

Linhagem de levedura produtora de ácido cítrico a partir de glicerol bruto¹

Ana Clara Alves Braga Rodrigues², Thályta Fraga Pacheco³, Thais Demarchi Mendes⁴, José Antônio de Aquino Ribeiro⁵, Diogo Keiji Nakai⁶, Clenilson Martins Rodrigues⁷, Mônica Caraméz Triches Damaso⁸

Resumo

Três linhagens comerciais de *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica* Y 1095, *Y. lipolytica* ATCC 8661 e *Y. lipolytica* YB 423) disponíveis na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias (CMMABio), da Embrapa Agroenergia, foram avaliadas quanto à capacidade de produção do ácido cítrico. Além disso, foram avaliadas diferentes composições de meios de cultivo selecionados a partir da literatura, com a finalidade de avaliar qual binômio: meio e linhagem apresentaria o maior potencial produtivo do ácido. Os cultivos foram realizados em escala laboratorial, utilizando-se frascos cônicos, e como fonte de carbono foi usada a glicerina, glicerol bruto, coproduto do biodiesel. Tanto a fonte de carbono como o produto de interesse foram quantificados por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC). Três variações de método de quantificação do substrato, glicerol; do ácido de interesse, ácido cítrico; e do subproduto formado, ácido isocítrico foram testadas. Dentre as condições de cultivo avaliadas, nas quais variaram-se pH, composição do meio e concentração de glicerol, e os métodos de quantificação, a linhagem *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661 alcançou o melhor resultado de ácido cítrico, com 34,5 g/L, e rendimento de 0,76 g/g de glicerol consumido, após 96 horas de cultivo.

Termos para indexação: ácido cítrico, biodiesel, biorrefinaria do glicerol, bioconversão, biotecnologia industrial.

Introdução

A produção de ácido cítrico por fermentação microbiana tem sido objeto de pesquisa, por causa de sua ampla aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e química (Cirimina et al., 2017). A levedura *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir ácido cítrico a partir de diferentes fontes de carbono, como açúcares, etanol, glicerol, entre outras (Rymowicz et al., 2010; Morgunov et al., 2018). Neste estudo, foram avaliados diferentes meios de cultivo e linhagens da levedura *Yarrowia lipolytica*, conhecida como boa produtora de ácido cítrico (Papanikolaou et al., 2002), visando a melhorar a produção do ácido de interesse, a partir de glicerina comercial, um coproduto do biodiesel, e, paralelamente, obter o mínimo do coproduto da reação, o ácido isocítrico. Além disso, foram comparadas diferentes metodologias cromatográficas para a quantificação precisa do ácido cítrico e do ácido isocítrico, durante o processo de fermentação da levedura.

¹ Trabalho financiado pela Finep (Dendepalm), FAP-DF (176/2020) e Embrapa

² Engenheira de bioprocessos e biotecnologista, Embrapa Agroenergia, analvesbragar@gmail.com

³ Engenheira química, mestre em engenharia química, Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁴ Bióloga, mestre em microbiologia aplicada, Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁵ Farmacêutico, mestre em ciências farmacêuticas, Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁶ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologista, mestre em ciências mecânicas, Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

⁷ Químico, doutor em química, Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

⁸ Engenheira química, doutora em tecnologia de processos químicos e bioquímicos, Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

Materiais e métodos

Os cultivos foram realizados em escala laboratorial por fermentação submersa em frascos cônicos, utilizando-se glicerina comercial como fonte de carbono. O grau de pureza da glicerina foi de 81,85% (m/m), em termos de glicerol.

Determinação da concentração inicial de glicerol

Primeiramente, foram testadas diferentes concentrações iniciais de glicerol (50 g/L, 100 g/L e 150 g/L) em um meio contendo extrato de levedura, KH_2PO_4 , NH_4Cl e com pH 5,5. Foram utilizadas três linhagens de *Yarrowia lipolytica*: YB 423, Y 109 5 e ATCC 8661. Após 120 horas de cultivo a 28 °C e 180 rpm, as amostras foram coletadas e avaliadas por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) para a quantificação dos substratos e produtos formados.

