

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS  
OLEAGINOSOS A PARTIR DE LAGOA DE  
ESTABILIZAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNOS, VISANDO À  
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Autor: Jadson Belem de Moura

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

RIO VERDE - GO

Fevereiro – 2011

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS  
OLEAGINOSOS A PARTIR DE LAGOA DE  
ESTABILIZAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNOS, VISANDO À  
PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Autor: Jadson Belem de Moura

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde - Área de Concentração Ciências Agrárias

Rio Verde - GO

Fevereiro – 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA

Jadson Belem de Moura

Isolamento e caracterização de fungos oleaginosos a partir de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, visando à produção de biodiesel

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

1. *Microorganismos oleaginosos* 2. *Biodiesel* 3. *Impacto ambiental*

I. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tantas bênçãos e sempre iluminar meus caminhos.

À minha família: Edson dos Santos Moura e Janete Belem Pereira de Moura (pais) e Lígia Belém Pereira de Moura (irmã), por demonstrarem com exemplos como é viver com a dignidade de um homem e a honra de um cristão e que, com seu carinho e fé inabalável, estiveram comigo, mesmo distantes, em todos os problemas e dificuldades.

Ao professor Edson Luiz Souchie, que além de orientador, foi meu mentor, meu exemplo e, acima de tudo, um amigo que jamais esquecerei.

Ao Leonnardo Cruvinel Furquim, que se tornou um dos meus melhores amigos, e que sem sua ajuda eu não estaria concluindo hoje esta etapa.

À minha família alternativa: José Aurélio Vázquez Rubio, Janete Vieira da Silva Vázquez Rubio e Aurélio Rubio Neto (vulgo roots), serei sempre grato.

Aos meus mais importantes amigos: Bruno, Camilla, Daniela, Flavio, Gustavo, José Mateus, Juliana, Karen, Laiany, Neide, Willian, Rafael e muitos outros.

A Rodrigo Martins, por ser um ótimo estagiário e amigo.

A Flaysner Magaiver Portela, pelas análises químicas e por levar tão a sério a Profissão Perigo.

Ao CNPq e CAPES, pela bolsa concedida.

A todos os docentes do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, que participaram da minha formação acadêmica durante o mestrado.

## BIOGRAFIA

Jadson Belem de Moura, filho de Edson dos Santos Moura e Janete Belem Pereira de Moura, nasceu em Anápolis - GO, no ano de 1985. Sua formação profissional iniciou-se em 2005, no curso superior de Tecnologia em Produção de Grãos pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Verde - GO. Em 2009, iniciou seu Mestrado em Ciências Agrárias no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, concluindo no ano de 2011.

## ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMO GERAL .....	ii
GENERAL ABSTRACT .....	iii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
OBJETIVOS GERAIS .....	5
CAPÍTULO 1 .....	6
MICRORGANISMOS DE LAGOA DE ESTABILIZAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNOS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL .....	6
Material e Métodos .....	11
Resultados e Discussão .....	12
Conclusões .....	16
Referências bibliográficas .....	16
CAPÍTULO 2 .....	21
CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE BIOMASSA FÚNGICA PARA A GERAÇÃO DE BIODIESEL .....	21
Material e Métodos .....	25
Resultados e Discussão .....	26
Conclusões .....	32
Referências Bibliográficas .....	33
CONCLUSÕES GERAIS .....	36

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

	Página
<b>Tabela 1.</b> Meios de cultura e valores de pH para isolamento de microalgas, bactérias e fungos em lagoa de estabilização de dejetos de suínos.....	11
<b>Tabela 2.</b> Presença (+) e ausência (-) de fungos, bactérias e microalgas em lagoa de estabilização de dejetos de suínos em Rio Verde - GO, isolados com quatro meios de cultura em duas faixas de pH.....	13
<b>Tabela 3.</b> Massa e teor de óleo de isolados fúngicos, obtidos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos em Rio Verde – GO, para a geração de óleo e produção de biodiesel.....	15

### CAPÍTULO 2

	Página
<b>Tabela 1.</b> Teor de óleo de isolados fúngicos, obtidos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos em Rio Verde - GO, para a geração de óleo e produção de biodiesel.....	29
<b>Tabela 2.</b> Análise de composição em ácidos graxos do isolado 25 do gênero <i>Mucor</i> spp.....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

	Página
<b>Figura 1.</b> Regiões da CCD de amostras de diferentes óleos de isolados fúngicos.....	26
<b>Figura 2.</b> Isolado 25, Gênero <i>Mucor</i> spp.....	27
<b>Figura 3.</b> Isolado 26, Gênero <i>Mucor</i> spp.....	27
<b>Figura 4.</b> Isolado 29, Gênero <i>Aspergillus</i> spp.....	28
<b>Figura 5.</b> Isolado 31, Gênero <i>Rhizopus</i> spp.....	28
<b>Figura 6.</b> Isolado 33, Gênero <i>Rhizopus</i> spp.....	29
<b>Figura 7.</b> CCD de amostras de diferentes óleos de isolados fúngicos .....	30
<b>Figura 8.</b> Cromatogramado biodiesel produzido a partir do isolado 25 do gênero <i>Mucor</i> spp.....	31

## RESUMO GERAL

A produção de biocombustíveis, em especial o biodiesel, tornou-se uma das formas mais eficientes de diversificar a matriz energética, contribuindo para a conservação do meio ambiente e o desenvolvimento econômico, por meio da redução da emissão de gases do efeito estufa. O uso de isolados fúngicos para extração de óleo e a geração de biodiesel tem despertado crescente interesse da comunidade científica mundial. Os objetivos deste trabalho foram: 1) isolar microalgas, bactérias e fungos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, utilizando diversos meios de cultura; 2) avaliar o potencial de produção de óleo destes isolados microbianos; 3) realizar a caracterização química do óleo extraído da biomassa de alguns isolados fúngicos, selecionados pelo seu alto potencial para a geração de biodiesel. Foram utilizados quatro meios de cultura (GL, BDA, Agar nutritivo e Contagem padrão), duas faixas de pH dos meios e três diluições para isolamento de bactérias, fungos e microalgas. Foi utilizada a metodologia de diluições sucessivas e contagem direta de unidades formadoras de colônias em placas, após cinco e nove dias de incubação a 28°C, na ausência de luminosidade. Em todos os meios de cultura, foi possível isolar mais bactérias do que fungos e microalgas. O teor de óleo foi determinado por extração em Soxhlet. Foi realizada uma cromatografia de camada delgada para separação dos diferentes constituintes do óleo extraído. Fungos e microalgas foram detectados, predominantemente, pelos meios GL e BDA, nas duas faixas de pH testadas. Os isolados 4, 7, 9, 19, 22, 24, 25, 26, 29, 31, 32 e 33 apresentaram teor de lipídios acima de 25% de sua biomassa seca, o que os caracteriza como microrganismos oleaginosos. Os isolados 25, 26, 29, 31 e 33 apresentaram maior potencial para a geração de óleo para a produção de biodiesel. Comparando-se esses cinco isolados, não houve diferença quanto ao seu rendimento de óleo. No óleo extraído a partir da biomassa fúngica, destes cinco isolados, não foram observados triglicerídeos e ácidos graxos, porém, foram detectados ésteres, o que confirma a reação de transesterificação do óleo microbiano. A maioria das amostras apresentou transesterificação incompleta, com a presença de mono e diacilglicerídeos. Entretanto, a amostra do isolado 25 apresentou uma característica mais próxima da produção de biodiesel, com a transesterificação completa.

Palavras-chave: Biodiesel; microrganismos oleaginosos; fungos oleaginosos

## GENERAL ABSTRACT

The production of biofuels, especially biodiesel, is one of the most effective alternatives to change the energy sources. Consequently, it increases the environment conservation and the economic development. The use of microalgae, bacteria and fungi for oil production to biodiesel generation has attracted crescent interest from the worldwide scientific community. This work aimed to isolate microorganisms from the storage of pig slurry, using different culture media, in order to extract microbial oil for biodiesel generation. Their oil production potential and oil characterization were also evaluated. Four culture media (GL, PDA, Nutrient agar and Standard counting), two pH ranges and three dilutions were used to isolate bacteria, fungi and microalgae. The successive dilution method and direct counting of colony-forming units in plates were used, after five and nine days of incubation at 28 °C in darkness. In all culture media was possible to isolate more bacteria than fungi and microalgae. The oil from the fungi isolates was determined by Soxhlet extraction. It was performed a thin layer chromatography for separation of different constituents of the oil and microalgae extracted . In all culture media more bacteria than fungi and microalgae isolates were obtained. Fungi and microalgae isolates were detected predominantly in GL and PDA media in both pH ranges. The isolates 4, 7, 9, 19, 22, 24, 25, 26, 29, 31, 32 and 33 showed lipid content up to 25% of their dry weight, characterizing them as oleaginous microorganisms. The isolates 25, 26, 29, 31 and 33 showed the highest potential for oil generation to biodiesel production. Comparing these five fungi isolates, there was no difference in oil yield produced by them. In these oil samples triglycerides and fatty acids were not verified. On the other hand, esters were detected which confirmed the transesterification of fungi oil. The major of oil samples showed incomplete transesterification, with the presence of mono- and diacylglycerides. However, for the oil from the isolate 25 there was a complete transesterification showing the best characteristics for biodiesel production.

## INTRODUÇÃO GERAL

É crescente o interesse pelo uso racional de energia utilizada para atender as necessidades da sociedade em geral: movimentar indústrias, transporte, comércio e demais setores econômicos dos países. Segundo projeção da Energy Information Administration (2008), o consumo de energia no mundo tende a aumentar cerca de 50% de 2005 a 2030, sobretudo nos países em desenvolvimento (GRISOLI et al., 2009).

