



## Utilização do Glicerol como Fonte de Carbono em Fermentação Submersa

Myrella Tabosa<sup>1,2</sup>, Leise Soares<sup>1,2</sup> e Gustavo Saavedra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Agroindústria Tropical – Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Planalto do Pici  
60.511-110 Fortaleza – CE

<sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia Química  
Campos do Pici, Bloco 709 – 60.455-760 Fortaleza – CE - E-mail: [myrella.tabosa@gmail.com](mailto:myrella.tabosa@gmail.com)

### RESUMO

Várias cepas da levedura *Rhodotorula* são utilizadas para produção industrial de carotenóides, importantes pigmentos responsáveis pela coloração de alguns vegetais e microrganismos. Um aspecto importante no processo fermentativo é desenvolver um meio de cultura satisfatório para maximizar a obtenção do produto desejado utilizando matéria-prima barata. Devido ao crescente interesse por biocombustíveis como o biodiesel, observa-se um aumento na quantidade de glicerol disponível, o que vem ocasionando queda acentuada do seu preço. Portanto, buscam-se novas aplicações para este produto. Neste trabalho, investigou-se a influência do glicerol como fonte de carbono em fermentação submersa utilizando uma levedura do gênero *Rhodotorula*. Os meios foram preparados na concentração de 20g/L de glicerol e 5g/L de extrato de levedura e peptona na avaliação dos parâmetros cinéticos, como temperatura (10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C) e agitação (100, 150 e 200rpm). Obtidos os melhores resultados para estes parâmetros, foram avaliadas diferentes fontes de nitrogênio.

**Palavras-chave:** *Rhodotorula*, carotenóides, fermentação.

### INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Rhodotorula* podem ser utilizadas para produção industrial de carotenóides (Heyman et al., 1974; Costa et al., 1987). Carotenóides são importantes pigmentos naturais responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha e roxa em vegetais e microrganismos. Eles são considerados produtos de alto valor agregado.

Os carotenóides podem ser obtidos a partir de microrganismos como bactérias do gênero *Flavobacterium* e *Micrococcus*, algas *Dunaliella* e *Haematococcus*, fungo *Blakeslea trispora* (Nelis & Enheer, 1991; Lampila et al., 1985), e leveduras do gênero *Phaffia*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (Simpson et al., 1964; Heyman et al., 1974). A produção industrial de carotenóides utilizando microrganismos é altamente eficiente, uma vez que são de fácil manipulação. As leveduras do gênero *Rhodotorula* são amplamente utilizadas na fermentação devido a sua natureza unicelular e as altas taxas de crescimento, sendo capaz de produzir  $\beta$ -caroteno e torularodeno como produtos finais do seu metabolismo, com uma taxa de produção dependente das condições de incubação.



A produção industrial de carotenóides naturais por fermentação já é estabelecida e vem se expandindo. O processo de recuperação dos carotenóides, que possuem natureza intracelular, é um significativo fator nos custos de produção. Logo, a sua recuperação de forma eficiente vem chamando atenção em tempos recentes (Aksu e Eren, 2007).

Um aspecto importante no processo de fermentação é o desenvolvimento de um meio de cultura satisfatório para a máxima obtenção do produto desejado utilizando um substrato barato. Nesse contexto, o glicerol pode se tornar uma solução para produção de carotenóides como fonte de carbono em bioprocessos, por ser um produto abundante derivado da produção de biodiesel (Imandi et al, 2006).

Devido ao interesse crescente por biocombustíveis como o biodiesel, um aumento na quantidade de subprodutos, no caso glicerol, e crescente disponibilidade são esperados. Atualmente as principais aplicações de glicerol são: síntese de resinas, farmacêuticas, cosméticas e na indústria alimentícia. Contudo, buscam-se novas aplicações de grandes volumes para glicerina no mundo. Outro mercado muito importante, e exclusivo, que provavelmente vai se desenvolver com a maior oferta de glicerol, é a aplicação deste para a síntese de moléculas de alto valor agregado, a partir da fermentação do glicerol.

Neste trabalho, investigou-se a influência do glicerol como fonte de carbono para produção de biomassa por fermentação submersa utilizando uma levedura do gênero *Rhodotorula*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismo e manutenção da linhagem

Utilizou-se nesse estudo uma levedura do gênero *Rhodotorula* do banco de microrganismos da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará. A linhagem foi mantida em ágar Sabouraud segundo a técnica de subcultura e estocada sob refrigeração.

