

## USO DE GLICERINA RESIDUAL NO CULTIVO DE DIFERENTES LEVEDURAS.

**LADEIRA, Bruno. L.<sup>1</sup>; MALLMANN, Christian <sup>1</sup>; BURKERT, Carlos André V.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos. Laboratório de Engenharia de Bioprocessos. E-mail: profbrunoladeira@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande. Laboratório de Engenharia de bioprocessos. E-mail: burkert@vetorial.net

### 1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental, o aquecimento global, a crise energética bem como a provável escassez dos combustíveis fósseis são temas que preocupam a comunidade científica instigando-a pela busca de fontes alternativas de energia. No contexto nacional, os bicombustíveis, como o biodiesel, representam uma alternativa renovável e ambientalmente segura, podendo o Brasil tornar-se ao mesmo tempo o maior produtor e consumidor mundial de biodiesel, uma vez que possui grande disponibilidade de matéria-prima oleaginosa e um crescimento contínuo na indústria de óleos vegetais e do etanol (SILVA et al., 2009).

Porém há um inconveniente na síntese de biodiesel no sentido de que é gerada uma quantidade significativa de glicerina prejudicial ao meio ambiente. Conforme dados da ANP, no ano de 2010 a quantidade de biodiesel produzida em todo território brasileiro foi de 2.397.272 m<sup>3</sup>, enquanto que somente no estado do Rio Grande do Sul foram produzidos cerca de 605,998 m<sup>3</sup>. Considerando que cerca de 10% do biodiesel produzido corresponde a glicerina, quantidades apreciáveis de glicerina residual são geradas.

Muitas pesquisas vem sendo desenvolvidas a fim de descobrir novas aplicações para a glicerina, visto que o mercado tradicional desse subproduto (indústria de medicamentos, cosméticos e alimentícios) encontra dificuldade em absorver todo o excedente oriundo da síntese do biodiesel. Uma solução está no uso de estratégias biotecnológicas para o reaproveitamento da glicerina com objetivo de gerar produtos de maior valor agregado (RIVALDI et al., 2008).

As leveduras são micro-organismos importantes na área de biotecnologia, pois sobre determinadas condições de cultivos podem produzir produtos de grande interesse comercial, e dentro dessa classe de micro-organismos podemos citar: as leveduras do gênero *Yarrowia lipolytica* e *Candida lipolytica* que são produtoras de lipases (LEE et al., 2007; SIKANDER et al., 2010 ) e as leveduras do gênero *Rhodotorula* por possuírem capacidade de sintetizar diferentes tipos de carotenoides (ALMEIDA, 2010), bioprodutos de grande valor agregado para a indústria de alimentos. Neste sentido esse trabalho vem a contribuir no estudo do uso de glicerina residual para a obtenção de biomassa das leveduras citadas acima.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as linhagens de leveduras *Yarrowia lipolytica* NRRL Yb-423, *Candida lipolytica* NRRL Y-1095, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Rhodotorula glutinis* NRRL Yb-252 disponíveis no laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG e certificadas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*). A glicerina residual usada foi fornecida pela empresa BS Bios localizada em Passo Fundo-RS, sendo que a quantidade de glicerina bruta adicionada ao meio de cultivo levou em conta sua composição e pureza (83%).

Manutenção e reativação das culturas microbianas:

Os microrganismos foram mantidos em tubos contendo meio YM (*yeast malt agar*) sob refrigeração (4°C), com a seguinte composição (g.L<sup>-1</sup>): 10,0 de glicose; 5,0 de peptona; 3,0 de extrato de malte; 3,0 de extrato de levedura; 20,0 de ágar. Para a reativação, a partir das culturas estoques, foram realizados repiques sucessivos para tubos contendo ágar YM, sendo incubados em estufa com temperatura controlada (30 °C) e circulação de ar por 48 h.

Preparo do inóculo:

Foram utilizados dois tubos de cultura microbiana reativada que foram raspadas com 10 mL de água peptonada 0,1% para cada tubo, e após transferiu-se para erlenmeyer de 500 mL contendo 180 mL de meio de cultivo microbiano contendo 12 g.L<sup>-1</sup> de glicerina residual, 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona. A suspensão foi incubada a 30 °C em incubadora rotatória a 180 rpm sendo monitorado o cultivo por contagem em câmara de Neubauer.

Cultivos em frascos agitados:

Os cultivos para a produção das leveduras foram realizados em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio, inoculados com suspensão de leveduras previamente preparada com meio de mesma composição, de forma a atingir concentração celular de 1x10<sup>7</sup> células. mL<sup>-1</sup>. Os frascos foram mantidos em incubadora rotatória a 30°C e 180 rpm de agitação, retirando-se alíquotas ao longo do cultivo, sendo estas centrifugadas sob refrigeração a 5000 rpm por 15 minutos.

