

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO DE *Rhodosporidium thorulopsis* CULTIVADA EM BIORREATOR

Laís Sonnewend, Maria Antonia de Mello E Albuquerque Barboza, Thainá Barbosa de Lima Cordeiro, Rafaela Couto, Juçara Cristina Pereira Sousa, José Geraldo da Cruz Pradella.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, mariaantonialbu@gmail.com, laissonne_@hotmail.com.

Resumo

A busca pelo uso de combustíveis mais sustentáveis que não causem tanto dano ambiental quanto os combustíveis fósseis está cada vez maior. Assim, uma alternativa para essa questão está na geração de combustíveis através de microrganismos oleaginosos, como a *Rhodosporidium toruloides*, que possuem uma característica de serem economicamente mais vantajosos que as oleaginosas vegetais, como a soja. Para a quantificação da concentração celular e de açúcar foi utilizado o espectrofotômetro com a calibração específica para cada um desses parâmetros. Por meio desses ensaios pode-se ter a percepção que a *Rhodosporidium toruloides* apresenta um desenvolvimento ótimo definido, de temperatura, pH, oxigênio, nitrogênio, açúcar e pressão, e como a mudança de um fator, o pH, interfere em seu desenvolvimento.

Palavras-chave: *Rhodosporidium toruloides*. Crescimento. Biorreator.

Área do Conhecimento: Microbiologia.

Introdução

A descarbonização do transporte aéreo é uma preocupação crescente e, entre outras medidas, a necessidade de Combustíveis de Aviação Sustentáveis (SAF - Sustainable Air Fuel) a custo compatível é um potencial que tem chamado atenção das áreas de pesquisa e industrial. Rotas de produção para este biocombustível tem sido proposta a partir de diferentes insumos agrícolas como óleos vegetais, bioetanol e biomassa vegetal. (<https://blogs.worldbank.org/transport/decarbonizing-air-transport-sustainable-aviation-fuels-are-vital-growth>, consultado em 10/07/2023), que utilizam rotas catalíticas químicas.

A rota HEFA (Hydroprocessing of Esther and Fatty Acid) utiliza óleo vegetal, mais comumente óleo de palma e óleo de soja, como matéria-prima e possui rendimentos da ordem 0,94 a 0,98 L de biocombustível / L de óleo vegetal, contemplando duas etapas de hidrogenação seguida de fracionamento a Querosene de Aviação Renovável (QAvR) (SHAHER ET AL. 2023).

A demanda de QAv de nosso país é estimada em cerca de 160 a 170 milhões de litros/ano). A potencial dificuldade em relação ao uso destas matérias-primas reside no seu valor de mercado, que impõem um alto custo de produção quando comparados ao QAv sintético de petróleo. Os valores indicam que a produção pela rota HEFA, embora possam atingir altos valores de conversão, possuem custo de produção da ordem de US\$ 1500 a 1800 / tonelada levando-se em conta somente o valor da matéria-prima, muito acima, portanto, do preço de venda do QAv sintético, que tem variado em torno de US\$ 700-800 / tonelada (CNPq Processo 407946/2022-5).

Por outro lado, o uso de leveduras oleaginosas que possam utilizar resíduos agroindustriais como matéria-prima para sua biossíntese tem sido preconizado como uma alternativa aos óleos vegetais, podendo potencialmente baratear o custo produção de QAvR e contribuir para minimização de impactos ambientais produzidos pelos resíduos.

Todos os microrganismos são capazes de sintetizar lipídeos, embora somente linhagens de microrganismos oleaginosos apresentem a capacidade de acumular no citoplasma quantidades significativas de lipídeos em relação à biomassa seca (> 30%). Estudos demonstram que

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

microrganismos oleaginosos não possuem um sistema hiperativo de biossíntese de ácidos graxos, mas sim uma capacidade significativa de produzir altas taxas de acetil-CoA, unidade básica de biossíntese de ácido graxos. A síntese de acetil-CoA e, conseqüentemente, triglicerídeos ou triacilgliceróis (TAG) ocorre pela limitação extracelular principalmente de nitrogênio e/ou fósforo, canalizando o excesso de acetil-CoA formado para o acúmulo citoplasmático de lipídeos em leveduras oleaginosas (PAPANIKOLAOU et al., 2011).

Os lipídeos, particularmente os triglicerídeos, produzidos por esses microrganismos, tem despertado por isso grande interesse econômico e industrial com potencial para uso como matéria-prima na produção de biocombustível (ABELN e CHUCK, 2021).