### Preparação do inóculo

Para a produção do inóculo foi transferida assepticamente uma amostra da linhagem estocada para erlenmeyer de 250mL, contendo 100mL de caldo sabouraud e incubado a 30°C e 150 rpm por 24 horas em shaker orbital. Após a quantificação da biomassa, transferiu-se para o meio de crescimento, o volume necessário para a obtenção de um inóculo de 0,01g massa seca/L.

### Preparação do meio

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250mL contendo 100mL de meio constituído por glicerol na concentração de 20g/L, extrato de levedura e peptona a 5g/L nas etapas iniciais. No estudo das fontes de nitrogênio foram testadas seis composições de meios diferentes, contendo 20g/L de glicerol e 5g/L de extrato de levedura, peptona e sulfato de amônia. Os meios foram esterilizados a 121°C por 15 min, inoculados com 0,01g/L de biomassa e incubados em shaker orbital para uma fermentação de 96 horas, onde amostras foram retiradas a cada 24 horas.



### **Extração de biomassa**

Foram coletados 10mL do meio fermentado, centrifugado a 6000rpm durante 10min. O sobrenadante foi separado e estocado sob refrigeração para a análise de glicerol. A biomassa obtida foi quantificada espectrofotometricamente.

### **Parâmetros estudados no processo**

Avaliou-se nesse trabalho, parâmetros que otimizassem a produção de biomassa, como temperatura (10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C), agitação (100, 150 e 200rpm) e diferentes fontes de nitrogênio.

### **Determinações analíticas**

A biomassa foi quantificada por método analítico espectrofotométrico no comprimento de onda de 600nm com o auxílio da curva padrão de peso seco previamente estabelecida. Acompanhou-se o pH, a pigmentação dos meios fermentados e o consumo de glicerol ao decorrer da fermentação. A pigmentação está relacionada com o parâmetro *a*, um dos parâmetros indicados para a identificação de pigmentos, no caso carotenóides, obtido por análise colorimétrica utilizando colorímetro do fabricante Minolta CR-300 na escala padrão de cromaticidade na faixa de -60 até +60. Para a análise de glicerol foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Varian), coluna MetaCarb 67H (6,5 x 300mm), com vazão de 0,8mL/min e temperatura da coluna mantida em forno a 60°C. A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01N.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Efeito da temperatura**

Avaliou-se o efeito de diferentes temperaturas (10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C) no processo fermentativo. No meio em estudo, a maior concentração de biomassa (9,31g.L<sup>-1</sup>) foi obtida após 96 horas de fermentação na temperatura de 15°C (Figura 1).

Observou-se um aumento na produção de biomassa com a diminuição da temperatura até 15°C. Na temperatura de 10°C o crescimento voltou a cair. Nas temperaturas de 35 e 40°C, registrou-se um crescimento irrelevante. Contudo a pigmentação não apresentou aparentemente uma relação direta com o aumento de biomassa. Observaram-se as maiores pigmentações nas temperaturas de 20 (8,01), 25 (8,78) e 30°C (9,21) (Figura 2).

O glicerol foi consumido quase por completo em 30°C, restando apenas 0,37g.L<sup>-1</sup>. O mesmo não acontece nas outras temperaturas, como mostra a Figura 3.

