

Seleção de fungos filamentosos capazes de crescer em diferentes glicerinas como única fonte de carbono

Andréia Aparecida Jacomassi Carneiro¹, Gleiciane P. Sousa², Diogo Keiji Nakai³, Thályta Fraga Pacheco⁴, Léia Cecília de Lima Fávoro⁵, Simone Mendonça⁶, Itânia Pinheiro Soares⁷, Mônica Caraméz Triches Damaso⁸

Resumo

Com o crescente aumento mundial na produção de biodiesel, inclusive no Brasil, existe uma grande oportunidade em agregar valor ao coproduto gerado, a glicerina. Neste trabalho, três glicerinas de diferentes origens (padrão comercial, brutas de óleo de palma e de soja) foram utilizadas como única fonte de carbono, para avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de 96 linhagens de fungos endofíticos, previamente isolados de cana-de-açúcar. A glicerina de óleo de palma foi produzida neste trabalho como coproduto da produção de biodiesel por transesterificação com metanol. Todas as linhagens avaliadas foram identificadas taxonomicamente por técnicas moleculares. As 96 linhagens foram incubadas em YNB acrescido das glicerinas, por 7 dias a 28 °C. A medição do diâmetro das colônias foi realizada após 3º, 5º e 7º dias, com o auxílio de um paquímetro digital. As faixas de valores de IVCM (mm/dia) para as glicerinas de palma, soja e comercial foram 0,49-18,97; 2,02-20,79; 2,68-18,50, respectivamente. Dentre as 96 linhagens, somente 13 não cresceram em meio contendo glicerina de palma. Para a glicerina comercial e de soja, houve crescimento de todas as linhagens. Com base nos valores de IVCM e na identificação taxonômica, 20 delas foram selecionadas para testes futuros de bioconversão visando avaliar a síntese de químicos utilizando-se glicerina bruta.

¹ Bióloga, doutora em Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, andreia.jacomassi@colaborador.embrapa.br

² Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, gleiciane.sousa@colaborador.embrapa.br

³ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, mestre em Ciências Mecânicas, analista da Embrapa Agroenergia, diogo.nakai@embrapa.br

⁴ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁵ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁶ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

⁷ Química, doutora em Química Analítica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, itania.soares@embrapa.br

⁸ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

Introdução

Com o aumento mundial da produção de biodiesel, um excedente cada vez maior de glicerina está sendo gerado, surgindo a necessidade de novas aplicações para esse coproduto. A glicerina tem sido avaliada como fonte de carbono na produção de compostos químicos de interesse comercial, utilizando-se diferentes microrganismos. Em estudo recente, realizado na Embrapa Agroenergia, a bioconversão de glicerina bruta metílica de soja possibilitou a produção de polióis manitol e arabitol, usando o fungo filamentoso *Paecilomyces variotti* CCFF/IOC 4627 (FONTES et al., 2016).

Apesar de o óleo de soja ser a matéria-prima mais utilizada para a produção de biodiesel no Brasil, há outras oleaginosas que apresentam características vantajosas.

Segundo Issariyakul e Dalai (2014), o óleo de palma é uma fonte promissora para a produção de biodiesel por apresentar maior produção de óleo por área, se comparado a outros óleos, o que possibilita menor preço final dessa matéria-prima.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de crescimento de 96 linhagens de fungos filamentosos empregando três diferentes glicerinas (comercial, brutas de soja e de palma). A utilização da glicerina de palma, visa à avaliação futura dessa matéria-prima para produção de químicos por bioconversão.

Material e métodos

Glicerinas

A glicerina bruta metílica de palma foi produzida na planta piloto da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. A glicerina bruta metílica de soja foi gentilmente cedida pela indústria Cesbra Química S.A. (Volta Redonda, RJ). A glicerina padrão comercial (PA) foi adquirida comercialmente. As glicerinas de soja e PA possuem pureza de 52% e 99,5%, em termos de glicerol, respectivamente.

