Cultivo de *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. com aproveitamento de rejeitos agrícola e extração de Lipídios para futura produção de biodiesel.

FERREIRA, R. F. P.[1]; MACHADO,J.K.F.B[2]; DENARDI,C.P.P.[3]
1 Graduando em Tecnologia em Biocombustíveis, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus Matão, ferreira.renata@aluno.ifsp.edu.br
Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.08.03.00-1 Metabolismo e Bioenergética.
[2] Docente, IFSP, Câmpus Matão, jkarla@ifsp.edu.br.
[3] Docente orientadora, IFSP, Câmpus Matão, carolinepigatto@ifsp.edu.br

Apresentado no 9° Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP ou no 3º Congresso de Pós-Graduação do IFSP. 11 a 13 de dezembro de 2018 - Boituva-SP, Brasil

RESUMO: Este trabalho objetivou o cultivo dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. inoculados em meio contendo vinhaça. Após o cultivo os fungos foram submetidos a extração lipídica utilizando Soxhlet com diferentes tipos de solventes, temperatura e tempo pré-determinados no experimento. Até o presente momento foi realizado o isolamento do fungo *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* que fará parte do experimento a partir de agora. Ainda não foi possível isolar o *Penicillium* sp, ficando, assim, para a segunda fase do experimento. Tanto o *Aspergillus niger* quanto o *flavus* foram submetidos ao cultivo na presença de vinhaça. O *A. niger* obteve um bom crescimento na presença de vinhaça, ao passo que o *A. flavus* é melhor cultivado em meio tradicional. O fungo *Aspergillus niger* vem se mostrando promissor na extração de lipídio, quando o solvente usado é o acetato de etila, onde rendeu 18,8% de lipídios até o momento.
Palavras-chave: fungo, extração de lipídios, obtenção de biocombustível.

Aspergillus niger and *Penicillium* sp. culture with use of vinasse and extraction of lipids for future biodiesel production.

ABSTRACT: This work aimed at the cultivation of fungi *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. inoculated in medium containing vinasse. After the cultivation the fungi were submitted to lipid extraction using Soxhlet with different types of solvents, temperature and time predetermined in the experiment. So far the isolation of the fungus Aspergillus niger and Aspergillus flavus has been carried out, which will be part of the experiment from now on. It was not possible to isolate Penicillium sp, thus, to the second phase of the experiment. Both *Aspergillus niger* and *flavus* were cultured in the presence of vinasse. A. niger showed good growth in the presence of vinasse, whereas *A. flavus* is best grown in traditional medium. The *Aspergillus niger* fungus has been shown to be promising in lipid extraction, when the solvent used is ethyl acetate, where 1,0654 g dry matter yielded 18.8% lipids so far.
Key words: fungus, lipid extraction, biofuel production.

INTRODUÇÃO

Na ultraestrutura de reserva dos fungos, há o armazenamento de energia e de translocação de nutrientes derivados de açúcares comuns como glicose, onde podemos encontrar os lipídios (EPOSITO, 2010). Estes lipídios são utilizados como matéria-prima para produção de biodiesel, considerado uma alternativa para a demanda energética da sociedade moderna (ENCTI, 2016).

Para que o metabolismo microbiano funcione, é necessária uma fonte de carbono. Sendo assim, a vinhaça será utilizada pois se adequa as necessidades dos fungos (CAZETTA et al., 2005).
O *Aspergillus niger* e o *Penicillium* sp. realizam 50% de síntese de gordura em relação ao peso do micélio seco. Por sua vez o *Aspergillus* flavus, possui a característica de ser um saprófito capaz de resistir em resíduos agroindustriais (RODRIGUES, et al., 2014; TORTORA et al., 2012).

A eficiência da extração de lipídios está diretamente ligada ao pré-tratamento. A técnica utilizada foi a Bead Mill (JARENKOW et al., 2014). Depois de realizado o pré-tratamento, a massa resultante encontra-se pronta para a extração. A técnica utilizada foi a Soxhlet (JARENKOW et al., 2014).

Com base nestas informações, o trabalho tem como objetivo cultivar as espécies de fungos citadas, em meio tradicional e meio contendo vinhaça, para a produção de lipídios e a extração destes utilizando diferentes solventes para que, no futuro, possam ser utilizados como matéria-prima na produção de biodiesel.