A produção de biocombustíveis, em especial o biodiesel, tornou-se uma das formas mais eficientes para diversificar a matriz energética. Isto, conseqüentemente, contribui para a conservação do meio ambiente e favorece o desenvolvimento econômico, por meio da redução da emissão de gases do efeito estufa e a descentralização de investimentos, para a geração de emprego e renda no campo. Entretanto, é necessário que sejam estabelecidos mecanismos de suporte à produção e comercialização desses biocombustíveis. Isso é possível pela otimização de recursos e a interação das instituições públicas, privadas e dos pequenos produtores rurais. Desta forma, tornam-se essenciais, para a geração de informações confiáveis, estudos que demonstrem a viabilidade jurídica, técnica, ambiental, social e comercial dos biocombustíveis (LOFRANO, 2008).

Os biocombustíveis são fontes de energias renováveis, derivadas de produtos agrícolas como açúcar, plantas oleaginosas, biomassa florestal e outras fontes de matéria orgânica. Em alguns casos, estes podem ser usados de forma isolada, como adicionados aos combustíveis convencionais. Como exemplos, há o biodiesel, o etanol, o metanol, o gás metano e o carvão vegetal (BIOCOMBUSTÍVEIS, 2007). Diversas matérias-primas podem ser utilizadas na produção de biodiesel e podem ser divididas nos seguintes grupos: óleos vegetais, gordura animal e óleos e gorduras residuais.

Alguns microrganismos como microalgas, protozoários e fungos acumulam cerca de 30 a 80% de lipídios em sua biomassa (MURPHY et al., 2005). Vicente et al. (2009) constataram 85% de lipídios na biomassa seca do fungo *Mucor circinelloides*, o que demonstra alto potencial para a produção de biodiesel. Segundo Teixeira e Teixeira (2006), Zhang e Ratledge (2008) e Angerbauer et al. (2008) algumas espécies microbianas podem apresentar alto teor de lipídios (20 a 68% de sua massa seca).

O uso de microrganismos como fonte de lipídios tem sido investigado extensivamente para a sua aplicação como aditivos alimentares, farmacêuticos e ingredientes de alimentos para a aquicultura (RATLEDGE, 1991; RATLEDGE, 2004, SZCZESNA-ANTCZAK, 2006). Os microrganismos são fontes de óleos comestíveis, já que apresentam a capacidade de produzir óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados, que são muito visados como suplementos dietéticos e para a nutrição infantil (RATLEDGE, 2002). Recentemente, tem sido investigado o uso de microrganismos oleaginosos para a produção de biodiesel, particularmente de microalgas que capturam o dióxido de carbono para transformação em lipídios, utilizando a luz solar. No entanto, esses microrganismos fotossintéticos têm problemas relacionados ao seu crescimento em sistemas de reator, em virtude da necessidade de fornecimento de luz e de grandes áreas para garantir sua multiplicação. Por outro lado, há poucas informações sobre o uso de lipídios a partir de fungos e bactérias para a produção de biodiesel.

A utilização de microalgas, bactérias e fungos para a produção de óleo e geração de biodiesel tem despertado crescente interesse da comunidade científica mundial (GRISOLI et al., 2009). Além disso, o processo de extração de óleo, utilizando metodologias oficiais da Oil Chemist's Society (AOCS, 1999), é relativamente simples e estes organismos podem ser cultivados em ambientes inóspitos para a maioria das espécies vegetais, como áreas degradadas, desérticas, de mineração, lagoas de estabilização de dejetos de suínos etc. Entretanto, seu uso de forma comercial requer mais estudos para comprovar a sua real eficácia, comparada às plantas (ANGERBAUER et al., 2008).

O uso de microrganismos oleaginosos, para a geração de biodiesel, baseia-se na capacidade que estes possuem de converter a energia química da biomassa em energia útil, sendo considerado um processo limpo de produção de energia. Além disso, esse tipo de energia não provoca impactos ambientais e tampouco envolve a produção de materiais perigosos. Também, sua produção pode ser realizada localmente, próxima da região de demanda, o que minimiza os custos relacionados ao sistema de distribuição (BUCKLEY & WALL, 2006).

A produção de suínos caracteriza-se por um sistema intensivo de confinamento, tendo como consequência a produção de elevada quantidade de dejetos. Esses contribuem para a degradação ambiental por meio da poluição e contaminação das águas superficiais e subterrâneas, poluição orgânica pelo nitrogênio, fonte de microrganismos patogênicos, poluição do ar e alta incidência de insetos

(ANGERBAUER et al., 2008). Entretanto, os dejetos de suínos podem traduzir-se em excelente fonte de substrato para a multiplicação de microrganismos de interesse. Na região sudoeste Goiana, a suinocultura industrial gera alta quantidade de dejetos, o que impacta negativamente o ambiente. Uma forma de mitigar tal problema consiste na utilização das lagoas de estabilização de dejetos de suínos para multiplicação de microalgas, bactérias e fungos oleaginosos para a geração de biodiesel.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBAACH, M.; GUEBITZ, G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3051–3056, 2008.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Champaign: AOCS, 1999, 1200p.

BIOCOMBUSTÍVEIS. Disponível em: <http://www.polobio.esalq.usp.br/biocomustiveis.html>. Acesso em 22 de maio de 2007

BUCKLEY, M.; WALL, J. **Microbial energy conversion**. American Academy of Microbiology: Washington, 2006, 22p.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. *International Energy Outlook 2008*. Disponível em: [www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/highlights.html](http://www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/highlights.html). Acesso em: 23 ago. 2008.

FAO. *Chapter 6 – Oil production*. Disponível em: [www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0h.htm](http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0h.htm). Acesso em: 25 ago. 2008.

GRISOLI, R.; COELHO S. T.; MATAI P. H. L. S. Energia microbiológica. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 4, n. 2, p. 1-19, 2009.

LOFRANO, R. C. Z. Uma revisão sobre biodiesel. **Pensamento Plural. Revista Científica do INIFAE**, v. 2, n. 2, p. 83-89, 2008.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2005.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids, **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 5, p. 429–438, 1991.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production, **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807–815, 2004.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms, **Biochemical Society Transactions**, v. 30, 1047–1050, 2002.

SZCZESNA-ANTCZAK, M.; ANTCZAK, T.; PIOTROWICZ-WASIAK, M.; RZYSKA, M.; BINKOWSKA, N.; BIELECKI, S. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1214–1222, 2006.

TEIXEIRA, P. C. N.; TEIXEIRA, C. M. L. L. Potencial de geração de biocombustíveis a partir de microalgas. **CONAE – Conferência Internacional de Agroenergia** – 11 a 13 de dezembro, Londrina, Paraná. 2006.

VICENTE, G.; BAUTISTA L. F.; RODRÍGUEZ R.; GUTIÉRREZ F. J.; SÁDABA I.; RUIZ-VÁZQUEZ R.M.; TORRES-MARTÍNEZ R.; GARRE V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 22-27, 2009.

ZHANG, Y.; RATLEDGE, C. Multiple isoforms of malic enzyme in the oleaginous fungus, *Mortierella alpine*. **Mycological Research**, v. 112, n. 6, p. 725–730, 2008.

## OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram: 1) isolar microalgas, bactérias e fungos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, utilizando diversos meios de cultura; 2) avaliar o potencial de produção de óleo destes isolados microbianos; 3) realizar a caracterização química do óleo extraído da biomassa de alguns isolados, selecionados pelo seu alto potencial para a geração de biodiesel.

## CAPÍTULO 1

# **MICROORGANISMOS DE LAGOA DE ESTABILIZAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNOS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

## **Microrganismos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos para a produção de biodiesel**

Microorganisms from storage of swine manure for biodiesel production

**Resumo** - A utilização de microalgas, bactérias e fungos para a produção de óleo com vistas à geração de biodiesel tem despertado crescente interesse da comunidade científica mundial. Objetivou-se com este trabalho isolar microalgas, bactérias e fungos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, utilizando diversos meios de cultura, visando à extração de óleo e geração de biodiesel, além de avaliar o potencial de produção do óleo destes isolados. Foram utilizados quatro meios de cultura (GL, BDA, Agar nutritivo e Contagem padrão), duas faixas de pH dos meios e três diluições para isolamento de bactérias, fungos e microalgas. Foi utilizada a metodologia de diluições sucessivas e contagem direta de unidades formadoras de colônias em placas, após cinco e nove dias de incubação a 28°C, na ausência de luminosidade. Em todos os meios de cultura, foi possível isolar mais bactérias do que fungos e microalgas. A determinação de rendimento de óleo foi realizada por extração em Soxhlet. Fungos e microalgas foram detectados, predominantemente, pelos meios GL e BDA, nas duas faixas de pH testadas. Os isolados 4, 7, 9, 19, 22, 24, 25, 26, 29, 31, 32 e 33 apresentaram teor de lipídeos acima de 25% de sua biomassa seca, o que os caracteriza como microrganismos oleaginosos. Os isolados 25, 26, 29, 31 e 33 apresentaram maior potencial para a geração de óleo e produção de biodiesel.

