



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

# CULTIVO DO FUNGO *MUCOR CIRCINELLOIDES* PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIO (*SINGLE CELL OIL-SCO*) UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO

A. K. F. CARVALHO<sup>1</sup>, D. V. CORTEZ<sup>1</sup>, L. M. BRUNO<sup>2</sup>, H. F. de CASTRO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> EMBRAPA- Agroindústria Tropical

E-mail para contato: anacarvalho@usp.br

**RESUMO** – Uma linhagem selvagem de *Mucor circinelloides* URM 4182 de banco de cultura nacional selecionada como potencial microrganismo oleaginoso forneceu single cell oil (SCO) com características adequadas para síntese de biodiesel, quando cultivada em meios líquidos sintéticos contendo glicose como fonte de carbono. Visando avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono no potencial desta linhagem para produzir lipídios foram elaborados meios líquidos sintéticos contendo fontes de carbono que estão presentes em diversos resíduos agroindustriais, tais como sacarose e frutose (melaço de cana-de-açúcar), xilose (hidrolisado de material lignocelulósico), amido (refino de milho), etanol e glicerol (subproduto das indústrias de biodiesel). Nas condições testadas, todas as fontes de carbono foram assimiladas pelo *M. circinelloides* URM 4182, proporcionando diferentes percentuais de lipídio, obtendo resultados que variaram de 4 a 18% (g lipídio/g de biomassa).

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de biodiesel utilizando *single cell oils* (SCOs) tem recebido importância recentemente por ser uma potencial fonte de energia renovável e compatível com o conceito das biorrefinarias (Vongsangnak *et al.*, 2013). O termo *single cell oil* foi cunhado com a intenção de denominar principalmente os triacilgliceróis de microrganismos, similares aos encontrados em óleos e gorduras provenientes de fontes animais e vegetais. Os microrganismos capazes de produzir e acumular mais de 20% de sua biomassa em lipídios são denominados oleaginosos e podem pertencer ao grupo das bactérias, leveduras, fungos e algas (Economou *et al.*, 2011).

Dentre os microrganismos oleaginosos, os do gênero *Mucor* tem grande importância biotecnológica por acumular altos níveis de carotenoides e lipídios em seu micélio. Entre as espécies mucoralis produtoras de lipídios encontra-se o fungo *Mucor circinelloides* que apresenta lipídios ricos em ácidos graxos poli-insaturado, podendo ser utilizado como matéria-prima alternativa na produção de biodiesel (Vongsangnak *et al.*, 2013).

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

Em trabalhos anteriores desenvolvidos (Carvalho *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2015) foram consolidados dados da potencialidade da estirpe de *Mucor circinelloides* URM 4182 para a produção de biomassa oleaginosa (*single cell oil*) em meio contendo glicose como única fonte de carbono. Os experimentos foram conduzidos em shaker orbital e alcançaram produtividade de biomassa (Qx) de 1,06 g/L.dia com rendimento em lipídio da ordem de 44% (Carvalho *et al.*, 2015).

A aplicação industrial dos óleos microbianos pode ser limitada pelos altos custos nos processos de fermentação para obtenção de SCO. A fonte de carbono utilizada para o cultivo de SCO é responsável por uma grande parte dos custos de produção de lipídio. Geralmente para o cultivo de fungos com concomitante acúmulo de lipídio são utilizadas fontes de carbono convencionais, tais como a glicose, no entanto, a introdução de substratos alternativos como resíduos agrícolas e industriais apresentam vantagens em virtude da sua grande disponibilidade e baixo custo (Liang; Jiang, 2015; Reis *et al.*, 2014).

