

INFLUÊNCIA DE GLICOSE E DE GLICERINA BRUTA, COMO FONTES DE CARBONO, NO CRESCIMENTO DE *Rhodospiridium toruloides*

Giulia Nicolle Jácome Cartaxo, Thainá Barbosa de Lima Cordeiro, José Geraldo da Cruz Pradella, Maricilia Silva Costa.

Universidade do Vale do Paraíba/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000- São José dos Campos- SP, Brasil, giuliacartaxo@gmail.com, thainabcordeiro@gmail.com, jpradella51@gmail.com, mscosta@univap.br.

Resumo

Rhodospiridium toruloides é uma levedura caracterizada pelo acúmulo lipídico intracelular de triglicerídeos e carotenoides, os quais são estudados como potenciais matérias-primas para a produção de biocombustíveis. Esse microrganismo pode ser encontrado na natureza -em troncos de árvores, no solo ou na água- e apresenta grande versatilidade de cultivo, devido à fácil adaptação metabólica a alterações de pH, escassez nutricional e variações de temperatura. O objetivo deste trabalho é avaliar, por meio de medidas de densidade óptica (OD₆₀₀) e ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), a influência de glicose e de glicerina bruta como diferentes fontes de carbono no crescimento da levedura. As análises indicaram que ambas promovem, de maneira semelhante, o crescimento do microrganismo; porém, a glicerina bruta mostrou-se mais viável por ser uma alternativa mais sustentável para a utilização em processos industriais e biotecnológicos, além de seu menor custo.

Palavras-chave: Leveduras. Lipídeos. Desenvolvimento Sustentável.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde. Biomedicina.

Introdução

Em virtude do crescimento demográfico e, conseqüentemente, da demanda energética, surge uma urgência por fontes limpas e renováveis. A redução da dependência de combustíveis fósseis viabilizou o uso de microrganismos na geração de bioprodutos, uma alternativa promissora e sustentável à produção industrial. Os avanços na fabricação de biocombustíveis, apesar dos benefícios à economia e ao meio ambiente, dependem da disponibilidade de matérias-primas e de tecnologias apropriadas (Jayaraman *et al.*, 2025; Santos *et al.*, 2025; Martínez; García; Pérez, 2021).

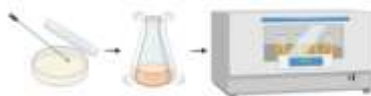
Biocombustíveis podem ser produzidos a partir de lipídios extraídos de óleos vegetais, gorduras animais e óleos microbianos. Esses lipídios passam por processos de transesterificação, transformando-se em combustíveis líquidos. A produção microbiana de lipídeos é mais viável devido ao menor ciclo de produção, maior reprodutibilidade e não competição com a produção de alimentos. Entre os microrganismos empregados na produção de óleo, destaca-se a levedura dimórfica e de coloração avermelhada, *Rhodospiridium toruloides*, que apresenta até 70% de lipídeos em sua composição, os quais demonstram grande potencial para a indústria bioenergética. Pode ser encontrada em troncos de árvores, no solo, em folhagens ou em resíduos hidrolisados; e demonstra elevada tolerância a alterações ambientais (de pH, escassez nutricional e variações de temperatura) (Nunes *et al.*, 2024; Sunder *et al.*, 2023; Wankhede *et al.*, 2024; Wen *et al.*, 2020).

O crescimento de leveduras depende da disponibilidade de carbono no meio de cultura. Dessa forma, este estudo tem por objetivo avaliar, por meio de medidas de densidade óptica e pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), a influência de glicose e da glicerina bruta como diferentes fontes de carbono, no crescimento de *Rhodospiridium toruloides*.

Metodologia

A levedura *R. toruloides* (CCT 0783), cultivada em ágar Sabouraud, foi transferida para caldo Sabouraud em erlenmeyer de 125 mL e incubada em agitador (180 rpm, 29 °C, 48 h), com rolha de algodão. A Figura 1 contém uma representação esquemática da preparação do inóculo.

Figura 1- Preparação do inóculo de *R. toruloides*.



Fonte: A AUTORA (2025).

Como os ensaios têm o objetivo de comparar o crescimento de *R. toruloides* em diferentes fontes de carbono, foi necessário separá-los em duas categorias: “Meio Definido com Glicose (MD)” e “Meio com Glicerina Bruta (GB)”. A glicerina bruta foi adquirida da empresa “Biobrotas Olequímica Ltda.” e apresenta um teor de 84,9% de glicerol na composição.