**Palavras-chave:** sustentabilidade, dejetos de suínos, óleo microbiano, fungos oleaginosos.

**Abstract** - The use of microalgae, bacteria and fungi for oil production to biodiesel generation has attracted crescent interest from the worldwide scientific community. This work aimed to isolate microorganisms from the storage of pig slurry, using different culture media, in order to extract microbial oil for biodiesel generation. Their potential of oil production was also quantified. Four culture media (GL, PDA, Nutrient agar and Standard counting), two pH ranges and three dilutions were used to isolate bacteria, fungi and microalgae. The successive dilution method and direct counting of colony-

forming units in plates were used, after five and nine days of incubation at 28 °C in darkness. In all culture media more bacteria than fungi and microalgae isolates were obtained. Fungi and microalgae isolates were detected predominantly in GL and PDA media in both pH ranges. The isolates 4, 7, 9, 19, 22, 24, 25, 26, 29, 31, 32 and 33 showed lipid content up to 25% of their dry weight, characterizing them as oleaginous microorganisms. The isolates 25, 26, 29, 31 and 33 showed the highest potential for oil generation to biodiesel production.

**Key words** - Sustainability. Swine manure. Microbial oil. Oleaginous fungi.

## **Introdução**

É crescente o interesse pelo uso racional de energia utilizada para atender as necessidades da sociedade em geral: movimentar indústrias, transporte, comércio e demais setores econômicos dos países. Segundo projeção da Energy Information Administration (2008), o consumo de energia no mundo tende a aumentar cerca de 50% de 2005 a 2030, sobretudo nos países em desenvolvimento (GRISOLI et al., 2009).

A produção de biocombustíveis, em especial o biodiesel, tornou-se uma das formas mais eficientes para diversificar a matriz energética. Isto, conseqüentemente, contribui para a conservação do meio ambiente e favorece o desenvolvimento econômico, por meio da redução da emissão de gases do efeito estufa e a descentralização de investimentos, para a geração de emprego e renda no campo. Entretanto, é necessário estabelecer mecanismos de suporte à produção e comercialização desses biocombustíveis. Isso é possível pela otimização de recursos e a interação das instituições públicas, privadas e dos pequenos produtores rurais. Desta forma, tornam-se essenciais para a geração de informações confiáveis, estudos que demonstrem a viabilidade jurídica, técnica, ambiental, social e comercial dos biocombustíveis (LOFRANO, 2008).

Diversas matérias-primas podem ser utilizadas na produção de biodiesel e serem divididas nos seguintes grupos: óleos vegetais, gordura animal e óleos e gorduras residuais. Especificamente, os biocombustíveis são fontes de energias renováveis, derivadas de produtos agrícolas como açúcar, plantas oleaginosas, biomassa florestal e outras fontes de matéria orgânica. Em alguns casos, estes podem ser usados de forma isolada, como adicionados aos combustíveis convencionais. Como exemplos, há o

biodiesel, o etanol, o metanol, o gás metano e o carvão vegetal (BIOCOMBUSTÍVEIS, 2007).

Alguns microrganismos, como microalgas, protozoários, fungos e bactérias acumulam cerca de 30 a 80% de lipídios em sua biomassa (MURPHY, 2005). Para um microrganismo ser classificado como oleaginoso é necessário um teor acima de 25% de lipídios em sua biomassa seca (RATLEDGE, 2004). Geralmente, o óleo destes microrganismos está na forma de triglicérides, que se traduz no principal componente dos óleos vegetais e gorduras animais. Portanto, os lipídios microbianos podem potencialmente ser usados como matéria-prima para a produção de biodiesel, por meio da reação de transesterificação com metanol, na presença de um catalisador básico. Segundo Teixeira e Teixeira (2006), Zhang e Ratledge (2008) e Angerbauer et al. (2008) algumas espécies microbianas podem apresentar potencial de produção de biodiesel, em razão de seu alto teor de lipídios, que podem alcançar de 20 a 68% de sua massa seca. Vicente et al. (2009) constataram 85% de lipídeos na biomassa seca de *Mucor circinelloides*, que demonstrou alto potencial para a produção de biodiesel.

O uso de microrganismos como fonte de lipídios tem sido investigado extensivamente para a sua aplicação como aditivos alimentares, farmacêuticos e ingredientes de alimentos para a aquicultura (RATLEDGE, 1991; RATLEDGE, 2004, SZCZESNA-ANTCZAK, 2006). Os microrganismos são fontes de óleos comestíveis, já que apresentam a capacidade de produzir óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados, que são muito visados como suplementos dietéticos e para a nutrição infantil (RATLEDGE, 2002). Recentemente, tem sido investigado o uso de microrganismos oleaginosos para a produção de biodiesel, particularmente de microalgas que capturam o dióxido de carbono para transformação em energia, utilizando a luz solar. No entanto, esses microrganismos fotossintéticos têm problemas relacionados ao seu crescimento em sistemas de reator, por causa da necessidade de fornecimento de luz e de grandes áreas para sua garantir sua multiplicação. Por outro lado, há poucas informações sobre o uso de lipídios a partir de fungos e bactérias para a produção de biodiesel.

A utilização de microalgas, bactérias e fungos para a produção de óleo para a geração de biodiesel tem despertado crescente interesse da comunidade científica mundial (GRISOLI et al., 2009). Entretanto, até o presente, há escassez de informações em relação às espécies de leveduras, fungos e bactérias que potencialmente podem ser recomendadas para este fim. Contrariamente, o processo de extração de óleo, utilizando metodologias oficiais da Oil Chemist's Society (American Oil Chemists' Society, 1999),

é relativamente simples e estes organismos podem ser cultivados em ambientes inóspitos para a maioria das espécies vegetais, como áreas degradadas, desérticas, de mineração, lagoas de estabilização de dejetos de suínos, dentre outros. Além disso, a produção desses microrganismos não compete com a produção de alimentos e resíduos de biomassa podem ser utilizados como substrato microbiano. Estes microrganismos superam consideravelmente o potencial de produção de óleo de espécies vegetais oleaginosas. Entretanto, seu uso, de forma comercial, requer ainda mais estudos para comprovar a sua real eficácia, comparada às plantas (ANGERBAUER et al., 2008).

O uso de microrganismos oleaginosos, para a geração de biodiesel, baseia-se na capacidade que estes possuem de converter a energia química da biomassa em energia útil, sendo considerado um processo limpo de produção de energia. Além disso, esse tipo de energia não provoca impactos ambientais negativos e, tampouco, envolve a produção de materiais perigosos. Também, sua produção pode ser realizada localmente, próxima da região de demanda, o que minimiza os custos relacionados ao sistema de distribuição (BUCKLEY & WALL, 2006).

A produção de suínos caracteriza-se por um sistema intensivo de confinamento, tendo como consequência a produção de elevada quantidade de dejetos. Esses contribuem para a degradação ambiental por meio da poluição e contaminação das águas superficiais e subterrâneas, poluição orgânica pelo nitrogênio, fonte de microrganismos patogênicos, poluição do ar e alta incidência de insetos (ANGERBAUER et al., 2008). Entretanto, os dejetos de suínos podem traduzir-se em excelente fonte de substrato para a multiplicação de microrganismos de interesse. Na região sudoeste Goiana, a suinocultura industrial gera alta quantidade de dejetos, o que tem impactado negativamente o ambiente. Uma forma de mitigar tal problema consiste na utilização das lagoas de estabilização de dejetos de suínos para a multiplicação de microalgas, bactérias e fungos oleaginosos e geração de biodiesel.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) isolar microalgas, bactérias e fungos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, utilizando diversos meios de cultura; 2) avaliar o potencial de produção de óleo destes isolados microbianos, visando à geração de biodiesel.

## Material e Métodos

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, entre agosto e novembro de 2009. Os isolados de microalgas, bactérias e fungos foram obtidos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, localizada no Setor de Suinocultura da instituição. Para isto, amostras de 10 mL de dejetos de suínos foram misturadas em 90 mL de solução salina (0,85%) e, em seguida, diluídas serialmente até  $10^{-3}$ . De cada diluição, foram transferidas alíquotas de 200  $\mu$ L para placas de Petri esterilizadas, acrescentando-se, em seguida, os meios, conforme Tabela 1, a 45°C. As diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram utilizadas para isolamento e contagem dos microrganismos. Especificamente, o número destes microrganismos foi determinado a partir de contagem direta em placas (triplicata), após cinco e nove dias de incubação (28°C), na ausência de luminosidade.

**Tabela 1.** Meios de cultura e valores de pH para isolamento de microalgas, bactérias e fungos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos.

Meio de cultura	Tratamentos	
	pH meio <sup>1</sup>	pH amostra <sup>2</sup>
GL	6,20	8,71
BDA	5,40	8,70
Ágar nutritivo	6,80	8,73
Contagem padrão	7,00	8,73

<sup>1</sup>valor ajustado seguindo a recomendação dos autores do meio de cultivo.

<sup>2</sup>valor ajustado para atingir a média dos valores detectada na lagoa de estabilização de dejetos de suínos.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial 4 x 3 x 2 (quatro meios de cultura, três diluições para plaqueamento e duas faixas de pH), em triplicata. Foram utilizadas duas faixas de pH, uma recomendada para cada meio de cultura e outra similar aos valores de pH detectados na lagoa de estabilização de dejetos de suínos.