MATERIAL E MÉTODOS

- Cultivo dos fungos em ágar batata dextrose, caldo nutriente e vinhaça

Foi preparado ágar batata dextrose (PDA) e realizada a semeadura dos fungos que foram incubados em estufa B.O.D mantida a 38,5ºC por 7 dias. Foram preparados os seguintes cultivos: duas placas para *Aspergillus niger*, duas placas para *Aspergillus flavus* e duas placas de *Penicillium* sp.

Foram preparados frascos com caldo nutriente e inoculados: dois frascos para *Aspergillus niger* e dois frascos para *Aspergillus flavus* a partir das placas. Após a crescimento do fungo nas placas, foram colhidas a maior quantidade de amostra contida em cada placa de Petri e passadas para a vinhaça. O crescimento dos fungos foi testado em 100 ml de caldo + 100 ml de vinhaça, para que houvesse adaptação deste na vinhaça. Logo depois foram testados na vinhaça pura para avaliação do seu crescimento.

- Obtenção da massa seca

Como os fungos cresceram no caldo, foi necessária uma filtração a vácuo. A biomassa de fungo foi seca em estufa a 105ºC por 15h. Após secagem o material foi macerado e triturado para a obtenção do pó.

- Pré-Tratamento para extração

O pré-tratamento foi realizado com a técnica de Bead Mill (JARENKOW et al., 2014), onde a massa seca (pó) foi colocada dentro de um tubo de ensaio. Para cada 1g de massa fúngica adicionou-se 3 ml de água destilada e algumas pérolas de vidro. Essa mistura foi agitada por 10 min em agitador vórtex , filtrado e seco na estufa por 10h a 100ºC(JARENKOW et al., 2014).

- Extração de lipídios

O método de extração foi o Soxhlet (JARENKOW et al., 2014), onde utilizou-se 100 ml de cada solvente e 0,1 g da massa seca pré-tratada, os solventes utilizados foram: acetato de etila, hexano, clorofórmio e diclorometano com metanol (9:1). A extração ocorreu por um tempo de 3 h. Após a extração os solventes foram recuperados por roto-vaporação e secos em estufa a 75ºC por 2h para a retirada total do solvente. O teor de lipídeos foi determinado utilizando o cálculo de diferença de massa, por meio da fórmula: T= (X.100)/0,1000 onde, T é o teor de lipídeo e X é (peso inicial – peso final).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento foi trabalhado com as duas espécies de *Aspergillus*. Na Figura 1A e 1B estão apresentados o *Aspergillus niger* e o *Aspergillus flavus,* respectivamente.

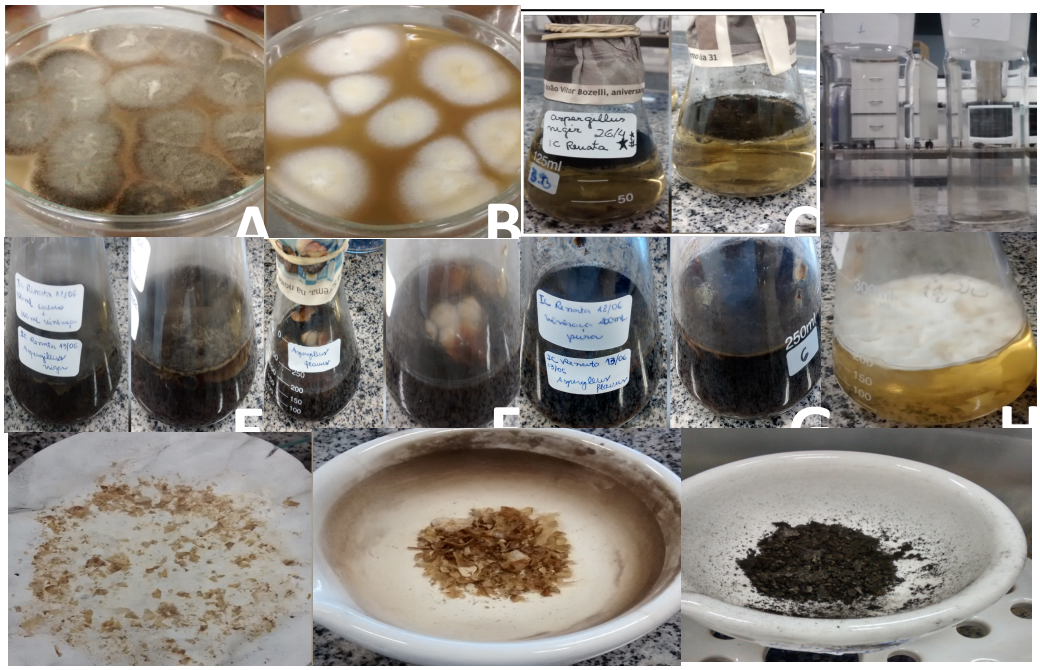
O fungo *Aspergillus niger* desenvolvido no caldo nutriente gerou para cada 200 ml de caldo uma massa seca de 1,0654 g (Figura 1C) que, quando extraídas no Soxhlet (Figura 1D) rendeu 18,8 % de lipídio com acetato de etila (1); 3,6 % com hexano (2); 17,7 % com clorofórmio (3) e 12,1 % com dicloro metano com metanol(4).