Os meios de cultura foram preparados conforme apresentado na tabela 1:

Tabela 1- Preparação dos meios de cultura “MD” ou “GB” (1L).

Reagentes	Quantidade (g/L)
Glicose ou Glicerina Bruta	40,00
Extrato de Levedura	2,00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,00
KH_2PO_4	1,00
Na_3PO_4	1,00
NaCl	1,00

Fonte: A AUTORA (2025).

Para cada condição, foram adicionados 50 mL de meio e 5mL de inóculo em erlenmeyers com capacidade máxima de 250mL. Os erlenmeyers foram submetidos à agitação constante, a 180rpm e 29°C, por 48 horas.

A fim de acompanhar o crescimento celular, realizou-se a análise de Densidade Óptica (OD_{600}). Nesse procedimento, alíquotas de 2mL de cada condição foram coletadas, diluídas em balão volumétrico com 100mL de água destilada e analisadas no espectrofotômetro (Kasvi K37-VIS), no comprimento de onda de 600nm, nos períodos de 0h, 24h e 48h. A figura 2 contém uma representação do método de análise da OD_{600} .

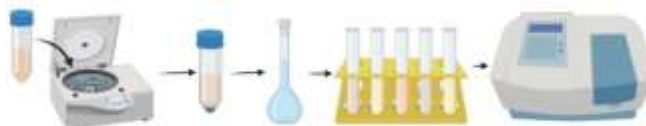
Figura 2- Análise da OD_{600} .



Fonte: A AUTORA (2025).

Com o objetivo de determinar o consumo de açúcares redutores, utilizou-se da metodologia descrita por Miller (1959), baseada no emprego de Ácido 3,5-Dinitrossalicílico (DNS). Foram coletadas alíquotas de 2mL (2000μL) de cada frasco e centrifugadas a 4000rpm, por 15 minutos. Diluiu-se 1mL de sobrenadante em 100mL de água destilada. Adicionaram-se 2,5mL da solução diluída em 2,5 mL da solução de DNS em um tubo de ensaio de vidro, o qual foi submetido a banho-maria (a 100°C, por 15 minutos), resfriamento em banho de gelo e análise no espectrofotômetro (no comprimento de onda de 540nm). A figura 3 compreende a representação do método de análise DNS. Quanto maior a OD_{600} e menor a concentração de DNS, maior o crescimento celular. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP (n = 5, em triplicata). A significância foi avaliada por ANOVA (1 critério) com teste de Tukey ($p < 0,01$), utilizando o BioEstat 5.0.

Figura 3- Análise com o método DNS.

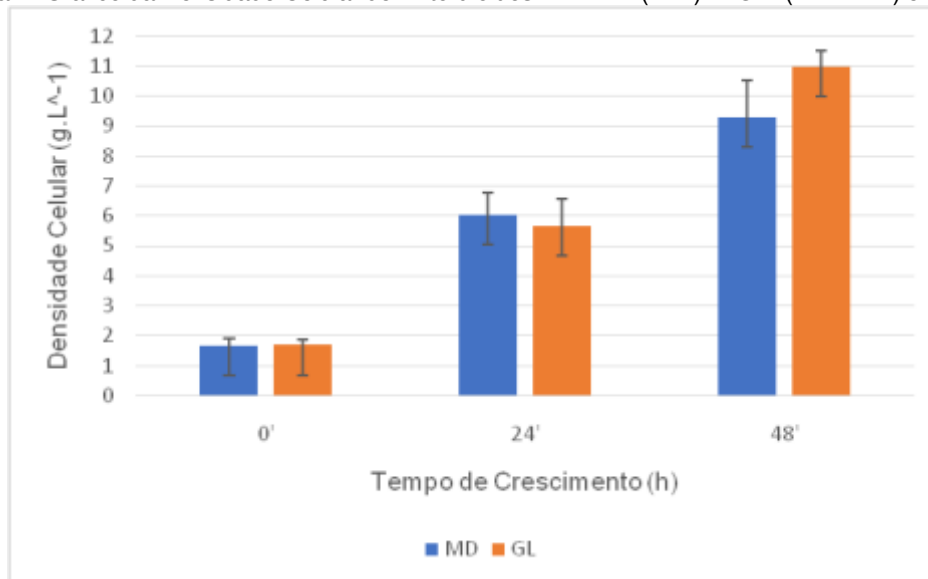


Fonte: A AUTORA (2025).