A quantificação do potencial de produção de óleo foi feita unicamente para os isolados fúngicos. Isto porque não foi possível atingir a quantidade mínima de biomassa bacteriana e de microalgas, necessária para esta análise. Foram escolhidos 26 isolados fúngicos, aparentemente de espécies distintas, baseando-se em sua morfologia e o seu

teor de óleo foi determinado por metodologia específica (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Para isso, cerca de 10 g de biomassa seca fúngica de cada isolado, foram macerados, separados e transferidos para um aparelho de extração, tipo Soxhlet. Foram adicionados cerca de 250 mL de hexano (razão massa:volume de 1:25) e mantidos sob aquecimento constante a 40°C, durante 8h. O solvente foi destilado sob pressão reduzida em um evaporador rotativo e o teor percentual de óleo determinado em relação à biomassa. Os isolados obtidos foram estocados em laboratório (tubos de ensaio contendo o mesmo meio de isolamento) a temperatura ambiente. Os cinco isolados fúngicos com maior teor de óleo foram identificados por características morfológicas de estruturas vegetativas e reprodutivas observadas no microcultivo, com auxílio de microscópio. As características foram utilizadas em chaves de identificação (BARNET & HUNTER, 1972; CARMICHAEL, 1980; SUTTON, 1980; ALEXOPOULOS et al., 1996)

### **Resultados e Discussão**

Foi detectada a presença de bactérias em todos os meios testados, em ambas as faixas de pH (Tabela 2). Resultados similares foram obtidos por Uliana et al. (2009), que isolaram microrganismos autóctones (bactérias, bolores e leveduras) de dejetos de suínos em Santa Catarina, utilizando os meios MCP e BDA.

**Tabela 2.** Presença (+) e ausência (-) de fungos, bactérias e microalgas em lagoa de estabilização de dejetos de suínos em Rio Verde - GO, isolados com quatro meios de cultura, em duas faixas de pH.

Meio de cultivo	pH	Fungos	Bactérias	Microalgas
GL	Meio	+	+	+
	Amostra	+	+	+
BDA	Meio	+	+	+
	Amostra	+	+	+
MAN	Meio	-	+	-
	Amostra	-	+	-
MCP	Meio	-	+	-
	Amostra	+	+	-

Já fungos e microalgas foram isolados nos meios GL e BDA, em ambas as faixas de pH (Tabela 2). Similarmente, Serrano-García et al. (2008) obtiveram quatro gêneros fúngicos distintos (*Absidia* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp.) a partir de dejetos de suínos. Sylvester-Bradley et al. (1982) detectaram, no meio GL, maior densidade de microrganismos totais por grama de solo, em duas faixas de pH. Em pH neutro, detectaram cerca de 95.000 UFC e, em pH ácido, cerca de 450 UFC.

Neste trabalho, o pH não influenciou na capacidade de isolamento dos meios de cultura, fato que também foi constatado por Vermeulen et al. (2007) e Miller et al. (2009). Foram obtidos 40, 26 e 10 isolados de bactérias, fungos e microalgas, respectivamente. É possível que este maior número de isolados bacterianos seja em virtude da excreção de substâncias, produtos de seu metabolismo, que inibiram o crescimento de microalgas e de fungos em placas (antagonismo). Por outro lado, esta maior densidade pode ser simplesmente explicada pela predominância natural deste tipo de microrganismo, neste substrato, comparando-se às populações fúngicas e de microalgas.

Os isolados que apresentaram teor de óleo que os caracteriza como oleaginosos, isto é, acima de 25% de sua biomassa seca, foram os isolados 4, 7, 9, 22, 24, 25, 26, 29,

31, 32 e 33 (Tabela 3). Dentre os isolados, os cinco que apresentaram maior teor de lipídios em sua biomassa foram os isolados 25 e 26 do gênero *Mucor* spp.; 31 e 33 do gênero *Rhizopus* spp.; e o isolado 29 do gênero *Aspergillus* spp. Os isolados 25, 26, 31 e 33 pertencem ao filo Zygomycota pelas características das hifas (cenocítica) e da diferenciação de esporos assexuados endógenos (esporangiósoros). Também possuem hifas cenocíticas hialinas e esporângioforo com esporângio bem desenvolvido, com alguns evidenciando os esporangiósoros e columela. Certik e Shimizu (1999), Wynn et al. (2001), Ratledge (2004) e Vicente et al. (2009) também relatam *Mucor* spp. como uma espécie com potencial para produção de biomassa e teor de lipídios acima de 25%. Certik e Shimizu (1999) verificaram teor de lipídios equivalente a 20% em *Rhizopus* spp. Similarmente, Chattopadhyay et al. (1985a, 1985b, 1987) constataram em *Aspergillus* spp. níveis de lipídios em torno de 20%. Similarmente, de acordo com Kosa e Ragauskas (2011), este gênero apresentou teor lipídico de 18,15% e taxa de crescimento em torno de seis dias de cultivo. Também, Hui et al. (2010) detectaram teor de óleo (18,16%), após seis dias de cultivo deste gênero. Em estudos de Kosa e Ragauskas (2011), *Mucor* spp. apresentou teor lipídico de 27,57% e taxa de crescimento de dois dias de cultivo, o que se torna interessante para a produção de biomassa. Já Meng et al. (2009) detectaram níveis mais altos de óleo em *Aspergillus* spp. (57%).

**Tabela 3.** Massa e teor de óleo de isolados fúngicos, obtidos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos em Rio Verde – GO, para a geração de óleo e produção de biodiesel

Isolado	Biomassa fúngica (g)	Massa de óleo (g)	Teor de óleo (%)
1	2,49	0,06	2,4
2	2,84	0,19	6,7
3	2,11	0,26	12,33
4	0,45	0,21	47,13
5	0,68	0,13	19,04
6	1,36	0,15	11,06
7	1,18	0,3	25,41
8	0,78	0,02	2,57
9	0,67	0,23	34,48
10	9,10	0,02	0,22
11	1,34	0,24	17,85
19	1,99	0,4	20,09
20	1,76	0,1	5,69
21	2,03	0,163	8,02
22	1,80	0,55	30,51
23	1,11	0,15	13,54
24	1,42	0,46	32,3
25	1,08	0,48	44,41
26	0,89	0,65	73,04
27	17,94	0,04	0,22
28	13,14	0,22	1,67
29	0,48	0,3	62,54
31	1,21	0,56	46,14
32	1,56	0,62	39,79
33	1,02	0,44	42,76
34	1,58	0,33	20,93

A produção de biodiesel a partir de fungos apresenta vantagens em relação ao produzido por microalgas, já que, para estas últimas, é necessária a presença de luz solar (BETZ, 2009). Além disso, uma das técnicas para o cultivo de microalgas, visando à geração de óleo para biodiesel, consiste em encerrá-las em tubos, sendo necessário o fornecimento de energia para agitar o meio de cultivo e assegurar sua exposição à luz solar. Se produzir biodiesel a partir de microalgas encerradas em biorreatores tubulares, sob o ponto de vista ambiental, não é interessante, o cultivo de microalgas em lagos abertos também não é a solução. Apesar da produção de gases de efeito de estufa ser menor, a água dos lagos tende a evaporar, o que implica em alto consumo de água e a

quantidade de biodiesel produzida é baixa. Comparativamente, a quantidade de gases de efeito de estufa gerados na produção deste tipo de biodiesel, é cerca de quatro vezes superior à quantidade de gases produzidos pela produção de diesel (STEPHENSON et al., 2010). Futuros estudos são necessários para avaliar a qualidade do óleo produzido por estes isolados fúngicos.

### **Conclusões**

- 1 – Em todos os meios de cultura foi possível o isolamento de bactérias.
- 2 – Fungos e microalgas foram detectados, predominantemente, pelos meios GL e BDA, em ambas as faixas de pH testadas.
- 3 – Os isolados fúngicos 4, 7, 9, 22, 24, 25, 26, 29, 31, 32 e 33 apresentaram teor de lipídeos acima de 25% de sua biomassa seca, o que os caracteriza como microrganismos oleaginosos.
- 4 – Os isolados 25, 26, 29, 31 e 33 apresentaram maior potencial para a geração de óleo e produção de biodiesel.

### **Referências bibliográficas**

ALEXOPOULOS, C.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. 4. ed. New York: John Willey & Sons, 878 p. 1996.

ANGERBAUER, C. et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3051–3056, 2008.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Champaign: AOCS, 1999, 1200p.

BARNET HL; HUNTER BB. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3<sup>a</sup> Ed. Minneapolis (Minnesota): Burgess Publishing Company. 1972.

BETZ, J. A. **Biodiesel de algas: Passado, presente e futuro nos Estados Unidos da América e na Florida**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Petróleo) UFRJ, Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BIOCOMBUSTÍVEIS. Disponível em: <<http://www.polobio.esalq.usp.br/biocombustiveis.html>>. Acesso em 22 de maio de 2007.

BUCKLEY, M.; WALL, J. **Microbial energy conversion**. American Academy of Microbiology: Washington, 2006, 22p.

CERTIK, M; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated Fatty Acid Production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 1, p. 1-14, 1999.

CARMICHAEL, J.W. et al. **Genera of hyphomycetes**. 1ª Ed. Alberta (Canadá): The university of Alberta Press Edmonton. 1980.

CHATTOPADHYAY, P. et al. An unsaturated fatty acid mutant of *Aspergillus niger* with partially defective  $\Delta$  9-desaturase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 346–351, 1985a.

CHATTOPADHYAY, P. et al. Lipid profiles of *Aspergillus niger* and its unsaturated fatty acid auxotroph, UFA2. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 352-355, 1985b.

CHATTOPADHYAY, P. et al. Lipid profiles of conidia of *Aspergillus niger* and a fatty acid auxotroph. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 1116-1120, 1987.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. International Energy Outlook 2008. Disponível em: [www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/highlights.html](http://www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/highlights.html). Acesso em: 23 ago. 2008.

FAO. Chapter 6 – Oil production. Disponível em: [www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0h.htm](http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0h.htm). Acesso em: 25 ago. 2008.

GRISOLI, R.; COELHO S. T.; MATAI P. H. L. S. Energia microbológica. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 4, n. 2, p. 1-19, 2009.

HUI, L. et al. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7556–7562, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 5. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

KOSA, M.; RAGAUSKAS, A. J. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 53-61, 2011.