O presente trabalho faz parte de projeto desenvolvido no Laboratório de Bioprocesso da UNIVAP (CNPq Processo 407946/2022-5) que visa a produção de QAvR a partir da fração orgânica do lixo urbano. Neste trabalho foi efetuado ensaios biorreatores em meio definido para estabelecimento dos principais parâmetros de crescimento da levedura *Rhodospiridium toruloides*, microrganismo previamente selecionado como potencial produtor de lipídeos em meio de cultura industrial de melaço de cana-de-açúcar (VIEIRA et al. 2014).

Metodologia

Trata-se de um estudo quantitativo realizado com levedura *Rhodospiridium toluroides*, para isso foi analisado aspectos do crescimento celular em meio definido (Tabela 1). Desta maneira o cultivo da levedura foi executado nas etapas denominadas: pré-inóculo, inóculo e crescimento em biorreator de bancada de 5L.

Tabela 1 – Composição do Meio Definido (MD)

Reagente	Fórmula	Concentração (g/L)
Cloreto de Cálcio	CaCl ₂	0,02
Cloreto de Ferro III	FeCl ₃	0,01
Cloreto de Sódio	NaCl	1,00
Extrato de levedura	-----	2,00
Fosfato de Sódio	NaH ₂ PO ₄	1,00
Fosfato Monopotássio	KH ₂ PO ₄	1,00
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	40,00
Sulfato de Amônio	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄	2,00

Fonte: o autor.

Pré-Inóculo

Para preparação do pré-inóculo foi feita a semeadura de 0,2 ml do microrganismo, *Rhodospiridium toluroides*, que se encontrava estocado com 0,2 ml de glicerol à -20°C, em erlenmeyer de 250 ml com 50 ml do meio de cultura Sabouraud Dextrose previamente esterilizado. Os frascos inoculados foram levados a incubador rotativo a 180 rpm a temperatura de 29°C por 48 horas.

Inóculo

Em seguida transferiu-se cerca de 50 mL do pré-inóculo para frasco Erlenmeyer de 2L contendo 400mL de meio MD (Tabela 1) procedendo-se novamente incubação em agitador rotativo como descrito por 48h

Biorreator de bancada

O biorreator com 3L do meio MD foi controlado a partir do software residente para controle automático dos principais parâmetros do do processo temperatura a 28°C, O₂ dissolvido acima de 20% da saturação e pH entre 7,5-8,0 (ensaios JET04) e 5,5-6,0 (ensaio JET05).

Métodos analíticos

A concentração celular e a concentração de açúcares foram efetuadas ao longo dos experimentos JET04 e JET 05 em amostras assepticamente retiradas do Biorreator de 5L. A determinação da concentração de açúcares redutores totais foi efetuada pelo método do reagente ácido 3-5

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

dinitrossalicílico (DNS) em espectrofotômetro a 540 nm e curva de calibração anteriormente construída. A concentração celular foi efetuada pela medida da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm da suspensão celular, após diluição da amostra e computando-se concentração celular mediante curva de calibração previamente construída.

Cálculo dos parâmetros μ_x e $Y_{X/AR}$

A velocidade específica de crescimento (μ_x) foi avaliada em fase exponencial de crescimento pela regressão linear do logaritmo natural da relação X/X_0 ($\ln(X/X_0)$) contra tempo de cultivo (t), onde X_0 é a concentração de células a $t=0$ e X é a concentração de células ao longo do tempo. O coeficiente angular da regressão linear obtida é a velocidade específica de crescimento (μ_x).

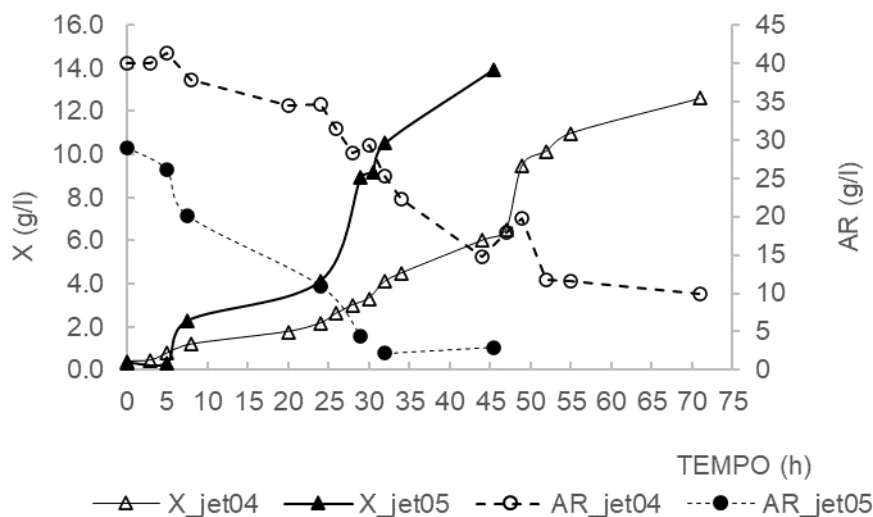
O fator de conversão de açúcar redutor a células ($Y_{X/AR}$) foi avaliado pela regressão linear da relação ($\Delta X = X - X_0$) contra a relação ($\Delta AR = AR_0 - AR$) onde AR_0 é a concentração de açúcar redutor a $t=0$ e AR é a concentração de açúcar redutor ao longo do tempo. O coeficiente angular da regressão linear obtida é o fator de conversão de açúcar redutor a células ($Y_{X/AR}$).