Resultados

A presença de ambas as fontes de carbono resultou em valores semelhantes de densidade óptica durante os períodos de 0, 24 e 48 horas. Para o meio com glicose, os resultados obtidos foram de, aproximadamente, 1,6; 6,0 e 10,0 g.L⁻¹ de células, respectivamente. No meio com glicerina bruta, os valores foram de, aproximadamente, 1,7; 5,6 e 11,0 g.L⁻¹ de células. Na figura 4 observa-se uma descrição gráfica da densidade celular da levedura, com diferentes fontes de carbono.

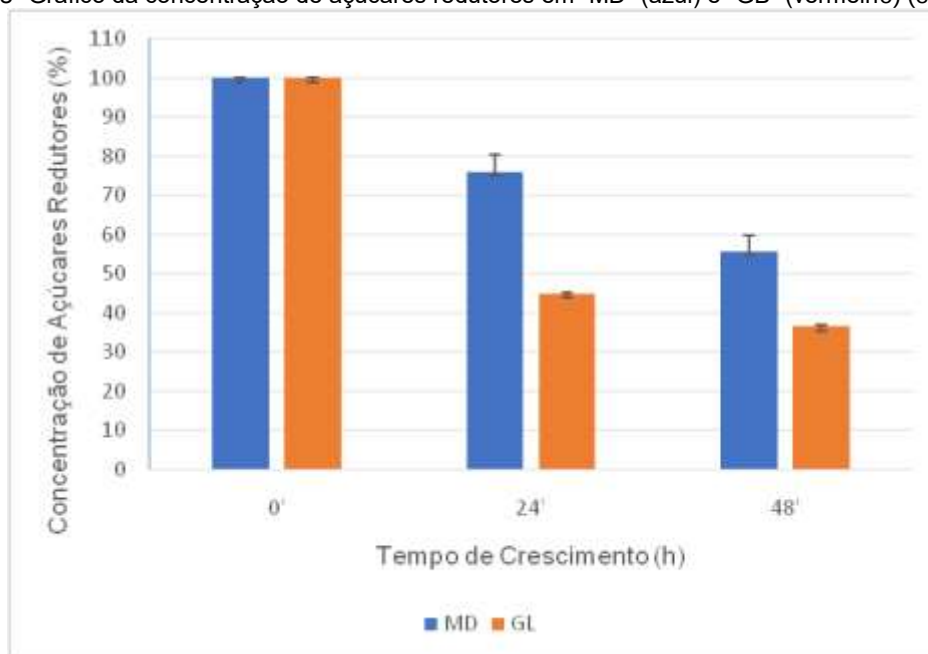
Figura 4- Gráfico da Densidade Celular de *R. toruloides* em “MD” (azul) e “GB” (vermelho) em g.L⁻¹.



Fonte: A AUTORA (2025).

No caso das medidas do método de DNS, o meio suplementado com glicerina bruta apresentou maior consumo de açúcares redutores, com a redução de 100% para cerca de 44% e 36% (≈0,50; 0,22; 0,18 g.L⁻¹), em 24 e 48 horas, respectivamente. No meio com glicose, a redução ocorreu de 100% para 76% e 62% (≈ 40,00; 30,00; 24,00 g.L⁻¹) no mesmo período. A figura 5 abrange um gráfico com os dados referentes à concentração de açúcares redutores com diferentes fontes de carbono.