LOFRANO, R. C. Z. Uma revisão sobre biodiesel. Pensamento Plural: **Revista Científica do INIFAE**, v. 2, n. 2, p. 83-89, 2008.

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1–5, 2009.

MILLER, F. A. et al. Influence of pH, type of acid and recovery media on the thermal inactivation of *Listeria innocua*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1-2, p. 121–128, 2009.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2005.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids, **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 5, p. 429–438, 1991.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production, **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807–815, 2004.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms, **Biochemical Society Transactions**, v. 30, 1047–1050, 2002.

SERRANO-GARCÍA, E. et al. Fungal survival in ensiled swine faeces. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3850–3854, 2008.

STEPHENSON, A. L. et al. Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: A comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. **Energy Fuels**, v. 24, n. 7, p. 4062–4077, 2010.

SZCZESNA-ANTCZAK, M. et al. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor strains*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1214–1222, 2006.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microorganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, n. 1, p. 15-22. 1982.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. 1<sup>a</sup> Surrey: Commonwealth Mycological Institute Kew. 1980.

TEIXEIRA, P. C. N.; TEIXEIRA, C. M. L. L. Potencial de geração de biocombustíveis a partir de microalgas. CONAE – Conferência Internacional de Agroenergia – 11 a 13 de dezembro, Londrina, Paraná. 2006.

ULIANA, S. et al. Isolamento e caracterização morfológica de microrganismos de sistemas de tratamento de dejetos suínos. In: **I Simpósio Internacional sobre**

**Gerenciamento de Resíduos de Animais Tratamento de Dejetos de Animais – 11 a 13 de março, Florianópolis, Santa Catarina, 2009.**

WYNN, J. P.; HAMID, A. A.; LI, Y.; RATLEDG, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpine*. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 2857–2864, 2001.

VERMEULEN, A. et al. Influence of pH, water activity and acetic acid concentration on *Listeria monocytogenes* at 7 degrees C: data collection for the development of a growth/no growth model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 332–341, 2007.

VICENTE G. et al. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 22-27, 2009.

ZHANG, Y.; RATLEDGE, C. Multiple isoforms of malic enzyme in the oleaginous fungus, *Mortierella alpine*. **Mycological Research**, v. 112, n. 6, p. 725–730, 2008.

## CAPÍTULO 2

### **CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE BIOMASSA FÚNGICA PARA A GERAÇÃO DE BIODIESEL**

## **Caracterização de óleo de biomassa fúngica para a geração de biodiesel**

Characterization of fungal biomass oil for biodiesel generation

**Resumo** - A produção de biocombustíveis, em especial o biodiesel se tornou uma das formas mais eficientes para diversificar a matriz energética, contribuindo tanto para a conservação do meio ambiente, por meio da redução da emissão de gases do efeito estufa, como para o desenvolvimento econômico. O uso de isolados fúngicos para extração de óleo e geração de biodiesel tem despertado crescente interesse da comunidade científica mundial. O teor de óleo da biomassa de cinco isolados fúngicos, obtidos a partir de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, foi determinado por extração em Soxhlet. Foi realizada uma cromatografia de camada delgada para separação dos diferentes constituintes do óleo extraído. Comparando-se esses cinco isolados, não houve diferença quanto ao seu rendimento de óleo. No óleo extraído a partir da biomassa fúngica, destes cinco isolados, não foram observados triglicerídeos e ácidos graxos, porém foram detectados ésteres, o que confirma a reação de transesterificação do óleo microbiano. A maioria das amostras apresentou transesterificação incompleta, com a presença de mono e diacilglicerídios. Entretanto, a amostra do isolado 25 apresentou uma característica mais próxima da produção de biodiesel, com a transesterificação completa.

**Palavras -chave:** fungos oleaginosos, CCD, transesterificação.

**Abstract** - The production of biofuels, especially biodiesel, is one of the most effective alternatives to change the energy sources. Consequently, it increases the environment conservation and the economic development. The use of microalgae, bacteria and fungi for oil production to biodiesel generation has attracted crescent interest from the worldwide scientific community. The oil content, of five fungi isolates obtained from the storage of pig slurry, was determined by Soxhlet extraction. A thin layer chromatography for separation of different oil constituents was performed. Comparing these five fungi isolates, there was no difference in oil yield produced by them. In these oil samples triglycerides and fatty acids were not verified. On the other hand, esters were detected which confirmed the transesterification of fungi oil. The major of oil samples showed incomplete transesterification, with the presence of mono-and diacilglycerides. However, for the oil from the isolate 25 there was a complete transesterification showing the best characteristics for biodiesel production.

**Key words:** Oleaginous fungi. CCD. Transesterification.

### **Introdução**

A produção de biocombustíveis, em especial o biodiesel se tornou uma das formas mais eficientes para diversificar a matriz energética, contribuindo tanto para a conservação do meio ambiente, por meio da redução da emissão de gases do efeito estufa, como para o desenvolvimento econômico. A produção de biocombustíveis tem favorecido o aprimoramento e a descentralização de investimentos, por meio da geração de emprego e renda no campo. Entretanto, é necessário estabelecer mecanismos de suporte à produção e comercialização desses biocombustíveis. Isso é possível pela otimização de recursos e a interação das instituições públicas, privadas e dos pequenos produtores rurais. Desta forma, tornam-se essenciais para a geração de informações confiáveis, estudos que demonstrem a viabilidade jurídica, técnica, ambiental, social e comercial dos biocombustíveis (LOFRANO, 2008).

Os biocombustíveis são fontes de energias renováveis, derivadas de produtos agrícolas como açúcar, plantas oleaginosas, biomassa florestal e outras fontes de matéria orgânica. Em alguns casos, estes podem ser usados de forma isolada, como adicionados aos combustíveis convencionais. Como exemplos, há o biodiesel, o etanol, o metanol, o gás metano e o carvão vegetal (BIOCOMBUSTÍVEIS, 2007).

O biodiesel é um éster de ácido graxo, renovável e biodegradável, obtido comumente a partir da reação química de óleos ou gorduras, de origem animal ou vegetal, com um álcool, na presença de um catalisador (reação conhecida como transesterificação). Nessa reação é utilizado um catalisador alcalino que converte óleos vegetais ou gorduras animais e metanol em ésteres metílicos de ácidos graxos. Como catalisadores alcalinos, são utilizados, principalmente, o hidróxido de sódio e potássio, em razão de seu baixo custo (KRAWCZYK, 1996).

O biodiesel constitui um combustível compatível com os atuais motores diesel, utilizados comercialmente, e apresenta diversas vantagens em relação ao combustível fóssil, que inclui biodegradação avançada, toxicidade reduzida e uma menor emissão ativa de CO<sub>2</sub> (MINISTÉRIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2005). Diversas matérias-primas podem ser utilizadas na produção de biodiesel e agrupadas em óleos vegetais, gordura animal e óleos e gorduras residuais.

As principais espécies microbianas oleaginosas são as microalgas, bactérias e fungos (GRISOLI et al., 2009). O uso de microrganismos como fonte de lipídios tem sido investigado extensivamente para a sua aplicação como aditivos alimentares,

farmacêuticos e ingredientes de alimentos para a aquicultura (RATLEDGE, 1991; RATLEDGE, 2004, SZCZESNA-ANTCZAK, 2006). Os microrganismos são fontes de óleos comestíveis, já que apresentam a capacidade de produzir óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados, que são muito visados como suplementos dietéticos e para a nutrição infantil (RATLEDGE, 2002). Recentemente, tem sido investigado o uso de microrganismos oleaginosos para a produção de biodiesel, particularmente de microalgas que capturam o dióxido de carbono para transformação em lipídios, utilizando a luz solar. No entanto, esses microrganismos fotossintéticos têm problemas relacionados ao seu crescimento em sistemas de reator, pela necessidade de fornecimento de luz e de grandes áreas para garantir sua multiplicação. Por outro lado, há poucas informações sobre o uso de lipídios a partir de fungos para a produção de biodiesel.

O uso de isolados fúngicos para a extração de óleo e geração de biodiesel tem despertado crescente interesse da comunidade científica mundial. Estes microrganismos podem acumular elevado teor de lipídios e não necessitam de terras aráveis. Além disso, a produção desses microrganismos não compete com a produção de alimentos e estes superam consideravelmente o potencial de produção de óleo de espécies vegetais oleaginosas. Além disso, o processo de extração de óleo é relativamente simples e estes organismos podem ser cultivados em ambientes inóspitos para a maioria das espécies vegetais, como áreas degradadas, desérticas, áreas de mineração, dentre outras. Entretanto, seu uso, de forma comercial, requer ainda mais estudos para comprovar a sua real eficácia, comparada às plantas (ANGERBAUER et al., 2008)

