

CRESCIMENTO E CONSUMO DE AÇÚCARES PELO *RHODOSPORIDIUM TORULOIDES*: UM ESTUDO DE FERMENTAÇÃO

Thainá Barbosa de Lima Cordeiro, José Geraldo Pradella, Laura Luiz Trigo, Josiely Aparecida do Espírito Santo Toledo, Lúcia Vieira, Virgínia Klausner.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, thainablcordeiro@gmail.com, pradella@univap.br, lauratrigo47@gmail.com, josielytoledo@gmail.com, lucia.vieira@univap.br, virginia@univap.br.

Resumo

A busca por alternativas renováveis de lipídios, em resposta à dependência de recursos fósseis, tem valorizado leveduras oleaginosas como *Rhodospiridium toruloides* (*R. toruloides*) pela capacidade de produzir lipídios de alto valor agregado a partir de diversos substratos, demonstrando alta tolerância a variações ambientais. Este estudo detalha o cultivo e monitoramento de *R. toruloides*, enfocando o crescimento celular e o consumo de açúcares redutores por meio de análises de densidade óptica e ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Os resultados indicam um consumo significativo de açúcares, com a concentração reduzida de 20 g.L⁻¹ para 2,49 g.L⁻¹ em 120 h, e um crescimento celular contínuo, evidenciado pelo aumento da densidade óptica de 1,05 g.L⁻¹ para 14,16 g.L⁻¹. A análise sugere que a *R. toruloides* pode ser utilizada na produção de lipídios em condições controladas e com substratos variados.

Palavras-chave: Leveduras. *Rhodospiridium toruloides*. Lipídios.

Área do Conhecimento: Química.

Introdução

A busca por alternativas aos recursos fósseis e pelo desenvolvimento de bioprodutos renováveis tem intensificado o interesse nas leveduras oleaginosas como fontes de lipídios industriais (Lima *et al.*, 2024). *R. toruloides* utiliza uma variedade de substratos, incluindo resíduos agroindustriais, e demonstra alta tolerância a condições ambientais variadas. Destaca-se por acumular grandes quantidades de lipídios intracelulares sob condições de nutrientes limitados, o que o torna uma opção promissora para a produção de biomassa rica em lipídios e biocombustíveis (Cassa-barbosa, 2012; Teodoro, 2015). A parede celular das leveduras é uma estrutura resistente que confere proteção e estabilidade à célula. Contudo, o distúrbio controlado dessa parede pode ser vantajoso em aplicações biotecnológicas, como a extração de compostos intracelulares ou a liberação de enzimas produzidas por essas leveduras, como o *R. toruloides* (Bouzon; Gargioni; Ouriques, 2010).

Os lipídios são compostos orgânicos essenciais, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos como hexano e clorofórmio. Desempenham funções vitais nos seres vivos, como armazenamento e liberação de energia, isolamento térmico, formação de barreiras celulares, transporte de substâncias lipossolúveis, sinalização celular e proteção contra danos oxidativos (David; Michael, 2022; Molinaro *et al.*, 2013). A produção de lipídios em fermentações pode ser limitada pela taxa de crescimento e densidade celular, especialmente em cepas de crescimento lento ou sob condições subótimas, o que torna o processo menos eficiente (Rabelo; Pradella; Ienczak, 2019).

A sensibilidade do *R. toruloides* a variações ambientais, como temperatura, pH e oxigênio, pode afetar seu metabolismo e a acumulação de lipídios (Rabelo; Pradella; Ienczak, 2019). A Figura 1 mostra células de *R. toruloides* sob condições que favorecem o acúmulo gradual de lipídios intracelulares. A Figura 1(a) exibe pequenos pontos fluorescentes, indicativos do início da formação de gotículas lipídicas. Nas imagens seguintes (b-f), observa-se um aumento no número e no tamanho dessas gotículas, refletindo um acúmulo significativo de lipídios (Nicaud *et al.*, 2017).

Figura 1 - Levedura *R. toruloides* com acúmulo de lipídios intracelulares, contendo o aumento gradual ao passar do tempo, sendo (a) como inicial e (f) como final.



Fonte: Nicaud *et al.* (2017).