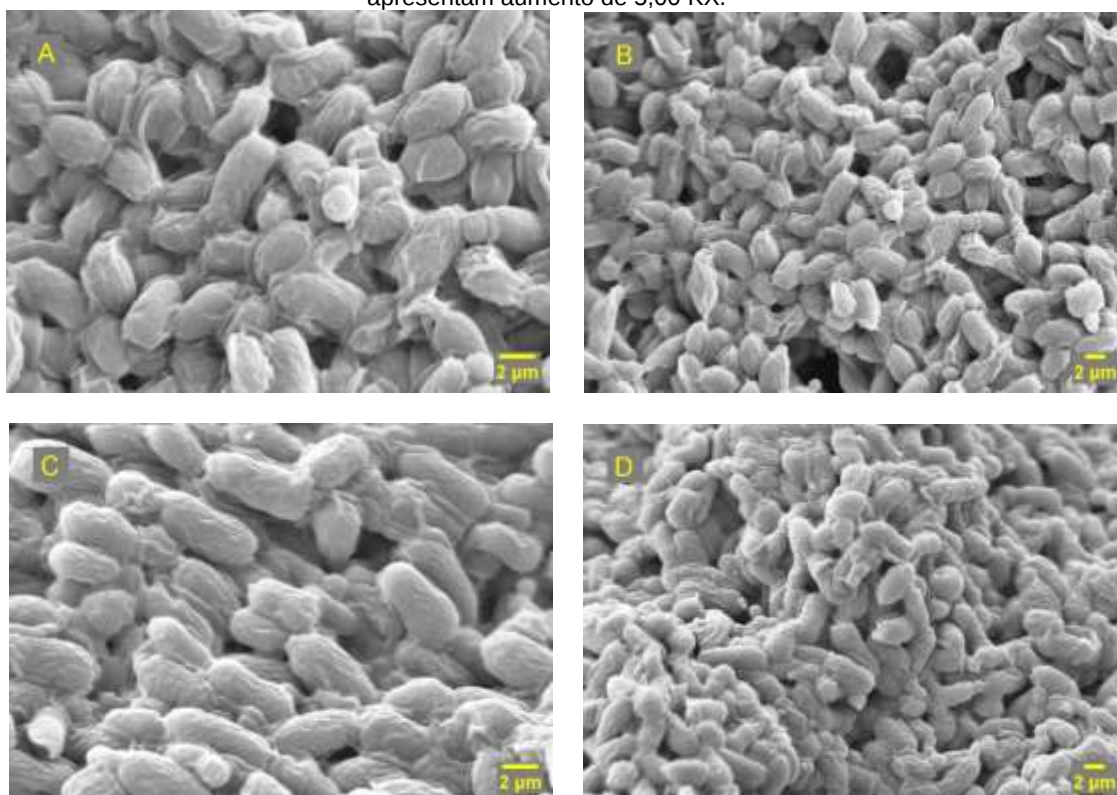
Figura 5- Gráfico da concentração de açúcares redutores em “MD” (azul) e “GB” (vermelho) (em g.L⁻¹).



Fonte: A AUTORA (2025).

As imagens obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) sugerem que as células cultivadas nas duas condições apresentaram morfologias semelhantes, como pode ser observado nas fotomicrografias, contidas na figura 6.

Figura 6- As fotomicrografias A e B correspondem às células de *R. toruloides* cultivadas em meio suplementado com glicerina bruta, enquanto as fotomicrografias C e D referem-se às células cultivadas em meio suplementado com glicose. As imagens A e C foram obtidas com aumento de 9,00 KX. As imagens B e D apresentam aumento de 5,00 KX.



Fonte: A AUTORA (2025).

Discussão

Os resultados demonstraram que, nos períodos avaliados, a concentração celular de *R. toruloides* foi similar no meio com glicose e com glicerina bruta, o que sustenta a hipótese da levedura ser capaz de utilizar ambas as substâncias como fonte de carbono. Estudos de Xu *et al.* (2016) e Martín-Hernández *et al.* (2023) revelam a possibilidade do uso dessas duas diferentes fontes de carbono para o crescimento e o aumento de produção lipídica do microrganismo.

A respeito do consumo de açúcares redutores, o meio com glicerina bruta apresentou uma redução mais significativa, para 44% e 36% em 24 e 48 horas, respectivamente; enquanto no meio com glicose, os valores permaneceram em torno de 76% e 62% nos mesmos períodos avaliados. Pesquisas de Samul *et al.* (2014) e Kumaret *al.* (2019) evidenciaram a presença de impurezas características da glicerina bruta, como ácidos graxos e sais, e que, com a formação de subprodutos, tendem a influenciar na disponibilidade de carbono.

Uma das principais vias metabólicas de *R. toruloides* é a glicólise. No citosol da levedura, a glicose passa por uma sequência de degradações e fosforilações até produzir duas moléculas de piruvato, duas de ATP (adenosina trifosfato, a principal fonte de energia da célula) e outras duas de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida, responsável pelo transporte de elétrons). O piruvato é convertido em acetil-CoA pela mitocôndria e, então, incluído no ciclo de Krebs. No ciclo de Krebs, são geradas três moléculas de NADH, uma de FADH₂ (flavina adenina dinucleotídeo reduzida, utilizada durante a respiração celular) e uma de ATP (Bommareddy *et al.*, 2015; Castañeda *et al.*, 2018).

Um fato que possivelmente explique o crescimento do microrganismo com o glicerol (proveniente da glicerina bruta) é devido à sua capacidade de convertê-lo em produtos intermediários do metabolismo celular. O glicerol pode ser transformado em glicerol-3P e, posteriormente, em DHAP (diidroxiacetona fosfato, um intermediário direto da glicólise), para entrar no processo de glicólise e seguir para o ciclo do Ácido Cítrico (Bommareddy *et al.*, 2015; Castañeda *et al.*, 2018).