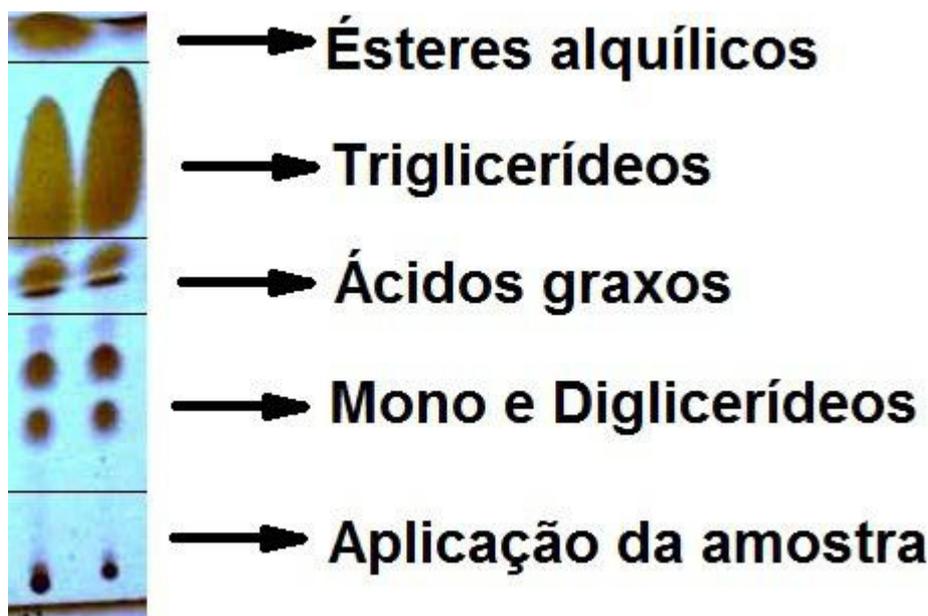
No sudoeste Goiano, em escala industrial, há a produção de suínos. Consequentemente, alto é o impacto ambiental ocasionado pelos dejetos produzidos pelas granjas suinícolas. O tratamento e a destinação correta de tais dejetos é um problema atual que desafia os especialistas das áreas agrônômica, zootécnica e ambiental. Entretanto, tais dejetos podem constituir-se num excelente substrato para a multiplicação de espécies fúngicas oleaginosas, utilizadas para a geração de biodiesel. Todavia, ainda são escassos os estudos que, efetivamente, validam tal hipótese.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial de produção e a qualidade do óleo extraído da biomassa fúngica de isolados obtidos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, na região sudoeste Goiana, visando à geração de biodiesel.

## Material e Métodos

As etapas do isolamento de fungos e quantificação do teor de óleo em sua biomassa foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia Agrícola e de Química Tecnológica, respectivamente, do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, entre agosto e novembro de 2009. O teor de óleo da biomassa fúngica dos isolados, obtidos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos da instituição, foi determinado pela metodologia oficial (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), com quatro repetições. Especificamente, cerca de 10 g de biomassa fúngica, secados em estufa com circulação forçada de ar, a 40°C, até massa constante, separados e transferidos para um aparelho de extração tipo Soxhlet. Foram adicionados cerca de 250 mL de hexano (razão massa:volume de 1:25) e mantidos sob aquecimento constante de 40°C, durante 8h. O solvente foi destilado sob pressão reduzida em um evaporador rotativo e o teor percentual de óleo determinado em relação à biomassa.

A fase móvel da Cromatografia de Camada Delgada (CCD) dos óleos dos isolados fúngicos foi constituída por solventes diversos. Esta técnica é utilizada na separação dos diferentes constituintes de uma amostra, empregando um solvente ou uma mistura de solventes adequados. Para a execução das análises, utilizou-se uma mistura de solventes eficientes na caracterização de óleos e seus ésteres (RODRIGUES, 2007). Essa mistura consiste em hexano:acetato de etila:ácido acético na proporção volumétrica 100:5,5:2,8. Foi utilizada uma placa de sílica comercial Alugram® SIL G 20 x 20 cm x 0,20 mm (marca Macherey-Nagel), da qual se retiraram placas menores de aproximadamente 10 x 4 cm x 0,20 mm. Essas placas foram impregnadas utilizando um capilar de vidro, para conseguir mínimas adições de amostras a cerca de 1 cm da base 22 da placa em linha horizontal, com espaçamento aproximado de 0,75 cm. Após a aplicação das amostras, a placa foi transferida para uma cuba de base quadrada de lado 4 cm, contendo cerca de 3 mL da mistura do solvente de arraste, onde ocorreu a percolação do solvente pela placa até a distância aproximada de 1 cm da borda superior. Percolado o solvente, a placa foi retirada da cuba para que ocorresse a secagem da placa e posterior verificação dos resultados, na placa de sílica, utilizando uma cuba contendo cristais de iodo, sendo revelados os diferentes constituintes em razão da presença de sinais cromatográficos de coloração escura nas placas, conforme a Figura 6. Os cinco isolados fúngicos com maior teor de óleo foram identificados, em nível de gênero, pelo método de microcultivo.



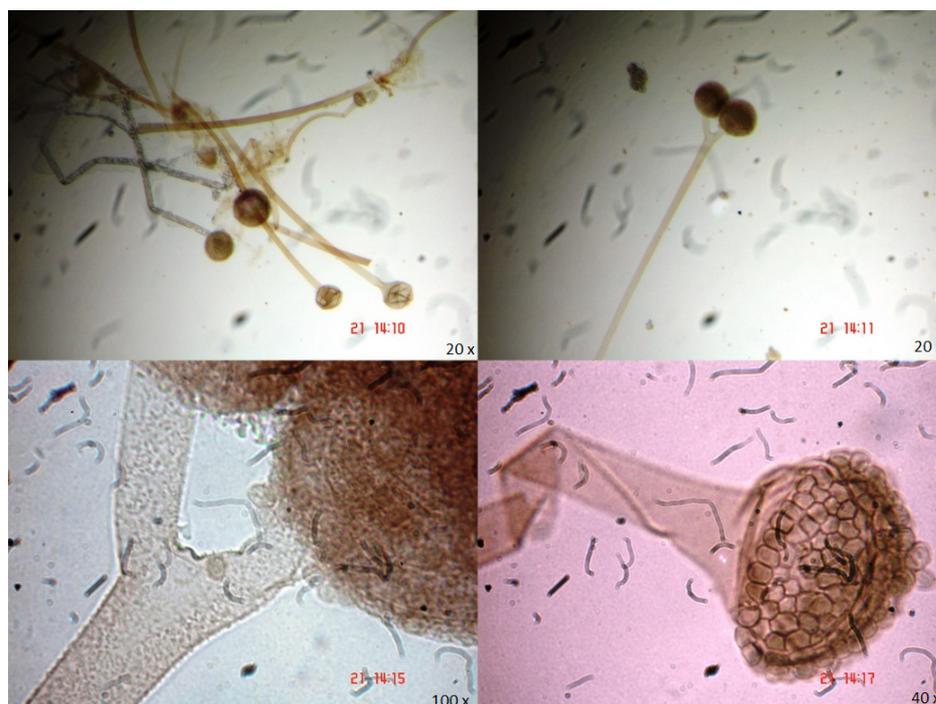
**Figura 1:** Regiões da CCD de amostras de diferentes óleos de isolados fúngicos, obtidos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, em Rio Verde - GO.

### Resultados e Discussão

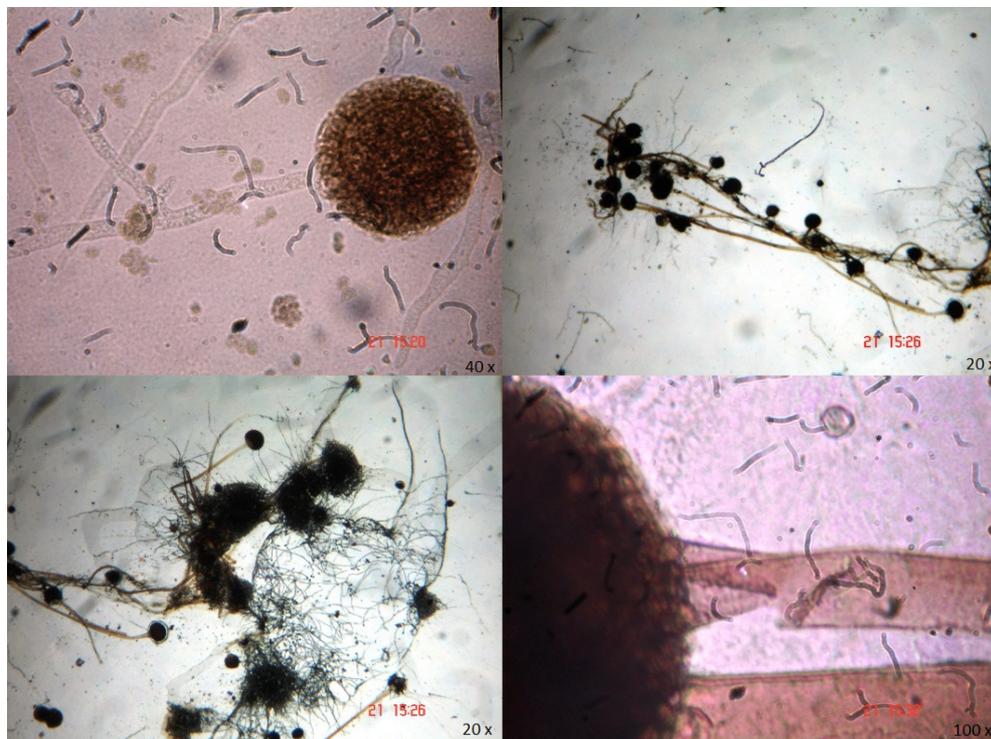
Dentre os 34 isolados fúngicos obtidos, os cinco que apresentaram maior teor de lipídios em sua biomassa foram os isolados 25 e 26, pertencentes ao gênero *Mucor* spp. (Figura 1 e 2); o isolado 29, do gênero *Aspergillus* spp. (Figura 3) e os isolados 31 e 33, do gênero *Rhizopus* spp. (Figura 4 e 5) (Tabela 1).