Produção de biodiesel e glicerina de óleo de palma

A reação de esterificação do óleo de palma com H_2SO_4 1% foi realizada em reator Parr de 19 L de capacidade total, a 60 °C por 1 hora, com agitação contínua de 120 rpm. Após lavagem e secagem, a fase mais densa foi transferida para o

tanque de reação, e adicionou-se o metanol (5,590 L) e o catalisador (1% da massa do óleo, 640 mL de $\text{Na}(\text{CH}_3\text{O})$, equivalente a 190 g de NaOH). A reação de transesterificação ocorreu por 1 hora a 60 °C. As duas fases formadas (glicerina e biodiesel) foram separadas nesse tanque. O metanol foi removido da glicerina, sob pressão reduzida.

Análise da quantificação da glicerina de palma por HPLC

A pureza da glicerina de palma foi determinada, em duplicata, por HPLC utilizando detector RID, coluna Aminex HPX-87H e solução de H_2SO_4 5 mM como fase móvel.

Manutenção e reativação dos microrganismos

Fungos filamentosos endofíticos associados à cana-de-açúcar, isolados de folhas e raízes, preservados na “Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias”, da Embrapa Agroenergia, foram avaliados neste estudo. As referidas linhagens foram utilizadas por terem apresentado em trabalhos anteriores capacidade de crescer em meio de cultura contendo 18% de glicerol (dados não mostrados). Os fungos filamentosos foram cultivados em meio de cultura PDA (Potato Dextrose Agar) e crescidos em estufa a 28 °C, por 5 dias.

Identificação taxonômica dos fungos filamentosos

Os fungos foram cultivados em meio de cultura comercial PDB (Potato Dextrose Broth), por 5 dias a 28 °C. O micélio foi coletado, lavado e macerado com nitrogênio líquido. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit. O DNA extraído foi utilizado como molde em reações de PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico, a qual contém aproximadamente 600 pares de bases. Após purificação e quantificação dos produtos de PCR, estes foram sequenciados por empresa terceirizada. As sequências foram analisadas com auxílio do software CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com/>), para obtenção da sequência consenso. As sequências foram analisadas com o auxílio da ferramenta Blast em bases de dados curadas de fungos filamentosos: MycoBank (<http://www.mycobank.org/>), Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>), Aftol (<http://www.aftol.org>), TrichOKEY

(<http://isth.info/tools/molkey/index.php>) e também na base não curada do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Crescimento dos fungos filamentosos em meio de cultivo contendo glicerinas de diferentes origens

As 96 linhagens reativadas foram inoculadas em meio estéril contendo *Yeast Nitrogen Base* (YNB) 6,7 g/L, ágar 15 g/L, e glicerinas (4 %, v/v) de palma, soja e comercial, separadamente, como única fonte de carbono. Todas as linhagens foram inoculadas com um disco contendo o microrganismo, nos três meios de cultura, e crescidas a 28 °C, em triplicata. O crescimento das linhagens foi medido no 3º, 5º e 7º dias de incubação, pela medida do diâmetro das colônias dos fungos, utilizando um paquímetro digital. O cálculo do Índice da Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) foi obtido pelo $\sum [(diâmetro da colônia no dia atual - diâmetro da colônia no dia anterior)/(dias de incubação)]$.

Resultados e discussão

A produção de glicerina bruta de óleo de palma foi de 3,4 kg (contendo metanol) e 16,4 kg de biodiesel. Assim o rendimento biodiesel/óleo foi de 91%. Após a remoção do metanol (~1 L), o rendimento da glicerina foi de aproximadamente 70,6%. Em seguida, a glicerina bruta de palma foi quantificada por HPLC e apresentou pureza de 51,7% de glicerol. Além do metanol, a glicerina bruta contém outras impurezas. Segundo Hájek e Skopal (2010), essas impurezas são essencialmente constituídas por sais (orgânicos e inorgânicos), água, sabão e pigmentos provenientes de vegetais.

