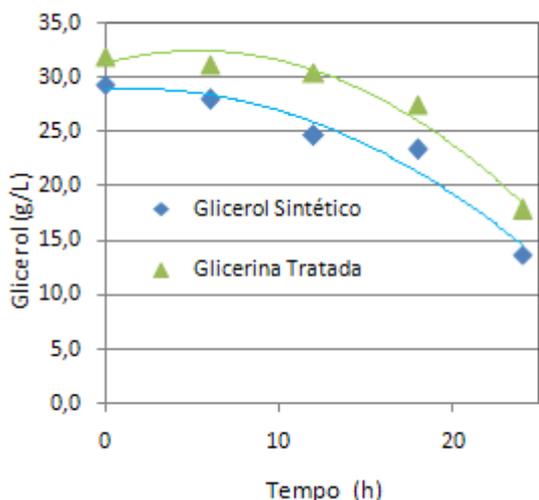


Figura 3- Concentração de glicerol

O consumo de glicerol durante os ensaios fermentativos encontra-se na Figura 3, na qual pode-se observar que em ambos os casos, com glicerina tratada e glicerol sintético, houve a presença de glicerol residual após o fim do processo.

A produção de RNA observada assim como a conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), a conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ), e as taxas de consumo de substrato, crescimento de biomassa e formação de produto ( $Q_s$ ,  $Q_x$  e  $Q_p$  respectivamente) encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Produção de RNA e Parâmetros fermentativos

Substrato	RNA mg/g <sub>cél</sub>	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Q_p$	$Q_x$	$Q_s$
Glicerol Sintético	3,4	0,26	0,21	0,14	0,16	0,65
Glicerina de biodiesel	5,2	0,34	0,37	0,21	0,20	0,59

\* $Q_x$ ,  $Q_p$  e  $Q_s$  encontram-se em  $g.L^{-1}.h^{-1}$

Observou-se que a produção de RNA assim como os valores dos parâmetros fermentativos foram superiores aos encontrados no ensaio empregando glicerol sintético.

### Discussão

Em 24h de processo houve um crescimento superior da levedura no ensaio envolvendo glicerina tratada do que no ensaio com glicerol sintético como substrato. Observou-se após 24h de fermentação uma concentração celular de  $4,85 g.L^{-1}$  com glicerina tratada, o que representou um crescimento celular 21% maior do que a concentração de  $4,0 g.L^{-1}$  observada no meio contendo glicerol sintético. Tal fato pode ser atribuído à formação de sais durante o tratamento da glicerina, os quais funcionam como nutrientes que beneficiam o crescimento microbiano. (HÁJEK *et al* 2010)

Observou-se em glicerina tratada uma produção de RNA de  $5,2 g.mg_{células}^{-1}$ , enquanto para o glicerol sintético foram produzidas  $3,4 g.mg_{células}^{-1}$ . Tal valor ( $5,2 g.mg_{células}^{-1}$ ) foi consideravelmente próximo ao valor de  $6,3 g.mg_{células}^{-1}$  descrito por Belem e Lee (1999) durante fermentação de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 28244 em soro de queijo, e semelhante a observada por Rivaldi (2008) que obteve  $5,17 g.mg_{células}^{-1}$ .

Ao final dos ensaios fermentativos observou-se glicerol residual em ambos os ensaios. Tal comportamento foi também observado por Liang *et al* (2010), Pyle (2008) e Rivaldi (2008). Uma possível explicação abordada por estes autores está no fato do catabolismo do glicerol ser dependente de altas concentrações de oxigênio

dissolvido no meio, ou ainda ao consumo das fontes de nitrogênio, os quais podem se tornar fator(es) limitante(s) para o consumo de glicerol.

Tanto a conversão de substrato em células ( $Y_{X/S} = 0,34$ ) quanto a conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S} = 0,37$ ) e a taxa de crescimento ( $Q_x=0,20$ ) foram superiores no ensaio empregando glicerina tratada. Pyle (2008) obteve o mesmo comportamento para *Schizochytrium limacinum* em glicerol derivado da produção de biodiesel, tal fato pode ser atribuído ao maior crescimento microbiano observado em glicerina tratada. Observou-se também que a taxa de consumo de glicerol ( $Q_s$ ) foi próxima em ambos os ensaios, demonstrando que a levedura não sofreu inibição pelo uso de glicerina tratada nas condições utilizadas como substrato. Tais resultados evidenciam a viabilidade deste composto como substrato em processos fermentativos.

### Conclusão

A glicerina tratada apresentou resultados satisfatórios de produção de RNA e biomassa e superiores aos observados no glicerol sintético, demonstrando seu potencial como fonte de carbono, alternativa e sustentável, para o crescimento dessa levedura e na obtenção de RNA

### Agradecimentos

Agradecimentos à Pró-reitoria da Universidade de São Paulo (USP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### Referências

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica, **Revista Analytica**, v.26, p. 56-62, 2007.

BELEM, M.A.F.; LEE, B.H. Fed-batch fermentation to oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Process Biochemistry**, v.34, p. 501-209, 1999.

ÇELIK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; ÇALIK, P. Use of Biodiesel Byproduct Crude Glycerol as the Carbon Source for Fermentation Processes by Recombinany *Pichia pastoris*, **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.47, p.2985-2990, 2008.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol, **Applied Catalysis**, v.281, p.225-231, 2005.

DAVIS, R.H.; BRECKENRIDGE, N.C. Modeling of repeated-batch transcription for production of RNA, **Journal of Biotechnology**, v.71, p. 25-37, 1999.

DEMIRBAS, A. Biofuels securing the planet's future energy needs, **Energy Conversion and Management**, v.50, p.2239-2249, 2009.

GONÇALVES, B.R.L.; PEREZ, L.; ÂNGELO, A.C.D. Glicerol: Uma Inovadora Fonte de Energia Proveniente da Produção de Biodiesel, Anais do 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production, São Paulo, Brasil, 2009.

GURPILHARES, D.B.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using statistical experimental design, **Process Biochemistry**, v.41, p. 631-637, 2006.

HÁJEK, M.; SKOPAL, F. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production, **Bioresource Technology**, v.101, p.3242-3245, 2010.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y.; BLACKBURN, J.W. Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation, **Bioresource Technology**, v.101, p. 6745-3750, 2010.

MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review, **Bioresource Technology**, v.70, p.1-15, 1999.

MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel, **Química Nova**, v.32, p.639-648, 2009.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p.231-241, 1997.

PYLE, D.J. Use of Biodiesel-derived crude glycerol for the production of Omega-3 polyunsaturated fatty acids by microalga *Schizochytrium limacinum*. Dissertação de mestrado apresentada a Virginia Polytechnic Institute and State University, 2008.

RIVALDI, J. D. Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para obtenção de biomassa e ribonucleotídeos. Dissertação de mestrado apresentada à Escola de Engenharia de Lorena, 2008.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILLO, R.;  
SILVA, S. S. Glicerol de Biodiesel. **Biotec. Ciên. e  
Desenvolvimento**, v. 37, p.44-51, 2007.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol:  
A promising and abundant carbon source for  
industrial microbiology, **Biotechnology Advances**,  
v.27, p.30-39, 2009.

WANG, Z.; ZHUGE, J.; FANG, H; PRIOR, B.A.  
Glycerol production by microbial fermentation: A  
review, **Biotechnology Advances**, v.19, p. 201-  
223, 2001.