Sabendo-se *a priori* do potencial do fungo *M. circinelloides* URM 4182 para produzir lipídios em meios sintéticos, o objetivo do presente trabalho foi utilizar diferentes fontes de carbono, tais como, sacarose, xilose, frutose, amido de milho, etanol e glicerol, como substratos em substituição à glicose para a produção de SCO. Essas fontes de carbono foram selecionadas, devido ao seu conhecido potencial para a produção de lipídio microbiano descrito na literatura e também porque se encontram disponíveis em grandes quantidades nos resíduos agroindustriais como o melaço de cana-de-açúcar e materiais lignocelulósicos (Huang *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2014; Papanikolaou *et al.*, 2011; Botha *et al.*, 1997).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Cultivo do Fungo *M. circinelloides* URM 4182 em Diferentes Fontes de Carbono

No presente trabalho foi utilizada a estirpe *Mucor circinelloides f. griseo-cyanus* URM 4182 adquirida da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (URM-UFPE). A cultura foi previamente crescida em PDA (Potato-Dextrose Agar) a 30 °C por 72 h e mantida a 4°C para manutenção.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio constituído de: fonte de carbono (sacarose, xilose, frutose, amido de milho, etanol ou glicerol), 20 g/L; sulfato de amônia, 1,5 g/L; ácido glutâmico, 1,5 g/L; ácido nicotínico, 1 mg/L; tiamina, 1 mg/L e extrato de levedura, 0,5 g/L. O pH foi ajustado manualmente para 4,5 mediante adição de NaOH (1,0 M) a cada 24 h. Os frascos foram inoculados com uma suspensão  $1 \times 10^5$  esporos/mL de meio e incubados sob agitação em shaker orbital (250 rpm) a 26 °C por 120 h.

Os experimentos foram conduzidos em duplicata. O meio de cultura era separado das células por filtração a vácuo (com auxílio de funil de Buchner acoplado em Kitazato contendo papel de filtro Whatman n° 1). Na biomassa celular foi determinada a concentração de biomassa e teor de lipídios

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



(seção 2.2). A biomassa era pesada em balança analítica e a umidade foi determinada em balança de secagem acoplada a uma lâmpada de infravermelho (Marte, Modelo ID 50).

## 2.2. Extração de Lipídios da Biomassa de *M. circinelloides* URM 4182

Os lipídios foram extraídos das células com umidade entre 70-85% e a extração foi realizada utilizando 0,05 g de biomassa fúngica (base seca) suspensa em 25 mL de etanol 96% como solvente, em um reator de micro-ondas comercial (modelo Discover/University-Wave, Cem Corporation), constituído por uma câmara cilíndrica interna com 75 mm de diâmetro e 100 mm de altura, com agitador magnético e controle de temperatura por fluxo de ar comprimido, baseando-se na metodologia descrita por Cravotto *et al.* (2008).

A temperatura dentro da câmara foi controlada mediante variação automática da potência de micro-ondas sendo a máxima de 200 W. Foi avaliada a concentração de lipídios (% m/m) obtida em três tratamentos extrativos independentes a 30 min e temperatura de 60 °C.

## 2.3. Determinação dos Parâmetros Bioquímicos de Cultivo e Análise dos Resultados

A eficiência da produção de lipídios microbianos foi calculada com base nos resultados de concentração de biomassa (CB) e o rendimento de lipídio (%L) obtidos nos cultivos do *M. circinelloides* 4182 nos diferentes meios, conforme equações 1, 2, respectivamente.

$$CB = \frac{\text{massa seca da biomassa celular (g)}}{\text{volume do caldo de fermentação (L)}} \quad (1)$$

$$\%L = \frac{\text{massa de lipídio (g)}}{\text{massa da biomassa celular}} \times 100 \quad (2)$$

Os resultados dos diferentes cultivos também foram analisados considerando os seguintes parâmetros: produtividade volumétrica em relação à biomassa ( $Q_x$ ) (Equação 4) e produtividade volumétrica em relação ao lipídio ( $Q_p$ ) (Equação 5). Os parâmetros foram calculados com os dados obtidos em 120 h de cultivo das células.

$$Q_x = \left( \frac{\Delta X}{\Delta t} \right) = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (3)$$

$$Q_p = \left( \frac{\Delta P}{\Delta t} \right) = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (4)$$