Estudos de Xu *et al.* (2014) revelam que esta levedura demonstra a capacidade de ajustar seu perfil enzimático e metabólico para o melhor aproveitamento e conversão de glicerina em acetil-CoA (precursor da biossíntese de ácidos graxos e triacilgliceróis).

Conclusão

Os ensaios demonstraram o potencial de *R. toruloides* em utilizar tanto a glicose quanto a glicerina bruta como fontes de carbono, visto que foram observadas taxas de crescimento celular semelhantes em ambos os meios. No entanto, o meio suplementado com glicerina bruta promoveu maior consumo de açúcares redutores (quantificado pelo método de DNS) e evidenciou maior capacidade de metabolização de substratos complexos. Dessa forma, a glicerina bruta configura-se como uma alternativa mais viável e mais sustentável de suplementação de meios de cultura, por possibilitar o aproveitamento de subprodutos da indústria de biodiesel no desenvolvimento de bioprocessos.

Referências

BOMMAREDDY, R. R.; SABRA, W.; MAHESHWARI, G.; ZENG, A.-P. **Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates.** *Microbial Cell Factories*, v. 14, art. 36, 18 mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0217-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12934-015-0217-5>. Acesso em: 12 ago. 2025.

CASTAÑEDA, M. T.; NUÑEZ, S.; GARELLI, F.; VOGET, C.; DE BATTISTA, H. **Comprehensive analysis of a metabolic model for lipid production in *Rhodospiridium toruloides*.** *Journal of Biotechnology*, v. 280, p. 11–18, 20 ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.010>. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/325254629>. Acesso em: 17 ago. 2025.

JAYARAMAN, K. et al. **Analyzing the contributions of biofuels, biomass, and bioenergy to sustainable energy systems.** *Plant Communications*, v. 10, n. 1, p. 100418, 2025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004225004183>. Acesso em: 17 ago. 2025.

KUMAR, L. R. et al. **A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production.** *Bioresource Technology*, v. 293, p. 122155, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122155>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31561979/>. Acesso em: 17 ago. 2025.

MARTÍNEZ, F.; GARCÍA, L.; PÉREZ, J. **Análise dos impactos ambientais na produção de biocombustíveis: uma revisão crítica.** *Science of the Total Environment*, v. 758, p. 143–156, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143156>. Acesso em: 17 ago. 2025.

MILLER, G. L. **Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426–428, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>. Disponível em: <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1408039>. Acesso em: 12 ago. 2025.

NUNES, D.D.; PILLAY, V.L.; VAN RENSBERG, E.; POTT, R.W.M. **Oleaginous microorganisms as a sustainable oil source with a focus on downstream processing and cost-lowering production strategies: A review.** *Biotechnology Reports*, [S.l.], v. 26, p. e01871, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101871>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589014X24001129>. Acesso em: 23 set. 2025.

SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. **Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production.** *Annals of Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 891–898, 2014. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s13213-013-0767-x>. Disponível em:

<https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-013-0767-x>. Acesso em: 24 jun. 2025.

SANTOS, J. C. de A. et al. **Biocombustíveis – Brasil como parte da solução, mas com cuidado.** *Observatório de Política Externa e da Inserção Internacional do Brasil*, 29 maio 2025.

Disponível em: <https://oieb.org/2025/05/29/biocombustiveis-brasil-como-parte-da-solucao-mas-com-cuidado/>. Acesso em: 17 ago. 2025.

SUNDER, S.; GUPTA, A.; KATARIA, R.; RUHAL, R. **Potential of *Rhodosporidium toruloides* for fatty acids production using lignocelluloses biomass.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 196, n. 5, p. 2881–2900, maio 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04681-w>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37615852/>. Acesso em: 24 jun. 2025.

WANKHEDE, L. et al. **Technological modes and processes to enhance the *Rhodosporidium toruloides* based lipid accumulation.** *Microbiological Research*, v. 287, p. 127840, out. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127840>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501324002416>. Acesso em: 24 jun. 2025.

WEN, Z. et al. ***Rhodosporidium toruloides* – A potential red yeast chassis for lipids and beyond.** *FEMS Yeast Research*, v. 20, n. 5, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa031>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32614407/>. Acesso em: 24 jun. 2025.

XU, J. et al. **Renewable microbial lipid production from oleaginous yeast: some surfactants greatly improved lipid production of *Rhodosporidium toruloides*.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 7, p. 107, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2076-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-016-2076-6>. Acesso em: 17 ago. 2025.

XU, J.; ZHAO, X.; WANG, W.; DU, W.; LIU, D. **Microbial conversion of biodiesel by product glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 65, p. 30–36, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X12000873>. Acesso em: 12 ago. 2025.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).