Definição do método para quantificação de substrato e produtos

Três metodologias cromatográficas foram testadas para a separação e quantificação dos compostos de interesse:

- Metodologia 1: coluna HPX87H a 45 °C; fase móvel isocrática (5 mmol/L H_2SO_4); detectores UV (PDA 210 nm) e RID (45 °C).
- Metodologia 2: coluna HSST3 a 30 °C; gradiente de eluição entre solução aquosa de ácido fosfórico 0,125% e metanol puro; detector UV (PDA 210 nm).
- Metodologia 3: coluna BEH amida a 50 °C; gradiente de eluição entre acetonitrila: H_2O (80:20) e acetonitrila: H_2O (40:60), ambos com acetato de amônio 10mmol/L + 0,2% NH_4OH ; detector: ELSD (ganho: 200, pressão: 40 psi, nebulizer mode: cooling; drift tube: 35 °C).

Definição do meio de cultura base

Em seguida, com base em informações da literatura, foram avaliados três meios de cultivo com diferentes composições, e foi verificada a performance das três linhagens de *Yarrowia lipolytica*. A Tabela 1 apresenta a composição dos meios de cultura 1, 2 e 3.

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo.

Componentes	Meio 1	Meio 2	Meio 3
Glicerina ADM (g/L)	50	50	50
Extrato de levedura (g/L)	5	0.25	0.5
KH_2PO_4 (g/L)	0.2	1.7	7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	-	0.25	-
Na_2HPO_4 (g/L)	-	12	2.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	-	1.25	1.5
Cloridrato de tiamina (g/L)	-	0.006	-
CaCl_2 (g/L)	-	-	0.15
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	-	-	0.15
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	-	-	0.02
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g/L)	-	-	0.06
Sulfato de amônio (g/L)	-	-	0.5
pH	5.0	6.0	5.5

Avaliação de meios de cultura

Um novo experimento foi elaborado utilizando o meio 2 como base, e algumas variáveis foram alteradas para identificar os fatores que influenciariam a produção do ácido cítrico. A Tabela 2 resume as principais diferenças entre os novos meios testados. Foram investigados os efeitos das impurezas e dos inibidores presentes na glicerina bruta em comparação com o glicerol P.A. (puro), a variação da relação C/N (carbono/nitrogênio) com aumento ou redução, a exclusão do extrato de levedura do meio e o controle do pH ao longo do cultivo pela adição de KOH 5 mol/L.

Tabela 2. Variações do meio 2.

Variante	Glicerola (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Levedurab (g/L)
1	Bruto (50)	0,25	0,25
2*	Bruto (50)	0,25	0,25
3	P.A. (80)	0,25	0,25
4	Bruto (50)	0,50	0,50
5	Bruto (50)	0,50	0,00
6c	Bruto (50)	0,25	0,25

^aTipo de glicerol; ^bextrato de levedura; ^ccontrole, composição igual ao meio 2.

*Na variante 2, o inóculo inicial ocorreu com densidade ótica (OD)=1,5, enquanto em todos os outros foi OD=0,5.

Esses experimentos foram realizados em triplicata, e foram avaliadas as três linhagens de *Yarrowia lipolytica*. Ao final dessa etapa, a linhagem que apresentou os melhores resultados de produção de ácido cítrico foi selecionada como a linhagem-elite para dar continuidade ao trabalho.

Análise estatística

A análise estatística se deu por meio do teste de Dunnett com intervalo de confiança de 95%.

Resultados e discussão

Durante o processo de seleção da concentração inicial de glicerol, o meio com 50 g/L foi o que apresentou as maiores produtividades para todas as três linhagens comerciais testadas. Após a seleção da concentração inicial de glicerol, dos três meios avaliados, o meio 2 foi o que obteve os melhores resultados.

