

## ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS: SELEÇÃO, EXTRAÇÃO E OTIMIZAÇÃO

Lucas de Carvalho<sup>1\*</sup>, Jacqueline A. Takahashi<sup>2</sup>, Flávia A. G. Gonçalves<sup>1</sup>

1. Estudante de IC do Departamento de química do CEFET-MG

2. Pesquisadora do Departamento de química ICEX da UFMG

3. Pesquisadora do Departamento de química do CEFET-MG / Orientador

### Resumo:

Praticamente todos os microrganismos são capazes de sintetizar lipídeos, entretanto, algumas espécies acumulam quantidades de lipídeos superiores a 20% do seu peso seco, sendo denominados "microrganismos oleaginosos".

No presente estudo, avaliou-se a produção de óleo microbiano em 20 espécies de fungos, cultivadas em fermentação submersa. Realizou-se a determinação da massa de micélios secos e de óleo produzido, previamente extraído.

Os resultados indicaram que a agitação do meio proporcionou crescimento desejável granular dos micélios, favorecendo um aumento da massa de micélios e um aumento significativo para obtenção de Single Cell Oil (SCO). Das espécies testadas, três produziram mais de 20% de óleo em relação à sua biomassa seca, o que as caracterizam como microrganismos oleaginosos. Quatro espécies, mesmo não sendo microrganismos oleaginosos, apresentaram potencial para produção significativa de óleo que deve ser confirmado pela avaliação do seu perfil lipídico.

**Palavras-chave:** *Single Cell Oil; fungos filamentosos; ácidos graxos.*

### Introdução:

Praticamente todos os microrganismos são capazes de realizar a síntese de lipídeos para realizarem as suas funções essenciais, entretanto, algumas espécies são capazes de acumular quantidades de lipídeos superiores a 20% da sua massa seca, sendo denominados "microrganismos oleaginosos". Os lipídeos são armazenados pelos organismos sob a forma de triglicerídeos (Ratledge e Wynn, 2002).

Para se obter uma síntese significativa de SCO, o meio utilizado deve conter carbono em excesso e quantidade limitada de um outro constituinte, que geralmente é o nitrogênio. Como o microrganismo não possui quantidades suficientes de nitrogênio

necessário para a síntese de ácidos nucleicos e proteínas o microrganismo não se multiplica, mas continua assimilando o carbono fornecido, direcionando-o à síntese de lipídeos, que é armazenado no interior das células, em corpos lipídicos (Beopoulos et al., 2009; Gonçalves et al.; 2014).

Segundo Thevenieau & Nicaud (2013), para avaliar o potencial de um microrganismo em relação à produção de óleo são levados em consideração a quantidade de lipídeo que ele consegue acumular, uma vez que quanto maior sua produção, mais atrativo economicamente ele se torna; a composição do óleo produzido, pois certos ácidos graxos possuem aplicações industriais interessantes; o seu desempenho em meios de cultivo de baixo custo, já que este é fator que onera a produção de SCO.

Dentre as diversas vantagens de se utilizar os óleos microbianos em detrimento aos demais, Nunes (2007) apontou a redução da competição com os óleos vegetais produzidos para a alimentação como um dos principais. Além disso, os microrganismos possuem um rápido ciclo produtivo, pois não sofrem influências de variações externas, como clima, características do solo, sazonalidade dentre outras.

No presente estudo foi avaliada a produção de *Single Cell Oil* por vinte e uma espécies de fungos filamentosos.

### Metodologia:

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de ensino e pesquisa do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG). As 21 espécies de fungos testadas pertenciam à coleção de culturas do Laboratório Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICEx) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As 21 espécies de fungos filamentosos testadas foram cultivadas em ágar PDA. Inicialmente, realizou-se uma seleção primária dos potenciais fungos produtores de lipídeo, utilizando-se a técnica qualitativa

microscópica, utilizando corante Sudan Black B desenvolvida por Burdon (1946).

Após a análise qualitativa, realizou-se a fermentação submersa, em que padronizou-se uma concentração  $10^7$  esporos/mL, que foi inoculada em meio de cultura líquido rico em glicose e pobre em como fontes de nitrogênio. Para tanto, 1 mL do inóculo foi adicionado a um frasco tipo Erlenmeyer contendo 50 mL do meio de cultura previamente esterilizado. A incubação foi realizada com e sem agitação a 180 rpm em agitador orbital (Biosan), e à temperatura ambiente por seis dias (adaptado de XIA et al. 2011).,

Após o período de incubação, o óleo foi extraído com hexano e determinou-se a massa dos micélios secos e dos óleos previamente extraídos, de acordo com a metodologia ..

### Resultados e Discussão:

De acordo com os resultados obtidos no teste qualitativo de coloração celular utilizando o corante Sudan Black B desenvolvido por Burdon (1946), observou-se que observou-se que nem todas as espécies testadas apresentaram evidência da presença de óleo, uma vez sendo em vista que as gotículas de óleo adquiriram coloração azul-preto / azul-cinza, o que determinou se os fungos que produziram lipídios Intracelular. No entanto, com essa técnica é qualitativa e existe a possibilidade de um resultado falso negativo/positivo, todas as 21 espécies de fungos foram cultivadas em fermentação submersa para certificar se eram ou não produtoras de lipídeo intracelular.