Os sedimentos obtidos após centrifugação das amostras foram lavados e novamente centrifugados e então ressuspendidos em volume apropriado para a determinação analítica da concentração celular no sedimento por espectrofotometria a 600 nm (CHOI; PARK, 2003). A concentração de biomassa foi expressa em peso seco (g.L<sup>-1</sup>), obtido a partir de uma curva de calibração previamente determinada para cada microrganismo, permitindo assim traçar as curvas de crescimento celular. Os dados foram submetidos à análise de variância e Teste de Tukey a 95% de confiança.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

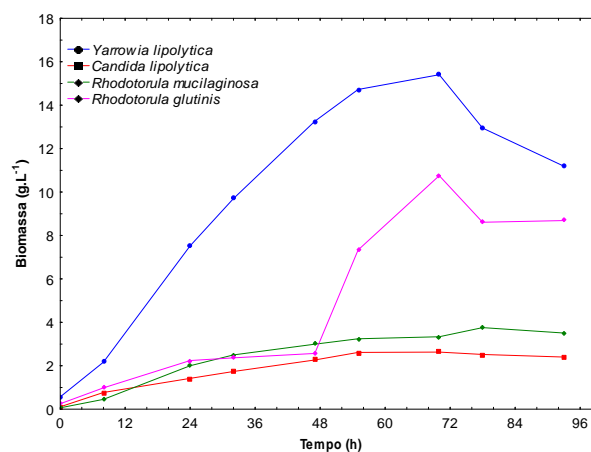
Os principais parâmetros de cultivo das leveduras são apresentados na Tabela 1, enquanto que o acompanhamento da concentração celular das leveduras ao longo do cultivo é apresentado na Figura 1.

**Tabela 1:** Parâmetros de crescimento celular para as leveduras.

Leveduras	$X_{\text{máx}}$ (g.L <sup>-1</sup> )	Prod. (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<i>Yarrowia lipolytica</i> YB-423	15,7 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>a</sup>
<i>Candida lipolytica</i> YB-1095	4,0 ± 0,35 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,005 <sup>b</sup>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3,62 ± 0,34 <sup>b</sup>	0,08 ± 0,005 <sup>c</sup>
<i>Rhodotorula glutinis</i> YB-252	15,63 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>

$X_{\text{máx}}$  - Concentração celular máxima; Prod – produtividade global do processo

\* Letras iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa a 95% de confiança (p<0,05)



**Figura 1:** Curvas de crescimento das leveduras cultivadas com glicerina residual.

Quanto à concentração celular máxima, *Yarrowia lipolytica* e *Rhodotorula glutinis* diferiram significativamente das demais (p<0,05) atingindo-se 15,7 ± 0,27 e 15,63 ± 0,26 g.L<sup>-1</sup> respectivamente, enquanto que *Candida lipolytica* e *Rhodotorula mucilaginosa* apresentaram inferior concentração de biomassa, cerca de 4,0 ± 0,35 e 3,62 ± 0,34 g.L<sup>-1</sup>. Os resultados apresentados na Tabela 1 apresentam-se superiores aos da literatura no uso de glicerina residual em que é relatada a produção de 7,1 g.L<sup>-1</sup> de biomassa de *Yarrowia lipolytica* em 92 h (PAPANIKOLAOU et al., 2008), e 4,25 g.L<sup>-1</sup> de biomassa de *Rhodotorula glutinis* em 96 h (JULIANE et al., 2011)

Pela Figura 1 pode-se constatar que a concentração celular máxima ( $X_{\text{máx}}$ ) é atingida nos tempos 70 h para *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica* e *Candida lipolytica* e de 78 h para *Rhodotorula glutinis*. Foi observado uma maior produtividade para a levedura *Yarrowia lipolytica* YB-423 que diferiu significativamente das demais (p<0,05), atingindo 0,29 ± 0,01 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

### 4. CONCLUSÕES

Através dos resultados acima, verificou-se que a glicerina residual proveniente da produção de biodiesel se mostra promissora no cultivo das

leveduras estudadas principalmente para as cepas de *Yarrowia lipolytica* YB- 423 e *Rhodotorula glutinis* YB-252.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. M. T. **Utilização do glicerol para obtenção de carotenoides de *Rhodotorula sp.* por fermentação submersa.** 2010. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CHOI, M.H.; PARK, Y.H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass & Bioenergy**, South Korea, v. 25, p. 221-226, 2003.

JULIANNE, R. S.; CAROLINY, G. O.; ANA, K. P. B.S.; GIOVANILTON, F. S.; ANDREA, L. O. F. **Utilização de Glicerol como Fonte de Carbono para Obtenção de Carotenoides de *Rhodotorula glutinis*.** In *SINAFERM, Caxias do Sul/RS 2011*

LEE, GEON-HO, JAE-HAN BAE, MIN-JUNG SUH, IN-HWAN KIM, CHING T. HOU, AND HAK-RYUL KIM. New Finding and Optimal Production of a Novel Extracellular Alkaline Lipase from *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Korea, v.17, n.6, p.1054–1057, 2007.

PAPANIKOLAOU S.; GALIOTOU-PANAYOTOU M.; FAKAS S.; KOMAITIS M.; AGGELIS, G. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. **Bioresource Technology**, Athens Greece, v.99, n.7, p. 2419-2428, 2008

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILO,R. E SILVA, S.S. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasil, n.37, p. 44-51, 2008.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, Estados Unidos, v. 27, n.1, p. 30-39, 2009.

SIKANDER, A.; HAMEEDULLAH R.; IKRAM, U. H. Production of an extracellular lipase from *Candida lipolytica* and parameter significance analysis by Plackett-Burman design. **Revista Eng. Life Science, Pakistan**, v. 10, n.5, p. 465-473, 2010.