O *Aspergillus niger* cultivado na mistura caldo + vinhaça, apresentou uma boa quantidade de massa quando comparada com o cultivo feito somente em caldo, sendo para cada 100 ml de caldo + 100ml de vinhaça uma massa de 0,8700g. (Figura 1E). Por sua vez, não apresentou crescimento favorável na vinhaça pura (Figura 1F).

O *Aspergillus flavus* cultivado na mistura caldo + vinhaça não apresentou um crescimento favorável (Figura 1G), enquanto que na vinhaça pura houve um melhor desenvolvimento (Figura 1F). Porém, seu ápice de desenvolvimento foi no caldo nutriente (Figura 1J), que, para cada 100 ml de caldo gerou 0.9098g.

Durante a obtenção da massa seca, o *A. flavus* apresentou dificuldades, onde boa parte da amostra ficou retida no papel de filtro (Figura 1I) e mesmo com a maceração a amostra não se converteu totalmente em pó, o que dificultou o pré-tratamento. Já o *A. niger* apresenta forma de pó logo que tirado da estufa (Figura 1L).

Figura 1- Extração de lipídio dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*. A- colônias isoladas do fungo *Aspergillus niger*. B- colônias isoladas do fungo *Aspergillus flavus*. C- Cultivo de *Aspergillus niger* em caldo nutriente. D- Amostras contendo o lipídios após a técnica do Sohxlet. E- Cultivo de *Aspergillus niger* em meio contendo 100 ml de vinhaça + 100 ml de caldo nutriente. F- Cultivo de *Asperillus flavus* em meio contendo 100 ml de vinhaça + 100 ml de caldo nutriente. G- Cultivo de *Aspergillus flavus* em meio contendo vinhaça pura. H- Cultivo de *Aspergillus flavus* em meio contendo caldo nutriente. I- Perda de amostra para o papel de filtro de *Aspergillus flavus*. J- Obtenção do pó da amostra de *Aspergillus flavus*. L- *Aspergillus niger* após obtenção da massa seca (pó). M- Microcultivo de *Aspergillus nuger*.



CONCLUSÕES

Foi possível o cultivo dos fungos em meio contendo vinhaça assim como a extração dos lipídios com as devidas técnicas. O *Aspergillus niger* obteve maior produção em relação ao *flavus*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto Federal de Educação do Estado de São Paulo – IFSP- Câmpus Matão pela bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

BARONI, M.; MIOTTO, L. T. *Asperillus flavus* produtos de aflatoxinas - **Revista Conversatio**, vol.1,n.1, p.168-170, 2016

CAZETTA, L. M.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa proteica e lipídica por leveduras e bactéria. Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 26, n. 2, p. 105-112, jul./dez. 2005.

CORTEZ, D. V. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processo de biotransformação, 2016 – Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 12.602-810 Lorena – SP, Brasil.

ESPOSITO, E. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ºed.
Caxias do Sul: Edcs, 2010.

JARENKOW, A. Estudo da produção e extração de lipídios na microalga Chlorella sp. Dissertação (Programa pós- graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

RODRIGUES, E. F.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Produção de compostos com propriedades emulsificantes por Aspergillus flavus utilizando resíduos agroindustriais. Revista Ciências Exatas e Naturais, v.16, n.1, p.76-77, 2014.

SBRAVATTI JUNIOR, J. A.; AUER, C. G.; PIMENTEL, I. C.; SANTOS, A. F.; SCHULTZ, B. Seleção in vitro de fungos endofíticos para o controle biológico de Botrytis cinera em Eucalyptus benthamii. Floresta, Curitiba, PR, v. 43, n.1, p.145-152, 2013.
TORTORA, G.J. Microbiologia. 10ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.