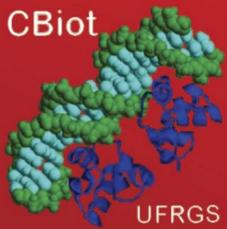


Aplicação de levedura oleaginosa como matéria-prima para a produção de biodiesel



Mariana Ritter Rau¹ e Marilene Henning Vainstein^{1,2}.

1 Centro de Biotecnologia e 2 Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - Instituto de Biociências, UFRGS.



INTRODUÇÃO

Leveduras oleaginosas (Oily Yeasts – OY) são capazes de acumular lipídios intracelulares acima de 20% de seu peso seco (Ageitos *et al.*, 2011), estado metabólico induzível por elevada razão carbono/nitrogênio. Após a fase exponencial de crescimento, o nitrogênio se torna limitante e durante a fase estacionária a OY direciona o fluxo de carbono para o metabolismo de lipídios, e o acumula em gotas. O isolado QU31, identificado como *Yarrowia lipolytica*, é uma OY, e pode ser cultivada em substratos como resíduos industriais para a geração de óleo com valor agregado. O óleo pode ser aplicado na indústria de biodiesel, este gerado por transesterificação entre triacilglicerídeos (TAG) e um álcool por um catalisador. Foi descrito por Thilveros (2014) a lise celular por solvente (metanólise), com liberação do óleo microbiano e a reação de transesterificação simultâneas, demonstrando um processo ágil para a síntese de biodiesel a partir de óleo microbiano.

MATERIAIS E MÉTODOS

CULTIVO – Fonte de carbono: soro de queijo, glicerina de biodiesel gerado no próprio laboratório, glicerina de biodiesel da indústria Bianchini S.A. (resíduos) ou glicose (controle positivo), a 10%, exceto soro de queijo, a 5%. Fonte de nitrogênio e sais: $(NH_4)_2SO_4$ 0,1%, KH_2PO_4 0,1% e $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,05%. Razão C:N de 100:1. Cultivado por 96h a 25°C e 150 RPM.

PARÂMETROS AVALIADOS APÓS 96h

Biomassa: 5ml da cultura foi filtrado em membrana 0.22µm previamente pesada, em triplicata. Após seca, foi pesada novamente. **Teor de lipídios:** conforme Bligh & Dyer (1959), em triplicatas. **Gotas intracelulares de óleo:** microscopia conforme Greenspan *et al.*, (1985).

METANÓLISE E TRANSESTERIFICAÇÃO (Met. e Trans.) – conforme metodologia de Thilveros, P *et al.*, (2014). Brevemente, a biomassa filtrada do cultivo foi seca a 60° e, em seguida, incubada a 50°C com uma solução de NaOH 4g/L em MeOH por 10h. A separação dos ésteres metílicos formados foi feita com a adição de hexano. As fases foram coletadas para análises. Realizada ao menos 2 vezes para cada substrato testado.

CROMATOGRAFIA – Avaliação da produção de biodiesel e do perfil, através de CCD (Cromatografia em Camada Delgada) e CG-FID (Cromatografia Gasosa), conforme Chattopadhyay, S. *et al.*, (2011) e pelo método EN 14103 (2011), respectivamente.

CONCLUSÕES

- A levedura é capaz de assimilar diferentes resíduos industriais e direcionar para o acúmulo de lipídios neutros;
- O teor e o perfil de lipídios produzidos, bem como a produção de biomassa, variam conforme o substrato de crescimento;
- A reação de metanólise e transesterificação, originalmente descrita para *Rhodospiridium toruloides*, é eficaz para a produção de biodiesel a partir da levedura *Yarrowia lipolytica* QU31.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGEITOS, J. M. *et al.* Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol* v.90 1219-1227, 2011.
- BEPOULOS, A. *et al.* *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lip Res*, v.48, 375-387, 2009.
- BLIGH, E.G. and DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J of Biochem and Physiol*, v.37, 911-917, 1959.
- CHATTOPADHYAY, S. *et al.* Rapid and precise estimation of biodiesel by high performance thin layer chromatography. *Appl Energy* v. 88, 5188-5192, 2011.
- EN 14103 – Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. *European Committee for Standardization*, 2011.
- GREENSPAN, P. *et al.* Nile red: A selective stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* v.100, 965-973, 1985.
- THILVEROS, P. *et al.* Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass. *Bioresour Technol* v. 157,181-187, 2014.