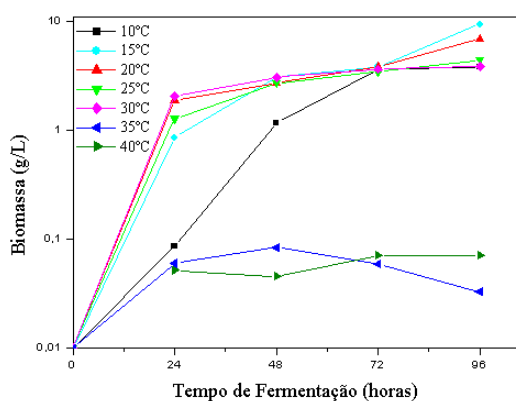


Figura 1: Produção de biomassa em diferentes temperaturas

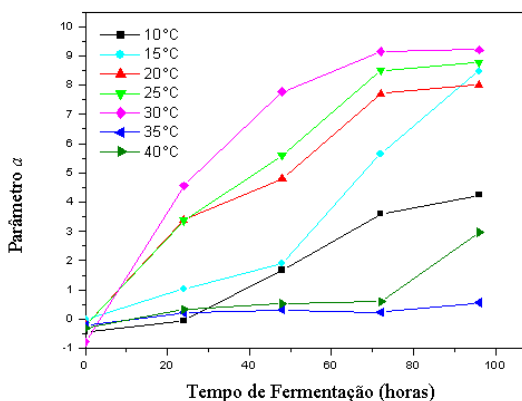


Figura 2: Pigmentação em diferentes temperaturas

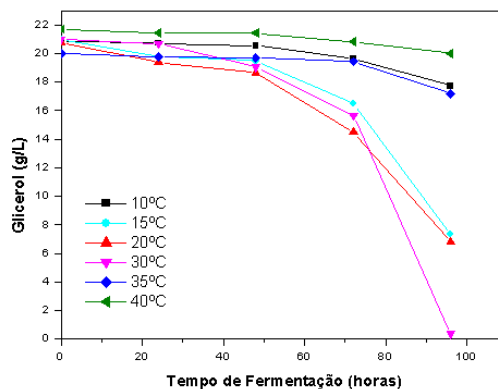


Figura 3: Consumo de glicerol em diferentes temperaturas

### Influência da agitação no crescimento microbiano

Avaliou-se o efeito de diferentes agitações (100, 150 e 200 rpm) no processo fermentativo utilizando ágar sabouraud na estocagem e ativação do microrganismo. Segundo os resultados de biomassa na Figura 4, observou-se uma diminuição no crescimento microbiano quando se variaram rotações diferentes de 150 rpm.

De forma similar com a etapa anterior, não foi possível estabelecer uma relação direta entre o teor de biomassa e o valor de  $a^*$  (Figura 5). Contudo, pode-se observar um grande incremento no valor de  $a^*$ , após o término da formação de biomassa. Resultado que condiz com os observados por Costa et al. (1987), que relatam que a formação de carotenóides ocorre durante a fase estacionária, devido a serem metabólitos secundários.

Quando se utilizou a rotação de 100rpm, o glicerol foi pouco consumido, restando ainda 17,23g/L, confirmando a baixa produção de biomassa. O mesmo acontece para a rotação de 200rpm, restando ainda 15,56g/L. Na rotação de 150rpm, como era de se esperar, houve um maior consumo de glicerol, restando apenas 7,36g/L, confirmando uma maior produção de biomassa. (Figura 6)

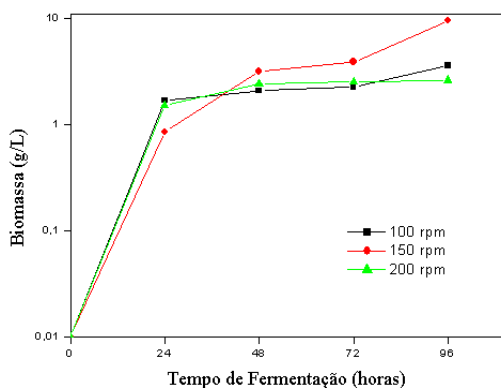


Figura 4: Produção de biomassa em diferentes rotações

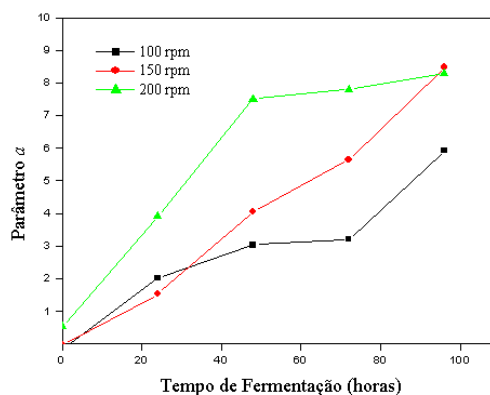


Figura 5: Pigmentação em diferentes rotações

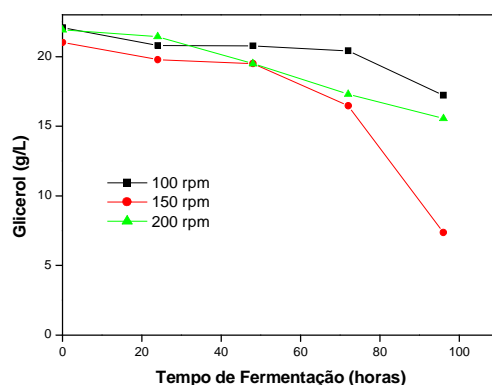


Figura 6: Consumo de glicerol em diferentes rotações

### Influência das fontes de nitrogênio no crescimento microbiano

Avaliou-se o efeito de diferentes fontes de nitrogênio como peptona, extrato de levedura e sulfato de amônia no processo fermentativo. Segundo os resultados de biomassa da figura 7, observou-se uma similaridade dos resultados nos meios contendo extrato de levedura, já nos meios contendo sulfato de amônia não apresentaram bons resultados.