Resultados

Os resultados dos ensaios realizados ensaio JET04 e JET05 estão abaixo apresentados.

A Figura 1 mostra a evolução da concentração de células (X) e de açúcares redutores (AR) ao longo do tempo para os ensaios JET04 e JET 05.

Figura 1 - Evolução do crescimento celular e consumo de açúcar redutor no cultivo de *Rhodospiridium toruloides* em biorreator de laboratório (5L de volume total) e meio cultura definido.



Observa-se que os ensaios JET04 e JET05 atingiram concentração final e tempo final de respectivamente 12 g/L em 70h e 14 g/L em 45h. O açúcar redutor aportado ao sistema foi consumido a valor acima de 85% restando cerca de 10 g/L e 3 g/L, respectivamente, para os ensaios JET04 e JET05. O teor de O_2 dissolvido controlado automaticamente pela variação da velocidade de agitação, ficou acima de 30% da saturação para os 2 ensaios. O pH controlado pela adição automática de solução aquosa de NaOH e H_2SO_4 a 4M, variou entre 7,5 a 8,0 para o ensaio JET04 e entre 5,5 a 6,0 para o ensaio JET05 (dados não mostrados).

Os dados levantados permitiram o cálculo de velocidades específicas de crescimento μ_x mostradas na Figura 2 e do fator de conversão e $Y_{X/AR}$ apresentado na Figura 3.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 2 - Relação do $\ln(X/X_0)$ contra tempo de cultivo para crescimento de *Rhodospiridium toruloides* em biorreator de laboratório (5L de volume total) e meio cultura definido.

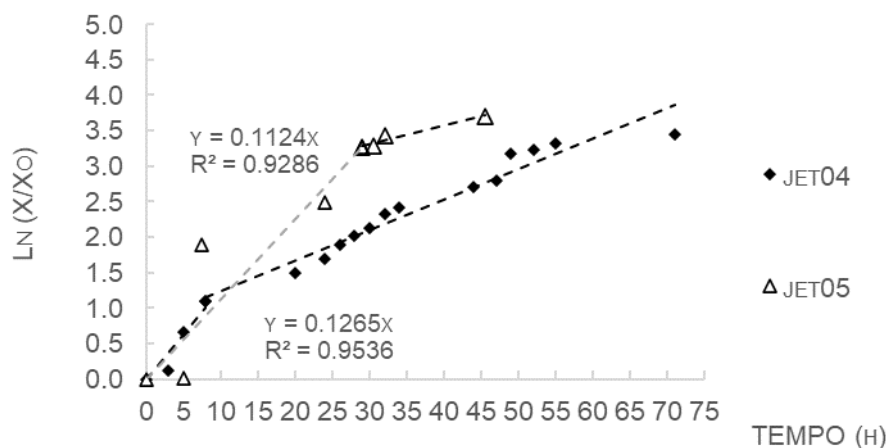
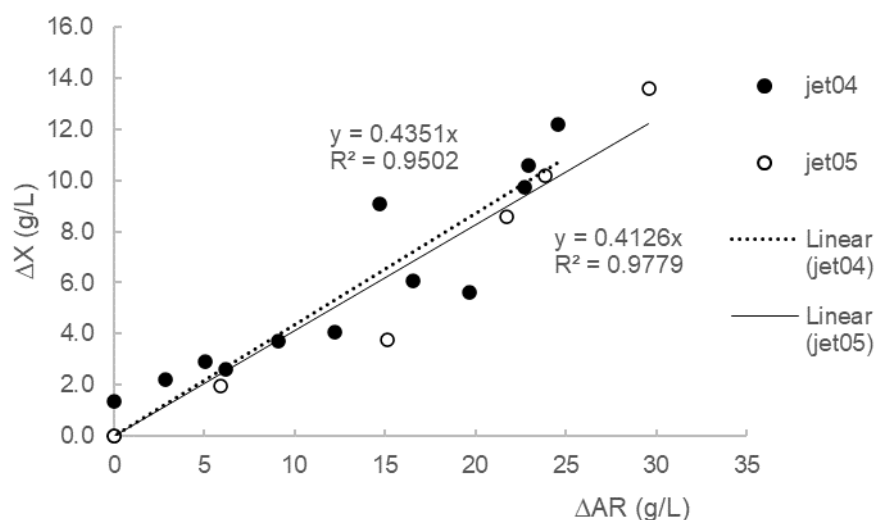


Figura 3 - Relação da variação do crescimento celular ΔX e variação da concentração de açúcar redutor (ΔAR) para crescimento de *Rhodospiridium toruloides* em biorreator de laboratório (5L de volume total) e meio cultura definido.