O objetivo deste estudo foi detalhar o cultivo e monitoramento de *R. toruloides*, enfocando o crescimento celular e o consumo de açúcares redutores por meio de análises de densidade óptica e ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Metodologia

Esta seção descreve os procedimentos para cultivar *R. toruloides* e monitorar seu crescimento e consumo de açúcares redutores durante a fermentação, usando análises de densidade óptica (DO) e ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

A linhagem CCT 0783 de *R. toruloides*, fornecida pela Fundação André Tosello e de nível de biossegurança 1, foi utilizada em todos os cultivos. As culturas foram mantidas em placas de Petri com meio Dextrose ágar e armazenadas em refrigeração a aproximadamente 5 °C.

O meio definido utilizado para o cultivo de *R. toruloides* foi adaptado de Pradella (1980). Este meio é composto por diversos reagentes, sendo a glicose a substância predominante, na concentração de 40,00 g.L⁻¹, que fornece a principal fonte de carbono.

O extrato de levedura, adicionado a 2,00 g.L⁻¹, fornece nutrientes adicionais e vitaminas essenciais. Outros componentes do meio incluem cloreto de cálcio (0,02 g.L⁻¹) e cloreto de ferro III (0,01 g.L⁻¹), importantes para a atividade enzimática e o crescimento celular. O cloreto de sódio e o sulfato de amônio são incluídos na concentração de 1,00 g.L⁻¹ cada, enquanto o sulfato de magnésio é adicionado a 2,00 g.L⁻¹, contribuindo para a osmolaridade e a nutrição das células. Por fim, o fosfato monopotássico e o fosfato de sódio, ambos na concentração de 1,00 g.L⁻¹, garantem a disponibilidade de fósforo, um elemento vital para o metabolismo celular.

O processo de fermentação está ilustrado na Figura 2, que descreve as etapas de processamento e monitoramento do consumo e crescimento do microrganismo. Na Figura 2(a), uma alíquota do microrganismo foi coletada de uma placa de Petri utilizando uma alça de platina, sob fluxo laminar. Na Figura 2(b), essa alíquota foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL contendo meio Saboraund, preparado previamente com 1,2 g do meio dissolvido em 40 mL de água destilada e autoclavado. Na Figura 2(c), o erlenmeyer foi incubado por 48 h a 180 rpm e 28,5 °C. Em seguida, na Figura 2(d), 4 mL do meio Saboraund foram transferidos para um erlenmeyer de 250 mL contendo 36 mL de meio definido, também autoclavado previamente. A incubação foi repetida nas mesmas condições por mais 48 h, conforme mostrado na Figura 2(e). Na etapa seguinte, representada na Figura 2(f), o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para um erlenmeyer de 2 L contendo 360 mL de meio definido, totalizando 400 mL, e incubado até atingir o ponto ótimo de fermentação, indicado na Figura 2(g).

Esse ponto é determinado quando o açúcar do meio é esgotado e o crescimento do microrganismo é máximo, monitorado através de análises com reagente DNS e densidade óptica ao longo de 72 a 120 h. Após a fermentação, o meio foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado a 4000 rpm por 15 min, como ilustrado na Figura 2(h). A Figura 2(i) mostra o tubo Falcon após a centrifugação.

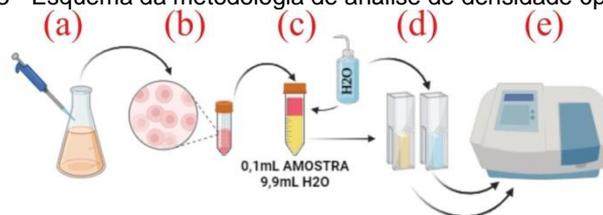
Figura 2 - Esquema de fermentação de *R. toruloides*, detalhando as etapas de processamento e monitoramento do consumo e crescimento do microrganismo.



Fonte: A Autora (2024).