RESULTADOS

O substrato em que foi observada a maior gota intracelular de óleo foi a glicerina industrial, e a maior biomassa (mas também menor teor de lipídios) foi produzida em soro de queijo (Fig. 1). Crescimento catalítico e síntese de lipídios são processos opostos, em OY. Logo, é importante encontrar um ponto que equilibre a geração de quantidade grande de biomassa seguida da síntese de lipídios e fenótipo de “fat yeast”.

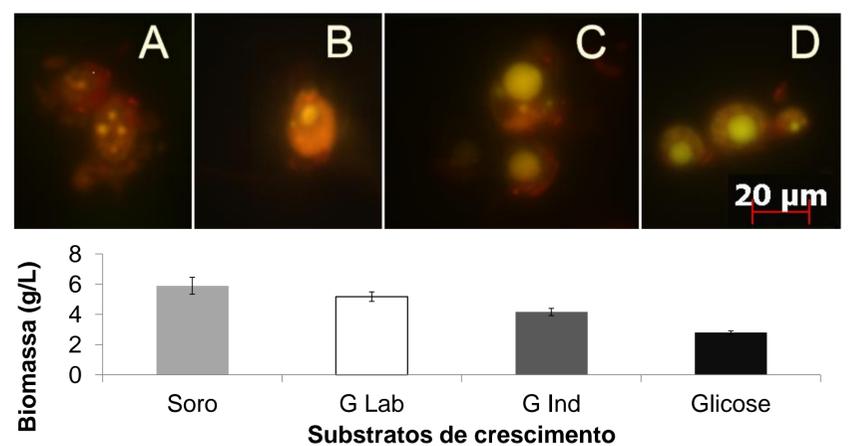


Figura 1: Acima, observação do acúmulo de lipídios após 96h de cultivo. Em amarelo, lipídios neutros (TAG); em vermelho, fosfolipídios. De A até D, diferentes substratos de crescimento: Soro de queijo, glicerina produzida no laboratório (G Lab), glicerina industrial (G Ind) e glicose. Abaixo, biomassa em g/L após cultivo por 96h nos mesmos substratos.

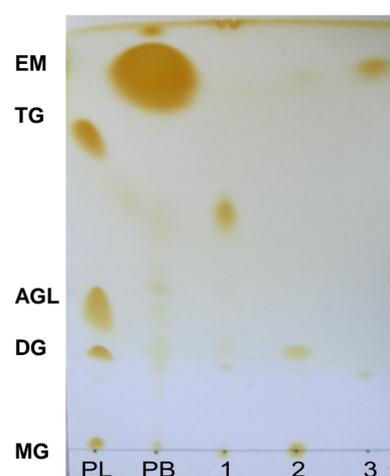


Figura 2: CCD. PL: padrão lipídios; PB: padrão biodiesel; 1: óleo de QU31. 2 e 3: fases da reação de metanólise e transesterificação após separação, sendo 2: fase inferior (restante da reação) e 3: fase superior (biodiesel purificado em hexano). EM: ésteres metílicos (biodiesel); TG: triglicerídeos; AGL: ácidos graxos livres; DG: diglicerídeos; MG: monoglicerídeos.

A reação de Met. e Trans. levou a síntese de biodiesel com sucesso utilizando biomassa da OY cultivada em todos os substratos testados. Na figura 2, linha 3, pode ser vista a banda correspondente ao biodiesel e, na linha 2, MG e TG não consumidos na reação. O perfil de EM analisado por GC-FID varia levemente com o cultivo nos diferentes meios, sendo composto majoritariamente (80% juntos) de C18:1 e C18:2, ésteres apropriados para a composição de biodiesel, e isto está de acordo com o relatado na literatura como o perfil produzido pelo metabolismo de lipídios da levedura (Beopoulos *et al.*, 2009). Aperfeiçoamentos ainda podem ser feitos nas condições de cultivo e de

síntese de biodiesel, visando maximizar o potencial de uso da levedura QU31 como fonte de óleo para a produção do biocombustível.