Dentre as metodologias testadas para a quantificação do substrato e dos produtos formados, apenas a metodologia 3 mostrou-se eficaz para separar os analitos de interesse. A Tabela 3, a seguir, condensa a média dos resultados obtidos na cromatografia líquida após os cultivos nas variantes do meio 2.

Tabela 3. Variáveis resposta do cultivo de linhagens de *Y. lipolytica* para produção de ácido cítrico em diferentes meios de cultivo.

Meio	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 8661			<i>Y. lipolytica</i> YB 423			<i>Y. lipolytica</i> Y1095		
	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)
1	18,0	20,3	40,2	13,0	21,2	30,5	10,0	20,7	34,7
2	16,0	14,7	39,7	14,8	14,4	31,9	10,0	14,3	34,9
3	19,3	25,2	32,1	12,6	24,9	20,5	10,0	25,0	25,4

Continua...

Tabela 3. Continuação.

Meio	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 8661			<i>Y. lipolytica</i> YB 423			<i>Y. lipolytica</i> Y1095		
	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)	ACd (g/L)	AICe (g/L)	Glicerolf (g/L)
4	16,9	20,7	53,0	7,7	20,8	34,6	4,6	20,5	41,6
5	20,4	20,7	52,5	10,0	20,3	32,6	9,6	20,5	41,0
6	12,8	19,5	43,0	3,8	19,2	25,1	3,9	18,9	34,7

^dácido cítrico; ^eácido isocítrico; ^fglicerol consumido.

Utilizando-se o teste de Dunnett com intervalo de confiança de 95% para analisar os resultados obtidos, concluiu-se que o controle do pH ao longo do cultivo é crucial para obter uma maior produção de ácido cítrico. Além disso, verificou-se que o extrato de levedura, como fonte de nitrogênio orgânico, não é fundamental para a produção do ácido desejado, não sendo uma exigência para a linhagem de *Yarrowia lipolytica* utilizada.

Após os vários experimentos, analisando-se diferentes composições de meios de cultivo e, por fim, utilizando-se a metodologia de quantificação que consegue quantificar corretamente tanto ácido cítrico como isocítrico, a linhagem que alcançou o melhor resultado em termos do produto de interesse (ácido cítrico) foi *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661. Essa levedura produziu 34,5 g/L de ácido cítrico, 9,5 g/L de ácido isocítrico e rendimento de ácido cítrico de 0,76 g/g de glicerol consumido após 96 horas de cultivo. A condição de produção foi densidade ótica inicial de 0,5, em meio de cultivo contendo: 50 g/L de glicerol (glicerina ADM); 0,5 g/L de sulfato de amônio; 0,006 g/L de cloridrato de tiamina; 1,25 g/L MgSO₄; 1,7 g/L de KH₂PO₄ e 12 g/L de Na₂HPO₄. Esse resultado representa um aumento significativo em comparação ao início dos experimentos.

Conclusão

As três linhagens comerciais da levedura *Yarrowia lipolytica* foram capazes de produzir ácido cítrico a partir de glicerol bruto, glicerina, coproduto do biodiesel. Dentre as condições de cultivo avaliadas, variando-se pH, composição do meio e concentração de glicerol, a linhagem *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661 apresentou o maior potencial para produção de ácido cítrico, e por isso essa linhagem foi selecionada como elite para trabalhos futuros.

Referências bibliográficas

- CIRIMINA, R.; MENEGUZZO, F.; DELISI, R.; PAGLIARO, M. Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, 2017.
- MORGUNOV, I. G.; KAMZOLOVA, S. V.; LUNINA, J. N. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast on different renewable raw materials. **Fermentation**, 4, n. 2, 2018. 36.
- PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 737-744, 2002.
- RYMOWICZ, W.; FATYKHOVA, A. R.; KAMZOLOVA, S. V.; RYWINISKA, A.; MORGUNOV, I. G. Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 971-979, 2010.