Discussão

O crescimento de *Rhodospiridium toruloides* no experimento JET05, quando comparado a JET04, ocorreu de forma mais rápida, não havendo, entretanto, muita diferença em consumo de glicose demonstrando em ambos experimentos grande aproveitamento das células deste substrato (Figura 1).

Por outro lado, embora as velocidades específicas de crescimento dos ensaios tenham sido iguais a cerca de $0,4 \text{ h}^{-1}$, o ensaio JET 04 mostrou uma fase de crescimento exponencial nesta velocidade substancialmente mais curta que no ensaio JET, respectivamente de 10 h e 30 h.

Segundo a literatura, para que *Rhodospiridium toruloides*, tenha o pH favorecido para crescimento é necessário que este esteja na faixa de 5,5 a 6,0 (ABELN e CHUCK; 2021). Durante esta fase é

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

importante que o pH esteja neste intervalo para que o crescimento microbiano seja maximizado. Os ensaios demonstraram uma diferença significativa nestes valores.

O pH manteve-se no intervalo de 7,5 a 8,0 para o experimento JET04 e entre 5,5 a 6,0 para o ensaio JET05, podendo ter influenciado no metabolismo enzimático, resultando, em consequência, na mudança precoce da velocidade de crescimento no ensaio JET04.

Contudo, mesmo com estas alterações, houve crescimento celular significativo nos experimentos alcançando-se valores de cerca de 15 g/L, embora a tempos de cultivo bem diferenciados.

Diferente deste fato observado entre os ensaios JET 04 e JET 05, a Figura 3 mostra que rendimento da produção celular, expresso pelo fator de conversão de açúcar redutor a células ($Y_{X/AR}$) não sofreu alteração significativa durante os ensaios alcançando valor de, respectivamente, 0,43 e 0,41 g de células formadas por g de carboidrato consumido, e consumo deste substrato aportado ao sistema acima de 85%, restando no biorreator 10g/L no ensaio JET04 e 3 g/L no ensaio JET05.

Conclusão

Em conclusão o crescimento da linhagem em estudo no meio de cultura e condições de cultura proposto mostrou-se adequado e coerente com dados da literatura.

Importante de destacar que o controle de pH durante o procedimento deve ficar dentro do intervalo de controle entre 5,5 a 6,0, como proposto na literatura.

Os outros parâmetros utilizados no processo (temperatura entre 28 °C a 29°C, concentração de O₂ dissolvido entre 20% a 30% do valor de saturação) são adequados ao processo que conduziu a crescimento exponencial com velocidade específica de crescimento de 0,11 h⁻¹ até cerca de 30h de cultivo e fator de conversão de glicose a células de 0,41-0,43 g/g neste período.

Referências

ABELN, F.; CHUCK, C. J. The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microbial Cell Factories*, v. 20, n. 1, p. 1-31, 2021.

SCHAFER, A.; ABATE, MEGERSA A. E.; SCHLUMBERGER C. Decarbonizing air transport: Sustainable aviation fuels are vital for growth. *Transport for Development*, [S. l.], p. 1-1, 27 out. 2022. Disponível em: <https://blogs.worldbank.org/transport/decarbonizing-air-transport-sustainable-aviation-fuels-are-vital-growth>. Acesso em: 10 jul. 2023.

VIEIRA J. P. F., IENCZAK, J. L., ROSSELL, C. E. V. PRADELLA J. G. C. FRANCO, T.T. Microbial lipid production: screening with yeasts grown on Brazilian molasses. *Biotechnology Letters*, v. 36, p. 2433-2442, 2014.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science Technology*, v. 113, p. 1031–1051. 2011

CNPq Processo 407946/2022-5 – Desenvolvimento de Processo para Produção de Biocombustíveis Utilizando a Fração Orgânica de Lixo Urbano por Biotecnologia e Catálise Química – UNIVAP, 2022.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq/MCTI/FNDCT Nº 18/2022 - Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Apoio ao Programa Combustível do Futuro e à Iniciativa Brasileira do Hidrogênio (IBH2 MCTI). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.