A análise de densidade óptica (DO) consiste na medição da transmitância da luz no comprimento de onda de 600 nm, foi utilizado para acompanhar o crescimento da célula. A densidade é determinada pelo espectrofotômetro Kasvi modelo K37-VIS, baseada na metodologia descrita por Oliveira e Damiani (2024). A Figura 3 contém um desenho esquemático das etapas da metodologia detalhada para a análise de Densidade Óptica (DO). Inicialmente, no item (a), uma alíquota de 5 mL da fermentação do microrganismo foi coletada com uma pipeta. No item (b), a amostra foi transferida para um tubo Falcon. No item (c), a amostra foi diluída 100 vezes, combinando 0,1 mL da amostra com 9,9 mL de água destilada. Após homogeneização, a suspensão foi transferida para uma cubeta, como mostrado no item (d). A cubeta contendo apenas água destilada foi utilizada como padrão. Finalmente, no item (e), ambas as cubetas foram analisadas no espectrofotômetro para medir a absorbância a 600 nm.

Figura 3 - Esquema da metodologia de análise de densidade óptica (DO).



Fonte: A Autora (2024).

A concentração celular foi obtida utilizando a equação:

$$X(\text{g.L}^{-1}) = 0.4583 \times \text{DO} \times f \quad (1)$$

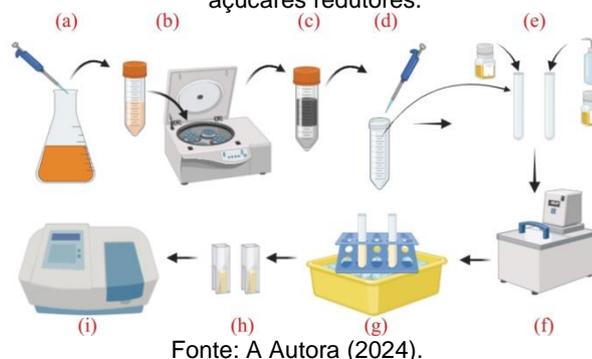
na qual X é a concentração celular no meio em g.L^{-1} , DO é a densidade óptica medida no espectrofotômetro a 600 nm, f é o fator de diluição e o coeficiente 0.4583 foi obtido a partir de uma curva de calibração de concentrações celular conhecidas fazendo-se a correlação linear entre a concentração celular e o valor de DO obtido.

O método DNS, utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico, visa determinar a concentração de açúcares redutores em um meio. A metodologia, baseada em Miller (1959), foi adaptada para uma diluição de 100 vezes. O preparo do reagente DNS envolveu a combinação de duas soluções preparadas separadamente. A solução A é constituída por 50 mL de NaOH a 2 mol.L^{-1} e 2,5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, agitada com um agitador magnético, com placa aquecedora. Simultaneamente, foi preparada a solução B com 125 mL de água destilada e 75 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), também foi agitada e aquecida. Após dissolver ambas as soluções, elas foram combinadas e armazenadas em frasco tampado com papel alumínio.

A Figura 4 contém a metodologia para análise de DNS. Primeiro, coleta-se uma alíquota de 5 mL com uma micropipeta (item a). A amostra é então transferida para um tubo Falcon e centrifugada por 15 min a 4000 rpm (item b). O tubo contém duas fases distintas: o sobrenadante escuro e o precipitado claro; o sobrenadante é utilizado para a análise (item c). Em seguida, 0,1 mL do sobrenadante foi diluído 100 vezes com 9,9 mL de água destilada (item d). Foram preparados dois

tubos de vidro, um com 2,5 mL de água destilada e 2,5 mL do reagente DNS, e outro com 2,5 mL da amostra diluída e 2,5 mL do reagente DNS (item e). Os tubos foram então aquecidos em banho-maria a 100 °C por 15 min (item f) e resfriados em banho de gelo por 5 min (item g). Após isso, as cubetas foram preenchidas com as soluções dos tubos (item h) e analisadas no espectrofotômetro para leitura da absorbância (item i). A leitura das amostras foi realizada com o uso de um espectrofotômetro Kasvi modelo K37-VIS, após utilizar a amostra padrão na faixa de 540 nm.

Figura 4 - Esquema da metodologia da análise com reagente DNS para a determinação de açúcares redutores.



Fonte: A Autora (2024).