Em que:  $X_i$  e  $X_f$  = concentração inicial e final de biomassa;  $P_i$  e  $P_f$  = concentração inicial e final de lipídio;  $t_i$  e  $t_f$  = tempo inicial e final da fermentação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as fontes de carbono testadas foram assimiladas pelo *M. circinelloides* URM 4182, proporcionando diferentes percentuais de lipídio, obtendo resultados que variaram de 4 a 18% (g lipídio/g de biomassa), conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros bioquímicos do cultivo de *Mucor circinelloides* URM 4182 em shaker orbital utilizando diferentes fontes de carbono (120h)

Fonte de Carbono	Biomassa (g/L)	Lipídio (% , g/g biomassa)	Q <sub>x</sub> (g/L.dia)	Q <sub>p</sub> (g/L.dia)
Amido solúvel	6,87±0,01	13,27±0,06	1,72±0,01	0,28±0,01
Sacarose	6,05±0,06	12,12±0,01	1,51±0,01	0,18±0,01
Frutose	5,01±0,01	18,60±0,02	1,25±0,01	0,23±0,01
Xilose	5,51±0,02	16,72±0,01	1,38±0,01	0,23±0,01
Etanol	0,23±0,05	4,18±0,02	0,06±0,01	0,004±0,01
Glicerol	0,78±0,01	12,69±0,01	0,20±0,01	0,025±0,01
*Glicose	4,23±0,09	44,0±0,15	1,06±0,02	0,47±0,06

\*Carvalho *et al.*, 2015

De acordo com a Tabela 1 é possível observar que a linhagem fúngica utilizada assimilou bem os açúcares (sacarose, frutose e xilose) e o polissacarídeo (amido solúvel) testados como fontes de carbono, apresentando valores de produtividade de biomassa (Q<sub>x</sub>) entre 1,25 a 1,72 g/L.dia com rendimentos lipídicos superiores a 12%.

Embora a biomassa obtida no cultivo em meio contendo glicerol como única fonte de carbono, tenha alcançado rendimentos lipídicos superiores a 12%, este cultivo apresentou baixa produtividade de biomassa (Q<sub>x</sub>) bem como baixa produtividade lipídica (Q<sub>p</sub>) da ordem de 0,20 e 0,025 g/L.dia, respectivamente. Em relação à assimilação de etanol, o fungo foi capaz de germinar e crescer, porém, produziu baixíssima concentração de biomassa e produtividade lipídica de apenas 0,004 g/L.dia.

Estes resultados são similares aos relatados por Botha *et al.*, (1997), que estudaram o crescimento de *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* CBS108.16 em meios sintéticos contendo diferentes fontes de carbono e constataram que o fungo foi capaz de crescer em todas as aldoses que apresentam a mesma configuração de átomo de carbono assimétrico e também em amido solúvel. No entanto, o etanol foi pouco assimilado, visto que a capacidade de assimilar alcoóis de cadeia curta como única fonte de carbono, não é amplamente encontrada entre as espécies de fungos. Os autores também constataram que o fungo em questão não assimila de maneira satisfatória poliálcoois com três



XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

ou quatro átomos de carbono, assim como o glicerol, o que explica a baixa produtividade de biomassa encontrada no presente trabalho.

Verifica-se ainda na Tabela 1 que o cultivo utilizando frutose e xilose forneceram concentrações mais elevadas de lipídios (>16%, m/m) em relação as demais fontes de carbono testadas. Portanto, pode-se constatar que embora a glicose seja o açúcar mais utilizado no crescimento de biomassa para a produção de lipídio, os demais açúcares testados em especial a xilose e frutose podem ser usados como fontes de carbono, uma vez que estes açúcares apresentam potencial para a industrialização da produção SCO e são encontrados em grandes quantidades em resíduos agroindustriais, tais como o melaço e hidrolisados de biomassa lignocelulósica. O melaço obtido a partir de cana-de-açúcar ou de beterraba é um subproduto industrial da fabricação de açúcar. Geralmente, o melaço contém frutose, sacarose, glicose e por conseguinte, é considerado uma matéria-prima ideal para formulações de meio de cultura de baixo custo e o seu uso é bastante elucidado na literatura, visto que é amplamente utilizado na indústria de fermentação para a produção de etanol. As fontes de biomassa lignocelulósica, como palha, bagaço e sabugo de milho são também de baixo custo, relativamente fáceis de adquirir e podem ser hidrolisadas gerando xilose para a produção de SCO (Huang *et al.*, 2015).