Após o período de incubação, observou-se que a agitação do meio proporcionou um crescimento desejável granular dos micélios, favorecendo não somente um aumento da biomassa micelial, mas em alguns casos, favoreceu a produção de lipídeos pelos fungos. O crescimento granular dos micélios é considerado ideal por Xia e colaboradores (2011), uma vez que facilita a separação dos microrganismos do meio de cultura e favorece o cultivo de altas concentrações celulares. Ainda de acordo com os autores, enquanto os grânulos de fungos filamentosos podem ser separados por filtração, a separação de microalgas e leveduras requer técnicas de centrifugação de alto valor, tornando a produção em larga escala de SCO ainda mais inviável do ponto de vista econômico.

Das espécies de fungos testadas, três produziram mais de 20% de óleo em relação à sua biomassa seca, caracterizando-os como

microrganismos oleaginosos (Tabela 01), enquanto que outras quatro espécies, mesmo não sendo classificadas como microrganismos oleaginosos, apresentaram potencial para uma produção significativa de SCO o que precisa ser confirmado pela avaliação do seu perfil lipídico por meio da cromatografia gasosa.

**Tabela 1.** Espécies de fungos oleaginosas

Espécie	Massa seca	Óleo extraído	Relação Óleo/Massa
<i>P. islandicum</i>	0,2488 g	0,0768 g	30,87%
<i>C. of globosum</i>	0,2771 g	0,0605 g	21,83%
<i>N. fischeri</i>	0,2030	0,0528	26,01%

Para dar continuidade aos estudos iniciados neste trabalho, sugere-se realizar a determinação do perfil lipídico dos mesmos através da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS), uma vez que por meio da determinação do perfil lipídico do óleo produzido pelos microrganismos avalia-se a aplicação do mesmo para algum processo industrial viabilizando a sua produção em larga escala. Sugere-se também a realização de testes variando a razão C/N do meio de cultivo para verificar a interferência desta variável nos acúmulos de lipídios, assim como as variáveis pH, temperatura e tempo de cultivo;



**Figura 01.** Crescimento em grânulos dos Fungos filamentosos e extração dos óleos

### Conclusões:

Os fungos das espécies *Penicillium islandicum*, *Neosartorya fischeri* e *Chaetomium of globosum* como microrganismos oleaginosos, uma vez que apresentaram uma produção de SCO superior a 20%. As outras espécies apesar de não serem classificadas como oleaginosas apresentaram uma produção significativa de SCO nas condições estabelecidas, sendo extremamente viável a determinação de seu perfil lipídico a fim de avaliar a viabilidade de se empregar um

método de otimização da produção de SCO por tais microrganismos.

A produção de óleo pelo fungo oleaginoso possui inúmeras e promissoras aplicações, principalmente no ramo alimentício e na produção de biodiesel, que são as indústrias que mais consomem óleo, apresentando um mercado amplo e propício para sua inserção, ainda mais que apresentam diversas vantagens em relação aos óleos provenientes do petróleo e aos óleos vegetais. No entanto, investimento em pesquisas são necessários a fim de se determinar condições econômicas favoráveis para a produção em larga escala.

### Referências bibliográficas

- AKPINAR-BAYIZIT, A. Fungal Lipids: The Biochemistry of Lipid Accumulation. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, v. 5, n. 5, p. 409-414, 2014.
- AKPINAR-BAYIZIT, A.; OZCAN, T.; YILMAZ-ERSAN, L.; BASOGLU, F. Single cell oil (SCO) production by *Fusarium* species using cheese whey as a substrate. Cheese whey and single cell oil production, *Mljekarstvo*. Uludag University, Faculty of Agriculture, Department of Food Engineering, Gorukle, Bursa-Turkey. Original scientific paper - *Izvorni znanstveni rad*. 64 (2), 111-118, 2014.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Prog Lipid Res*, v. 48, n. 6, p. 375-387, 2009a.
- GONÇALVES, F. A. G.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. *Hindawi Publishing Corporation e Scientific World Journal*. v. 2014, Article ID 476207, p.1-14, 2014
- EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Effect of Nitrogen Source on Lipid Accumulation in Oleaginous Yeasts. *Journal of General Microbiology*, v. 130, p. 1693-1704, 1983.
- FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BATSOS, A.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 573-580, 2009a.
- NUNES, S. P. Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil. *Boletim Eletrônico DESER*, n. 159, 2007.
- RATLEDGE, C. *Single Cell Oils for the 21st Century*. Inc: Cohen, Ratledge, editors. *Single cell oils*. Champaign, Illinois: Aocs Press, p.1-20, 2005.
- TAKAHASHI, J.A., DE CASTRO, M.C.M., SOUZA, G.G., LUCAS, E.M.F., BRACARENSE, A.A.P., ABREU, L.M., MARRIEL, I.E., OLIVEIRA, M.S., FLOREANO, M.B., OLIVEIRA, T.S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *Journal de Mycologie Médicale*, v.18, p.198-204, 2008.
- THEVENIEAU, F.; NICAUD, J.-M. Microorganisms as sources of oils. *Oilseeds & fats Crops and Lipids Journal*, v. 20, n. 6, p. 603-610, 2013.
- XIA, C., ZHANG, J., ZHANG, W., HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnology for Biofuels*. p. 1-10, 2011
- XU, J.; DU, W.; ZHAO, X.; ZHANG, G.; LIU, D. Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 7, n. 1, p. 65-77, 2012.