A concentração dos açúcares redutores foi obtida utilizando a equação:

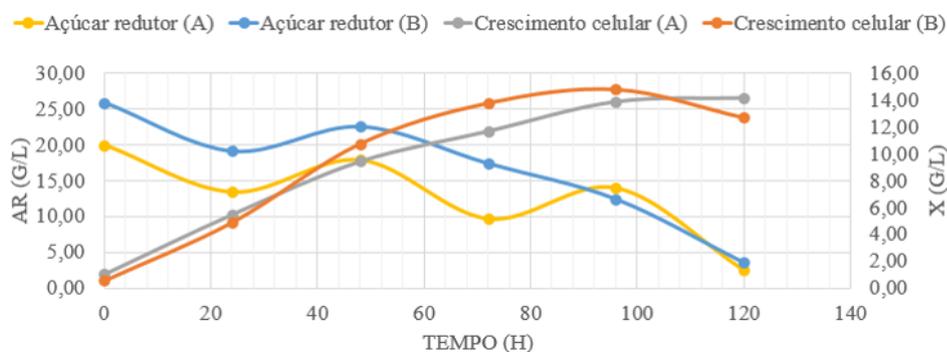
$$AR(g.L^{-1}) = 0.293 \times Ab \times f \quad (2)$$

na qual AR é a concentração do açúcar redutor no meio de fermentação em g.L⁻¹, Ab é a absorbância medida no espectrofotômetro a 540 nm, f é o fator de diluição e o coeficiente 0.293 foi obtido a partir de uma curva de calibração de soluções de concentração conhecida de glicose, fazendo sua correlação linear com os valores de absorbância obtidos.

Resultados

A fermentação da levedura pode ser representada ao longo do tempo por um gráfico de dispersão com linhas, como por exemplo a Figura 5, que contém o consumo de açúcar e o crescimento celular durante a etapa de fermentação.

Figura 5 - Fermentação A e B. O eixo “x” representa o tempo em h, enquanto o eixo “y” esquerdo representa a concentração de açúcar redutor em g.L⁻¹, e o eixo “y” direito representa o crescimento celular em g.L⁻¹.



Fonte: A Autora (2024).

A Tabela 1 contém os parâmetros utilizados para o cultivo de *R. toruloides*, exibindo a Densidade Óptica (DO) ao longo do tempo, e a relação entre a diluição, o fator de correção da DO (FC DO) e o crescimento celular ajustado (DO*FC).

Tabela 1- DO do cultivo do Rt.

Tempo	Diluição	DO	FC DO	DO*FC
0 h	100x	0,0230	0,4583	1,0541
24 h	100x	0,1200	0,4583	5,4996
48 h	100x	0,2060	0,4583	9,4410
72 h	100x	0,2550	0,4583	11,6867
96 h	100x	0,3030	0,4583	13,8865
120 h	100x	0,3090	0,4583	14,1615

Fonte: A Autora (2024).

A fonte de carbono foi acompanhada durante o cultivo do *R. toruloides* por meio da análise de DNS, conforme as informações contidas na Tabela 2, o valor medido é representado por (DNS), este multiplicado com fator de correção (FC DNS) resulta no valor de consumo dos açúcares redutores em g.L⁻¹ representado na última coluna (DNS*FC).

Tabela 2- DNS do cultivo do Rt.

Tempo	Diluição	DNS	FC DNS	DNS*FC
0 h	100x	0,6820	0,2930	19,9826
24 h	100x	0,4580	0,2930	13,4194
48 h	100x	0,6100	0,2930	17,8730
72 h	100x	0,3310	0,2930	9,6983
96 h	100x	0,4770	0,2930	13,9761
120 h	100x	0,0850	0,2930	2,4905

Fonte: A Autora (2024).