Os teores de óleo dos isolados fúngicos foram estatisticamente similares (Tukey, 5%). Certik e Shimizu (1999), Wynn et al. (2001), Ratledge (2004) e Vicente et al. (2009) também relatam *Mucor* spp. como uma espécie com potencial para produção de biomassa e teor de lipídios acima de 25%. Certik e Shimizu (1999) observaram teor de lipídios equivalente a 20%, em *Rhizopus* spp. Similarmente, Chattopadhyay et al. (1985a, 1985b, 1987) constataram, em *Aspergillus* spp., níveis de lipídios em torno de 20%. Similarmente, de acordo com Kosa e Ragauskas (2011), este gênero apresentou teor lipídico de 18,15% e taxa de crescimento em torno de seis dias de cultivo. Também, Hui et al. (2010) detectaram teor de óleo (18,16%), após seis dias de cultivo deste gênero. Em estudos de Kosa e Ragauskas (2011), *Mucor* spp. apresentou teor lipídico de 27,57% e alta taxa de crescimento de dois dias de cultivo, o que o torna

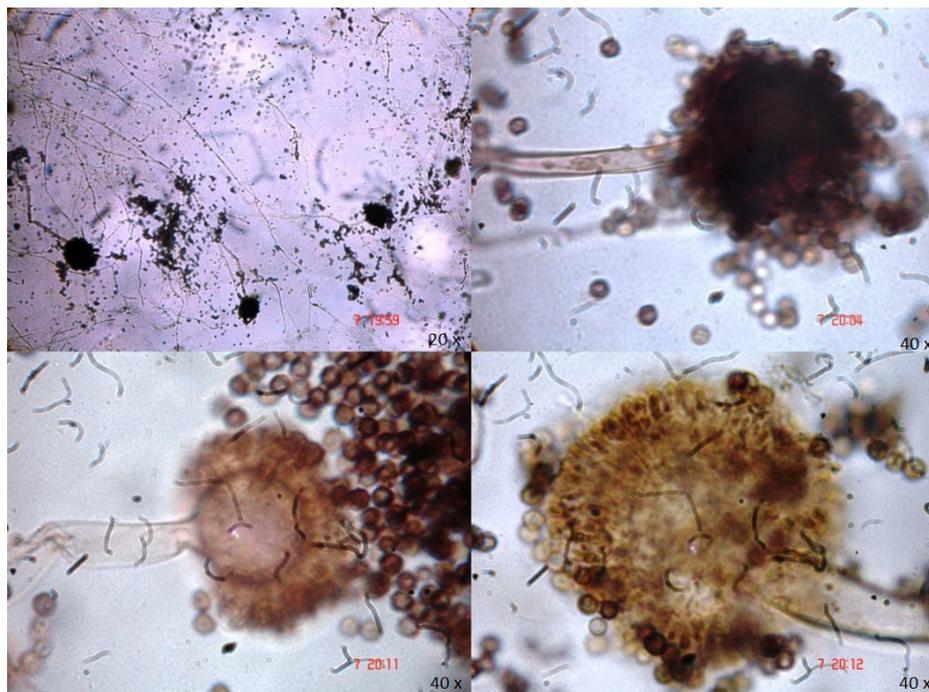
estratégico para a produção de biomassa. Já Meng et al. (2009) detectaram níveis mais altos de óleo em *Aspergillus* spp. (57%).



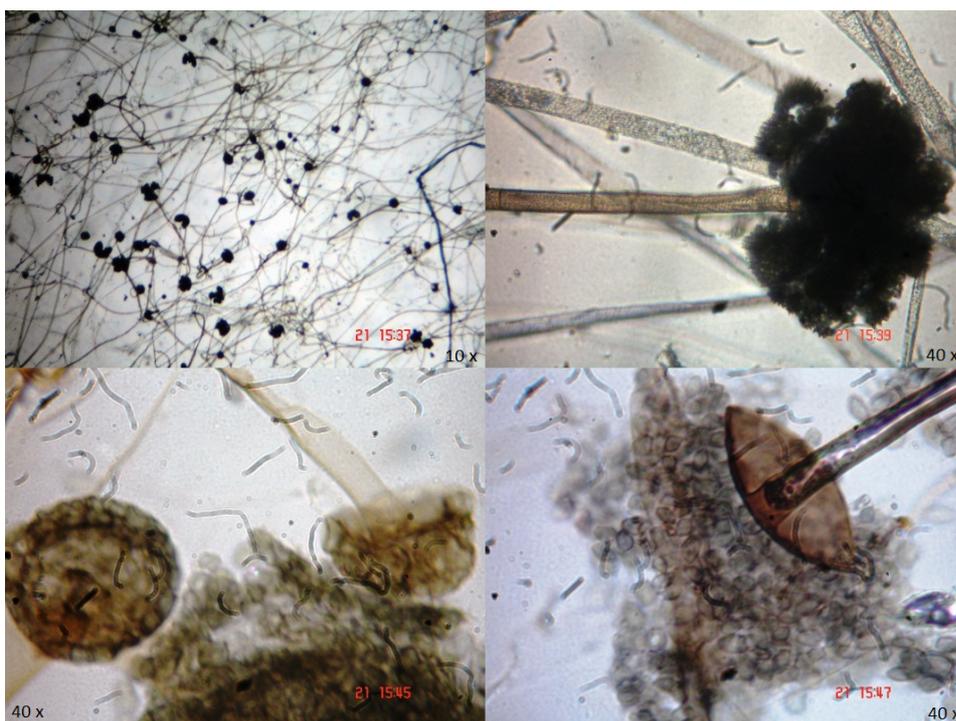
**Figura 2.** Isolado fúngico 25 (*Mucor* spp.), obtido de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, em Rio Verde – GO.



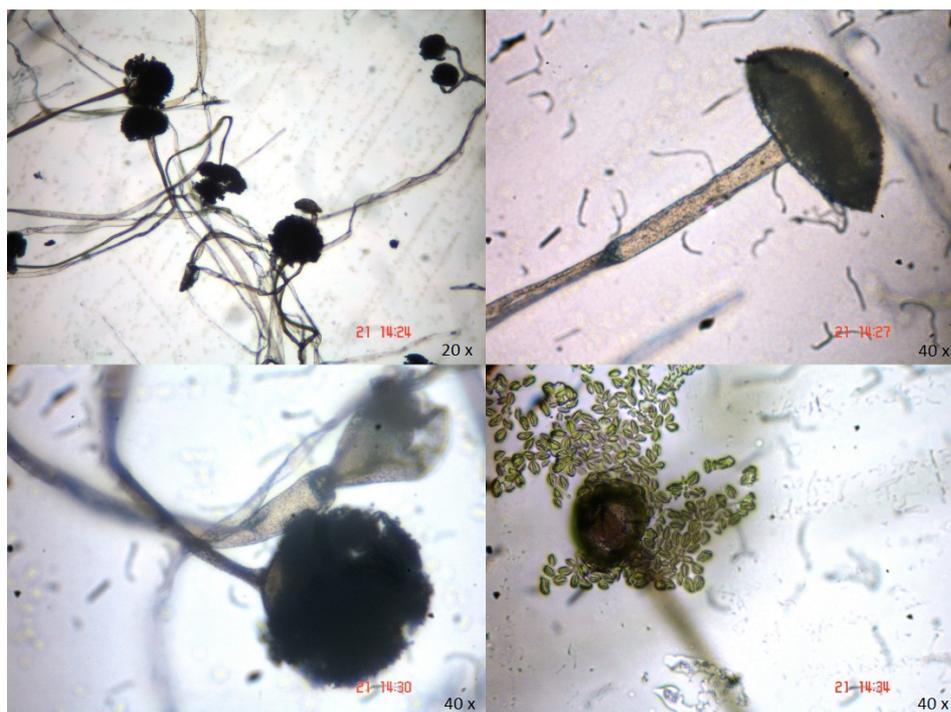
**Figura 3.** Isolado fúngico 26 (*Mucor* spp.), obtido de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, em Rio Verde – GO.



**Figura 4.** Isolado fúngico 29 (*Aspergillus* spp.), obtido de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, em Rio Verde – GO.



**Figura 5.** Isolado fúngico 31 (*Rhizopus* spp.), obtido de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, em Rio Verde – GO.



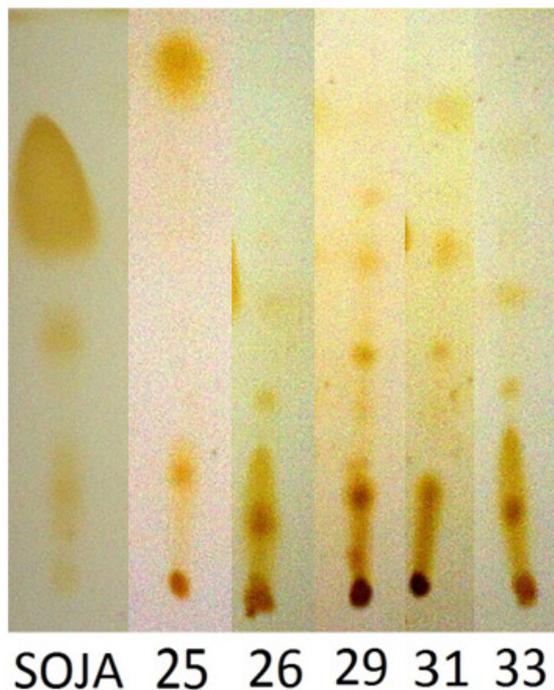
**Figura 6.** Isolado fúngico 33 (*Rhizopus* spp.), obtido de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, em Rio Verde – GO.