Dentre as 96 linhagens de fungos filamentosos analisadas, somente 13 não cresceram em meio adicionado de glicerina de palma. Nos meios contendo glicerinas de soja e comercial (PA), todas as linhagens cresceram. As faixas de valores de IVCM (mm/dia) em meio contendo a glicerina de palma, soja e comercial foram de 0,49-18,97; 2,02-20,79; 2,68-18,50, respectivamente (Figura 1). As linhagens AR273, 109, e 174 cresceram por toda a placa em meio com glicerina padrão (dados não apresentados). Até o momento, não se encontrou uma justificativa para esse crescimento tão mais expressivo em glicerina padrão. A presença de metanol nas glicerinas brutas não pode ser a justificativa, pois as três linhagens foram as que mais cresceram em glicerina bruta de soja que tem

mais metanol (19,3%) do que a glicerina bruta de palma (6,14%), na qual as linhagens AR273 e 109 não apresentaram crescimento (Figura 1).

Em virtude da falta de dados sobre uma correlação entre o valor de IVCM e a produção dos químicos (identificação e quantificação), optou-se por selecionar fungos com valores de IVCM em diferentes faixas: alto, médio e baixo (Tabela 1), independentemente do tipo de glicerina utilizada.

Vale ressaltar que, para seleção das linhagens, além dos valores de IVCM obtidos em glicerina padrão, soja e palma, também foi utilizado como critério de seleção o conhecimento do gênero ou da espécie dos fungos, na tentativa de se escolher linhagens taxonomicamente diversas.

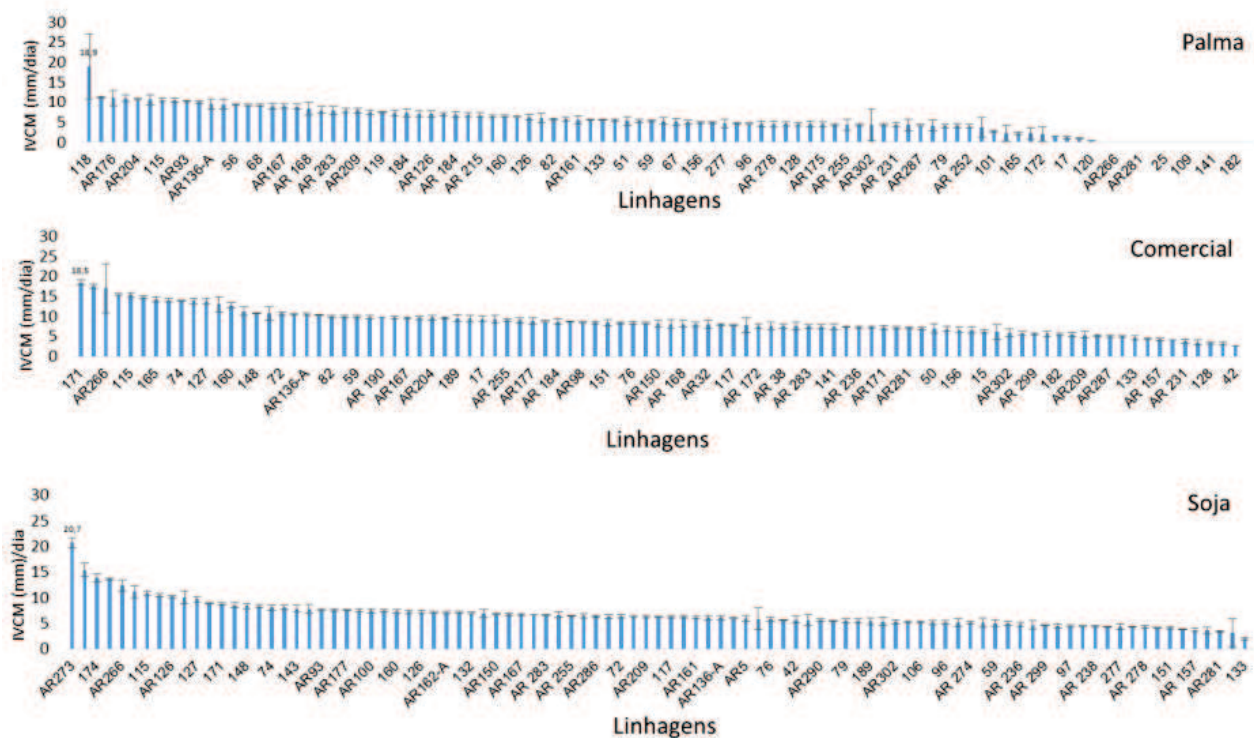


Figura 1. Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) obtido para cada uma das linhagens, nas diferentes glicerinas, em ordem decrescente. O valor de IVCM é a média de triplicatas.