Discussão

O gráfico da Figura 5 demonstrou que, nas fermentações "A" e "B", houve um aumento inicial na concentração de açúcares redutores, seguido por uma redução, refletindo o consumo desses açúcares durante a fermentação. Os níveis de açúcares redutores iniciaram em 20 g.L⁻¹ e 25 g.L⁻¹, respectivamente, e diminuíram para aproximadamente 5 g.L⁻¹ após 120 h. O crescimento celular exibiu um padrão oposto ao dos açúcares redutores: começou com um aumento e continuou a se desenvolver por 120 h, indicando uma fase de adaptação seguida pelo consumo de açúcares e estabilização da biomassa. No estudo de Vieira (2016), o tempo de cultivo foi de 38 h com um bioreator de 3 L, enquanto no estudo de Li (2007), o tempo de fermentação foi de 134 h em um fermentador de 15 L com agitação. A Tabela 1 revelou que a densidade óptica (DO), que indica a concentração celular, aumentou de 0,0230 para 0,3090, enquanto o fator de correção (FC) da DO permaneceu constante em 0,4583. O produto DO*FC, refletindo o crescimento celular ajustado, subiu de 1,0541 para 14,1615, indicando um crescimento celular significativo durante a fermentação. O estudo de Zhao *et al.* (2010) apresentou cultivos em bioreator de 15 L com 127,4 g.L⁻¹, enquanto Li (2007) obteve uma concentração de 106 g.L⁻¹. A Tabela 1 também evidenciou que o crescimento celular aumentou com o tempo, embora a uma taxa mais lenta no estágio final. A Tabela 2 mostrou uma relação inversa, com a quantidade de carbono no meio diminuindo ao longo do tempo, exceto no período de 96 h, onde houve um aumento, sugerindo que o *R. toruloides* pode ter consumido reservas internas temporariamente antes de retornar à fase de acumulação de lipídios.

Conclusão

Durante a fermentação do *R. toruloides*, dados detalhados foram apresentados sobre o consumo de açúcar e o crescimento celular do microrganismo na produção de lipídios. Em duas fermentações distintas, a concentração de açúcar redutor iniciou em 20 g.L⁻¹ e 25 g.L⁻¹, respectivamente, e diminuiu para cerca de 5 g.L⁻¹ em 120 h. O crescimento celular mostrou um aumento inicial seguido por uma estabilização após 80 h em ambos os casos. A densidade óptica (DO), indicativa da concentração celular, aumentou de 0,0230 para 0,3090 ao longo de 120 h, e o crescimento celular ajustado (DO*FC) aumentou, indicando um crescimento celular durante o processo de fermentação.

Referências

BOUZON, Z. L.; GARGIONI, R.; OURIQUES, L. C. **Biologia Celular**. 2. ed. Florianópolis: Biologia/EAD/UFSC, 2010.

CASSA-BARBOSA, L. A. **Isolamento e caracterização de leveduras capazes de utilizar o hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono**. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

DAVID, L. N.; MICHAEL, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2022. 1248 p.

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

LIMA, F. S. *et al.* Competitividade Do Biodiesel: Desafios E Perspectivas Na Região MATOPIBA. **Informe GEPEC**, v. 28, n. 1, p. 208-230, 2024.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOLINARO, E. M. *et al.* Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; **IOC**, 2013. v. 3, cap. 1, p. 28-130.

OLIVEIRA, P. V. P.; DAMIANI, G. V. Tratamento da Vinhaça de Cana de Açúcar Com *Bacillus Subtilis* durante 72 Horas. **Brazilian Journal of Development**, v. 10, p. 1012-1020, 2024.

PRADELLA, J. G. C. **Contribuição ao Estudo da Cinética do Crescimento Celular e Acúmulo de Lipídios Por *Rhodoturula Gracilis***. 1980. Dissertação (Mestrado em Engenharia) — Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1980.

RABELO, S. C.; PRADELLA, J. G. C.; IENCZAK, J. L. Produção de etanol de segunda geração. Coleção Biotecnologia industrial. **Edgard Blücher**, v. 3, p. 107-212, 2019.

TEODORO, M. M. G. **Avaliação da Produção e Determinação do Perfil de Ácidos Graxos de Óleos Produzidos por Fungos Filamentosos**. 2015. Monografia (Bacharelado em Química Tecnológica) — Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Departamento de Química, Curso de Química Tecnológica, 2015.

VIEIRA, J. P. F. **Biotransformação de carboidratos da cana-de-açúcar em lipídios e avaliação técnica-econômica**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química) — Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

ZHAO, X. *et al.* Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodosporidium toruloides* Y4. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 581-585, 2010.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Código de Financiamento 407946/2022-5, e da Fundação Valeparaibana de Ensino.