Foi possível estabelecer uma relação direta entre o teor de biomassa e o valor de  $a^*$ . Os melhores resultados para a pigmentação também foram dos meios contendo extrato de levedura. (Figura 8)

Os meios contendo apenas glicerol como fonte de carbono apresentaram um maior consumo do mesmo, exceto o que contém apenas sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. O maior consumo de glicerol (restando apenas  $7,33\text{g.L}^{-1}$ ) foi obtido no meio contendo apenas peptona e glicerol, devido ao glicerol ser a única fonte de carbono presente. (Figura 9)

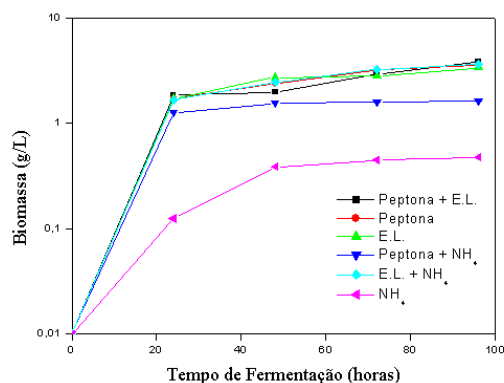


Figura 7: Produção de biomassa na presença de diversas fontes de nitrogênio

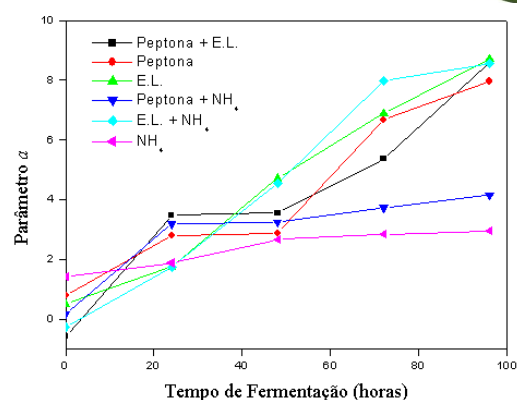


Figura 8: Pigmentação na presença de diversas fontes de nitrogênio

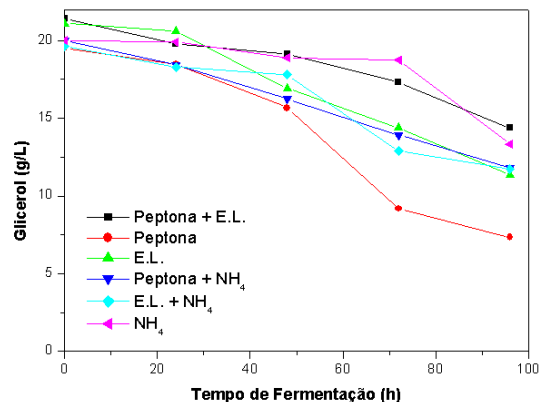


Figura 9: Consumo de glicerol na presença de diversas fontes de nitrogênio

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que essa levedura do gênero *Rhodotorula* apresentou crescimento significativo no meio contendo glicerol como fonte de carbono. A temperatura e a agitação exercem papéis fundamentais tanto para o crescimento como para a pigmentação. Os melhores resultados para a produção de biomassa foram obtidos a 15°C e 150 rpm. A fonte de nitrogênio indispensável na composição do meio é o extrato de levedura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Heyman E. P.; Yokoyama C. O.; Simpson K. L. (1974), Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *J. Bacteriol*, 120, p. 1339-1343.
- Simpson K. L.; Nakayama T. O. M.; Chichester C. O. (1964), Biosynthesis of yeast carotenoids. *J. Bacteriol*, 88, p. 1688-1694.
- Nelis H.; De Enheer A. P. (1991), Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl Bacteriol*, 70, p. 181-191.



# XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS

Natal / RN

02 a 05 de agosto

2009

Lampila L. E.; Wallen S. E.; Dulerman L. B.; Lowry S. R. (1985), The effect of illumination of growth and  $\beta$ -carotene content of *Blakeslea trispora* grown in whey. *Lebensmittel Wiss Technol*, 18, p. 370-373.

Aksu Z.; Eren A. T. (2005), Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as carbon source. *Process Biochemistry*, 40, p. 2985-2991.

Aksu Z.; Eren A. T. (2007), Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*.

Imandi S. B.; Bandaru V. V. R.; Somalanka S. R.; Garapati H. R. (2006), Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, (2007), p. 1367-1372.

Melendez-Martinez, A. J.; Vicario, I. M. Heredia, F. J. (2003), Application of Tristimulus Colorimetry To Estimate the Carotenoids Content in Ultrafrozen Orange Juices. *J. Agric. Food Chem.*, 51, p. 7266-7270.