Tabela 1. Valores de IVCM obtidos por linhagens fúngicas quando cultivadas em meios de cultura contendo ágar e os três tipos de glicerinas.

Identificação**	Código da coleção	IVCM (mm/dia)		
		Palma	Soja	PA
<i>Fusarium</i> sp.	118	18,9	13,7	14,8
<i>Trichoderma harzianum</i>	109	0	15,42	ND*
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	AR273	0	20,79	ND*
<i>Trichoderma harzianum</i>	174	4,31	13,87	ND*
<i>Aspergillus terreus</i>	AR136-A	9,59	6,15	10,54
<i>Aspergillus terreus</i>	125	6,39	4,2	5,83
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	156	4,96	4,73	6,68
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	165	2,29	5,84	14,29
<i>Beauveria bassiana</i>	AR240	9,3	7,56	9,65
Não identificado	AR5	5,58	5,96	5,64
<i>Peniophora versiformis</i>	51	5,37	5,55	7,00
<i>Trametes sanguinea</i>	AR287	4,25	4,54	5,15
<i>Penicillium spinulosum</i>	151	0	4,18	8,5
<i>Penicillium funiculosum</i>	17	1,13	5,14	9,41
<i>Phoma</i> sp.	172	2,06	8,55	13,06
<i>Phomopsis</i> sp.	120	0,49	11,19	13,91
<i>Fusarium</i> sp.	AR176	11,08	6,74	9,46
<i>Fusarium</i> sp.	56	9,42	6,67	7,82
<i>Fusarium</i> sp.	115	10,61	10,95	15,36
<i>Fusarium fujikuroi</i>	160	6,57	7,32	12,81
Não identificado	AR12	10,71	6,32	17,61

*ND: não determinado. O fungo cresceu por toda a placa de Petri.

**Identificação baseada em análise da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico.

Conclusões

A maioria das linhagens avaliadas apresentou crescimento nos três diferentes tipos de glicerina, inclusive a de palma, produzida neste trabalho. Dentre as 96 linhagens estudadas, somente 13 não cresceram em glicerina de palma dendê. O potencial de utilização das glicerinas brutas de palma e soja, em detrimento à glicerina comercial mostram a possibilidade de aproveitar essas matérias-primas brutas para crescimento de fungos filamentosos e possível aplicação na produção de compostos químicos de interesse comercial, como, por exemplo, polióis.

Apoio financeiro

Os autores agradecem ao programa Capes-Embrapa, pela concessão de bolsa de pós-doutorado de Andréia A. J. Carneiro; à Financiadora de Estudos e Pesquisa (Finep), pelo recurso financeiro (Projeto DendePalm), e à Embrapa Agroenergia, pelo suporte e infraestrutura para realização dos experimentos.

Referências

FONTES, P. R.; RIBEIRO, J. A. de A.; COSTA, P. P. K. G.; DAMASO, M. C. T.; GONZALEZ, W. de A.; SANTOS, C. M. C. dos.; ABDELNUR, P. V.; RODRIGUES, C. M. Development and validation of a HILIC-UPLC-ELSD method based on optimized chromatographic and detection parameters for the quantification of polyols from bioconversion processes. **Analytical Methods**, Cambs, v. 8, n. 9, p. 2048-2057, 2016.

HÁJEK, M.; SKOPAL, F. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 101, n. 9, p. 3242-3245, 2010.

ISSARIYAKUL, T.; DALAI, A. K. Biodiesel from vegetable oils. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Berlin, v. 31, p. 446-471, 2014.