**Tabela 1.** Teor de óleo de isolados fúngicos, obtidos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos em Rio Verde – GO, para a geração de óleo e produção de biodiesel

Isolado	Gênero	Teor de lipídios (%)
25	<i>Mucor</i> spp.	17,82 a
26	<i>Mucor</i> spp.	17,79 a
29	<i>Aspergillus</i> spp.	10,43 a
31	<i>Rhizopus</i> spp.	15,50 a
33	<i>Rhizopus</i> spp.	23,51 a

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si (Tukey, 5%)

Através da CCD do biodiesel produzido de óleo microbiano (Figura 7), comparado à CCD do óleo de soja, pode-se observar que, para este último, detectou-se um grande sinal cromatográfico, referente aos triglicerídeos e sinais menores, pela presença de mono e diglicerídeos (Figura 6).

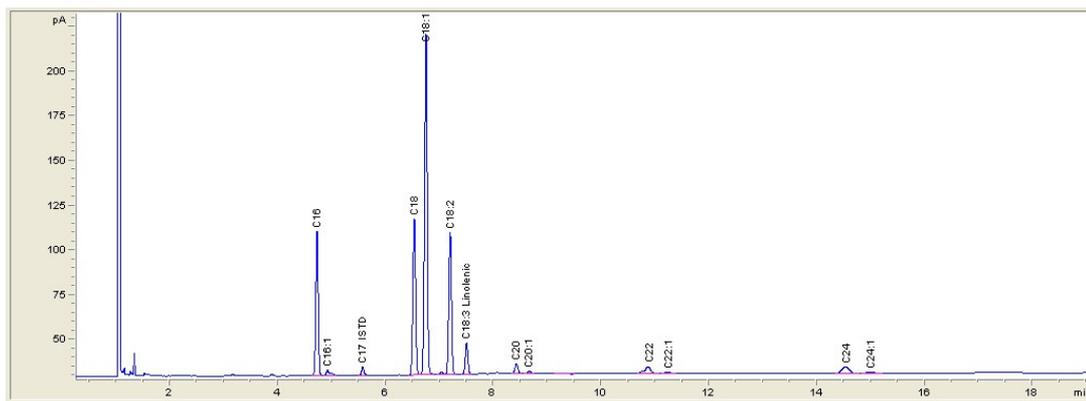


**Figura 7:** CCD de amostras de diferentes óleos de isolados fúngicos, obtidos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, em Rio Verde-GO.

A catálise alcalina, se realizada na presença de ácidos graxos (AG), proporciona uma perda no rendimento proporcional, por meio da saponificação. Contudo, é responsável por uma excelente conversão em ésteres, em um curto período de tempo, se comparada à catálise ácida. Já por via ácida, a esterificação favorece a conversão em ésteres, porém, promove uma lenta conversão dos triglicerídeos (RODRIGUES, 2007; PORTELA, 2011). Durante a produção do biodiesel, por todas as rotas catalíticas, os AG se convertem em algum produto, sendo, na catálise ácida e dupla, em ésteres metílicos e, na alcalina, em produtos de saponificação.

Pela CCD, as amostras apresentaram transesterificações incompletas, com a presença de mono e diacilglicerídios, o que é esperado em processos de saponificação. Contudo, a amostra de óleo do isolado fúngico 25 apresentou uma característica mais próxima da produção de biodiesel, com a transesterificação completa, não sendo observado o sinal referente aos produtos saponificados (AG). No óleo extraído a partir da biomassa fúngica, destes cinco isolados, não foram observados triglicerídeos e ácidos graxos, porém, foram detectados ésteres, o que confirma a reação de transesterificação do óleo microbiano.

A Figura 8 apresenta o cromatograma do biodiesel produzido a partir do óleo extraído do isolado 25 (*Mucor* spp.)



**Figura 8:** Cromatograma do biodiesel produzido a partir do isolado 25 (*Mucor* spp.), obtido de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, em Rio Verde-GO

A Tabela 2 mostra o perfil de ácidos graxos extraídos do isolado 25. Resultados similares foram encontrados por Vicente (2009), com a espécie *Mucor circinelloides*. Óleos microbianos diferem geralmente da maioria dos óleos vegetais por serem mais ricos em ácidos graxos poli-insaturados (CHISTI, 2007). O alto grau de instauração destes ácidos graxos demonstra uma menor estabilidade oxidativa, que é característica de um excelente combustível sob baixas temperaturas, o que é vantajoso em locais frios (VICENTE, 2004).

**Tabela 2.** Análise de composição em ácidos graxos do isolado 25 (*Mucor* spp.), obtido de lagoa de estabilização de dejetos de suínos, em Rio Verde-GO

Ácido graxo		Concentração (%)
Ácido Láurico	12:00	n.c.*
Ácido Mirístico	14:00	n.c.
Ácido Miristoleico	14:01	n.c.
Ácido Pentadecanóico	15:00	n.c.
Ácido Palmítico	16:00	14,8
Ácido Palmitoleico	16:01	0,9
Ácido Esteárico	18:00	18,5
Ácido Oleico	18:01	39,5
Ácido Linoleico	18:02	16,6
Ácido Linolénico	18:03	3,6
Ácido Arachidico	20:00	1,3
Ácido Gadoleico	20:01	0,3
Ácido Behenico	22:00	1,8
Ácido Erucico	22:01	0,3
Ácido Lignocérico	24:00	n.c.
Ácido Nervônico	24:01	2,3
	Total	99,9

\*não consta

### Conclusões

1. Não houve diferença no rendimento de óleo produzido por isolados fúngicos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos.
2. Foi notada ausência de triglicerídeos e ácidos graxos e a presença de ésteres, confirmando a reação de transesterificação dos óleos de isolados fúngicos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos.
3. As amostras de óleo fúngico apresentaram transesterificações incompletas, com a presença de mono e diacilglicerídios;
4. A amostra de óleo do isolado 25 apresentou uma característica mais próxima da produção de biodiesel, com a transesterificação completa.

## Referências Bibliográficas

BETZ, J. A. **Biodiesel de algas: Passado, presente e futuro nos Estados Unidos da América e na Florida**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Petróleo) UFRJ, Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BIOCOMBUSTÍVEIS. Disponível em: <<http://www.polobio.esalq.usp.br/biocombustiveis.html>>. Acesso em 22 de maio de 2007.

CERTIK, M; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated Fatty Acid Production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 1, p. 1-14, 1999.

CHATTOPADHYAY, P. et al. An unsaturated fatty acid mutant of *Aspergillus niger* with partially defective  $\Delta$  9-desaturase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 346–351, 1985a.

CHATTOPADHYAY, P. et al. Lipid profiles of *Aspergillus niger* and its unsaturated fatty acid auxotroph, UFA2. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 352-355, 1985b.

CHATTOPADHYAY, P. et al. Lipid profiles of conidia of *Aspergillus niger* and a fatty acid auxotroph. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 1116-1120, 1987.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

GRISOLI, R.; COELHO S. T.; MATAI P. H. L. S. Energia microbiológica. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 4, n. 2, p. 1-19, 2009.

HUI, L. et al. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7556–7562, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 5. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

KOSA, M.; RAGAUSKAS, A. J. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 53-61, 2011.

KRAWCZYK, T. Biodiesel - Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. **INFORM 7**, 801±829. 1996.

LOFRANO, R. C. Z. Uma revisão sobre biodiesel. **Pensamento Plural: Revista Científica do INIFAE**, v. 2, n. 2, p. 83-89, 2008.

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1–5, 2009.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT. Disponível em: <https://www.biodiesel.gov.br>. Acesso em 14 setembro 2005.

PORTELA, F. M. **Efeito da catálise ácida e alcalina na produção e propriedades físico-químicas do biodiesel metílico de pinhão-mansão**. Dissertação de Mestrado. Uberlândia, MG. Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, 2011.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids, **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 5, p. 429–438, 1991.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms, **Biochemical Society Transactions**, v. 30, 1047–1050, 2002.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production, **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807–815, 2004.

RODRIGUES, H. S. **Obtenção de Ésteres Etílicos e Metílicos, por reações de transesterificação, a partir do óleo da palmeira Latino Americana Macaúba – *Acrocomia aculeata***, Dissertação de Doutorado, Ribeirão Preto – SP, 2007.

STEPHENSON, A. L. et al. Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: A comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. **Energy Fuels**, v. 24, n. 7, p. 4062–4077, 2010.

SZCZESNA-ANTCZAK, M. et al. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor strains*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 6, p. 1214–1222, 2006.

WYNN, J. P.; HAMID, A. A.; LI, Y.; RATLEDG, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpine*. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 2857–2864, 2001.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, v. 92, n. p. 297–305, 2004.

VICENTE G. et al. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 22-27, 2009.

## CONCLUSÕES GERAIS

- 1 – Nos quatro meios de cultura testados foi possível o isolamento de bactérias.
- 2 – Fungos e microalgas foram detectados, predominantemente, nos meios GL e BDA, em ambas as faixas de pH testadas.
- 3 – Os isolados fúngicos 4, 7, 9, 22, 24, 25, 26, 29, 31, 32 e 33 apresentaram teor de lipídeos acima de 25% de sua biomassa seca, o que os caracteriza como microrganismos oleaginosos.
- 4 – Os isolados 25, 26, 29, 31 e 33 apresentaram maior potencial para a geração de óleo para a produção de biodiesel.
- 5- Não houve diferença no rendimento de óleo produzido por isolados fúngicos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos.
- 6- Foi observada a ausência de triglicerídeos e ácidos graxos e a presença de ésteres, confirmando a reação de transesterificação dos óleos de isolados fúngicos de lagoa de estabilização de dejetos de suínos.
- 7- As amostras apresentaram transesterificações incompletas, com a presença de mono e diacilglicerídios.
- 8 - A amostra de óleo do isolado 25 apresentou uma característica mais próxima da produção de biodiesel, com a transesterificação completa.