Estes resultados são similares aos descritos por Reis *et al.*, (2014) que estudaram a produção de lipídio por *Mucor circinelloides* (ATCC1216B) cultivado em meios contendo diferentes fontes de carbono incluindo glicose, frutose, manose, galactose e xilose obtendo resultados satisfatórios de rendimentos lipídicos. Para efeito de comparação com os cultivos contendo meios sintéticos, estes autores cultivaram a mesma espécie de fungo em meio contendo, como substrato alternativo, hidrolisado de palha de milho com elevada quantidade de xilose (22,29 g/L) alcançando rendimentos lipídicos satisfatórios da ordem de 29,10% m/m.

## 4. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos indica que as fontes de carbono mais assimiladas pela espécie de *M. circinelloides* URM 4182 foram os açúcares (sacarose, frutose e xilose) e o polissacarídeo (amido solúvel). Deste modo, pode-se concluir que os co-produtos dos processos agrícolas e industriais que apresentarem estas fontes de carbono, são fortes candidatos para serem utilizados como substrato alternativo viável e de menor custo para produzir SCO de *M. circinelloides* URM 4182, visando a competitividade com outros processos industriais de produção de combustíveis. Além disso, os resultados sugerem a viabilidade de utilização fontes sacaríneas derivadas, por exemplo, de melaço ou fontes derivadas de material lignocelulósico, por exemplo, a xilose, como potenciais fontes de carbono para cultivo de SCO do fungo *M. circinelloides*.

## 5. REFERÊNCIAS

BOTHA, A.; KOCK, J. L. F.; COETZEE, D. J.; BOTES, P. J. Physiological properties and fatty acid composition in *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*. *Antonie Leeuwenhoek*, v.71, p. 201–206, 1997.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro  
de Engenharia Química

Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o  
Ensino de Engenharia Química  
Fortaleza/CE  
25 a 29 de setembro

- CARVALHO, A. K. F.; RIVALDI, J. D.; BARBOSA, J. C.; CASTRO, H. F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides* – A sustainable pathway for biofuel production. *Bioresour. Technol.*, v. 181, p. 47–53, 2015.
- CARVALHO, A. K. F.; RIVALDI, J. D.; RÓS, P. C. M. DA; DE CASTRO, H. F. Transesterificação enzimática de Single cell oil (SCO) de *Mucor circinelloides* para a produção de biodiesel", p. 2145-2150 . In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/chemeng-cobeq2014-1536-18779-151151.
- CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, MILVIO.; CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrason. Sonochem.*, v. 15, p. 898-902, 2008.
- ECONOMOU, C. N.; VASILIADOU, I. A.; AGGELIS, G.; PAVLOU, S.; VAYENAS, D. V. Modeling of oleaginous fungal biofilm developed on semi-solid media. *Bioresour. Technol.*, v. 102, p. 9697-9704, 2011.
- HUANG, C.; CHEN, X. F.; XIONG, L.; CHEN, X. D.; MA, L.L.; CHEN, Y. Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. *Biotechnol. Adv.*, v. 31, p.129-139, 2013.
- LIANG, Y-J.; JIANG, J-G. Characterization of malic enzyme and the regulation of its activity and metabolic engineering on lipid production. *RSC Adv.*, v. 5, p. 45558-45570, 2015.
- PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G.; MARC, I. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 80, p. 215–224, 2001.
- REIS, E. R. C.; ZHANG, J.; HU, B., Lipid accumulation by pelletized culture of *Mucor circinelloides* on corn stover hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 174, p. 411-423, 2014.
- VONGSANGNAK, W.; RUENWAI, R.; TANG, X.; HU, X.; ZHANG, H.; SHEN, B.; SONG, Y.; LAOTENG, K. Genome-scale analysis of the metabolic networks of oleaginous Zygomycete fungi. *Gene*, v. 521, p. 180–190, 2013.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO

