



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

CAMILA FREIRE NOVAES

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS POR
Rhizopus arrhizus var. *arrhizus* UCP 1295
UTILIZANDO SUBSTRATOS RENOVÁVEIS EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Sala: Google Meet <https://meet.google.com/nin-szac-zcm>

Dia 05 de agosto de 2020 às 08:30h (Quarta-feira)

Recife, 26 de julho de 2020

CAMILA FREIRE NOVAES

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS POR
Rhizopus arrhizus var. *arrhizus* UCP 1295
UTILIZANDO SUBSTRATOS RENOVÁVEIS EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais a Universidade Católica de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosileide Fontinele da Silva Andrade

Recife, 26 de julho de 2020

Novaes, C. F.

Produção de biomassa e lipídeos por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 utilizando substratos renováveis em fermentação submersa. 2020. 62 páginas.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2020.

1. Ácidos graxos 2. Substratos renováveis 3. Biomassa 4. Resíduos agroindustriais.

Programa de Pós-Graduação Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Católica de Pernambuco

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS POR
Rhizopus arrhizus var. *arrhizus* UCP 1295
UTILIZANDO SUBSTRATOS RENOVÁVEIS EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

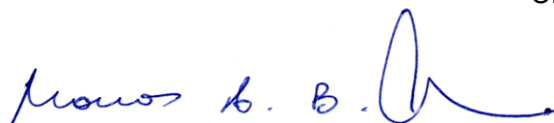
CAMILA FREIRE NOVAES

Examinadores

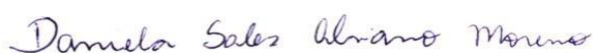
Titulares.



Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
Orientadora



Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
Membro Interno



Profa. Dra. Daniela Sales Alviano Moreno
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Membro Externo

Defendida em 05/08/2020.

Coordenadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Manoel Freire Novaes e Cleide Freire da Silva; aos meus irmãos e irmãs e às minhas amigas Edneide Santana e Lúcia Granja, por todo amor, preocupação, incentivos e por sempre acreditarem em meus ideais de vida de uma guerreira.

HOMENAGEM ESPECIAL

Minha avó cabocla, Maria de Rosa da Conceição (*in memoriam*) me disse: “lembre-se, menina, que as plantas estão aqui desde que a Mãe Terra é Mãe. E nós somos suas filhas. Nós chegamos depois, elas contêm a memória sagrada de nossas raízes”.

Yvytu- Força Originária

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao Deus Tupã, onipotente e onipresente em sua sabedoria infinita; à Mãe Terra, pela sua generosidade em usufruir de tudo o que existe em sua superfície; aos Encantados de Luz pela energia emanada e pela direção certa a seguir.

À Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, pela orientação, acolhimento, incentivo e compreensão. Pelos exemplos de dedicação, por sua humanidade e humildade, por sua competência. Meu sincero respeito.

À Profa. Dra. Rosileide Fontinele da Silva Andrade, pela dedicação e competência na co-orientação desse trabalho.

Aos professores do Curso Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, pela dedicação e palavras de incentivo no transcorrer de nossa convivência.

Aos colegas da 14ª turma (2018) do Mestrado de Desenvolvimento de Processos Ambientais, especialmente à Isabela Natália da Silva Ferreira e Daniel de Moraes Sobral, pela amizade, palavras de incentivo, pelo acolhimento e colaboração.

Aos Doutorandos, e Equipe do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia – NPCIAMB, em especial à Adriana Ferreira de Souza, pelo acolhimento, cumplicidade, solidariedade, companheirismo, colaboração e amizade em todas as etapas de desenvolvimento desta pesquisa.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia – NPCIAMB, Sônia Maria de Souza, Severino Humberto de Almeida, André Felipe Santos Lima e Cristiano José da Silva, pelo acolhimento, colaboração, atenção e amizade dispensadas.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S.J. e à Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação Profa. Dra. Valdenice José Raimundo, por proporcionarem as condições para a obtenção do conhecimento e concretização desta pesquisa.

À Fundação de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo suporte, e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco- FACEPE, pelo fomento e bolsa de apoio à pesquisa.

SUMÁRIO

	Pag.
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
CAPÍTULO I.....	24
3. REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1. Lipídeos.....	25
3.2. Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFAs).....	25
3.3. Fungos Filamentosos produtores de Ácidos Graxos.....	31
3.4 Substratos Alternativos (Resíduos Agroindustriais)	33
3.5.1. Glicerol Bruto da Síntese de Biodiesel.....	32
3.5.2. Cenoura (<i>Daucus carota</i>) de descarte de feira orgânica.....	33
3.5.3 Casca da mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) de farinha em Aldeia Índigena.....	34
3.5.3.1 Danos ambientais causados por mandioca (<i>Manihot esculenta</i>	36
4.REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO II.....	45
Artigo1- Produção Sustentável De Biomassa Oleaginosa Por <i>Rhizopus</i> <i>Arrhizus</i> Ucp 1295 Utilizando Cenoura De Descarte Como Fonte De Carbono Alternativa.....	46
1. Introdução.....	47
2 Material e Métodos.....	48
3. Resultados e Discussões.....	50
4 Conclusão.....	53
Referencias Bibliográficas.....	53
CAPÍTULO III.....	56
Artigo 2- Uso de Subprodutos Cascas de Mandioca e Glicerol Bruto como Estratégias de Baixo Custo na Produção de Biomassa e Lipídios por <i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i> UCP 1295.....	57
1. Introdução.....	58
2. Material e Métodos.....	59
3. Resultados e Discussões.....	60
4 Conclusões Finais.....	64
Referências Bibliográficas.....	65

CAPÍTULO IV	68
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1- A classificação dos ácidos graxos não esterificados é de acordo com a presença, número e geometria de duplas ligações: (A). Ácido graxo monoinsaturado (MUFA); Ácido graxo saturado (SFA) e ácido graxo poli-insaturado (PUFA); (B) Caminhos metabólicos da síntese de ácidos graxos ω -3 e ω -6.....26

Figura 2 - Filogenia de máxima verossimilhança baseada em genoma e filogenia de parcimônia com base em caracteres não moleculares. (A) Árvore de máxima verossimilhança enraizada do gênero *Rhizopus* com base em 192 genes ortólogos. (B) Árvore de parcimônia não enraizada de 16 caracteres não moleculares (14 micromorfológicos e dois ecológicos)30

Figura 3- Características macroscópicas de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 cultivadas em ágar Sabouraud. rizoides e esporângios sob o microscópio óptico.....31

Figura 4- Cadeia produtiva do biodiesel.....32

CAPÍTULO II

Figura 1 – Diagrama de Pareto obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2^3 para determinar a influência das variáveis independentes : cenoura descartada(1), extrato de levedura (2) e peptona (3) sobre as variáveis dependentes rendimento de biomassa (A) e lipídios (B).....50

CAPÍTULO III

Figura 1: Diagramas de Pareto obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2^3 para determinar a influência das variáveis independentes: cascas de mandioca (1), extrato de levedura (2) e peptona (3) sobre as variáveis dependentes rendimento de biomassa (A) e lipídeos totais(B).....60

Figura 2: Diagramas de Pareto obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2^3 para determinar a influência das variáveis independentes: glicerol bruto (1), extrato de levedura (2) e peptona (3) sobre as variáveis dependentes rendimento de biomassa (A) e lipídeos totais(B).....62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1-Principais ácidos graxos poli-insaturados que podem ser obtidos a partir da dieta.....27

Tabela 2-Quantidade de lipídios acumulados por diferentes espécies de Mucorales.....29

Tabela 3 - Composição nutricional da cenoura33

Tabela 4- Composição centesimal da raiz e casca de mandioca (*Manihot esculenta*)..35

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial completo 2^3 para a produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus* UCP 1295.....48

Tabela 2 – Planejamento fatorial completo 2^3 utilizado para a produção de biomassa e lipídios por *Rhizopus arrhizus* UCP 12 95.....49

Tabela 3 – Produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus* UCP 1295 utilizando cenoura de descarte comparada a outros fungos da ordem Mucorales50

Tabela 4 – Produção de lipídeos por representantes da ordem Mucorales utilizando diferentes..... 50

CAPÍTULO III

Tabela 1- Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial completo 2^3 para a produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295.....58

Tabela 2.- Planejamento fatorial completo 2^3 utilizado caldo de cascas de Mandioca (*Manihot esculenta*) na produção de biomassa e lipídeos *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295.....59

Tabela 3- Planejamento fatorial completo 2^3 utilizando glicerol residual para a produção de biomassa e lipídeos por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295.....61

RESUMO

Investigações foram realizadas com *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 para produção de biomassa e lipídeos empregando resíduos agroindustriais. Os estudos iniciais envolveram o descarte de cenoura (*Daucus carota* L.), extrato de levedura e peptona, uma solução rica em sais minerais, em fermentação submersa empregando um planejamento fatorial completo 2^3 , para avaliar a influência dos componentes do meio no rendimento de biomassa e lipídeos. Os resultados mostraram na condição 8 com o maior rendimento de biomassa (8,11 g/L) e acumulação de mais de 35% de lipídeos. Contudo, a produção máxima de lipídeos foi 64,44%, na condição 1 (2% de cenoura descartada e 1% de peptona), indicando que a cenoura é uma fonte de carbono promissora para acumulação de lipídeos. Em seguida, estudos comparativos foram realizados com a casca de mandioca (*Monihot esculenta*), resíduo da produção de farinha e com glicerol bruto, suplementando com substratos convencionais extrato de levedura e peptona, empregando planejamento fatorial completo 2^3 , para avaliar a influência dos componentes do meio no rendimento de biomassa e acumulação de lipídeos por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295. Os resultados indicaram que a condição 8 (6% de cascas de mandioca, 1% de extrato de levedura e 3% de peptona) influenciaram ao aumento da produção de biomassa (12,92 g/L), observando-se 398,02 mg de lipídeos por g de biomassa, correspondendo a 30,42%. No entanto, em porcentagem a maior acumulação de lipídeos foi observada na condição 7 (2% de cascas de mandioca, 1% de extrato de levedura e 3% de peptona), com 35,39% de lipídeos. Com o uso de glicerol bruto observou-se maior produção de biomassa no ensaio 6 (5% de glicerol bruto e 3% de peptona), produzindo 22,1g/L de biomassa, 699,60 mg de lipídeos por g de biomassa, correspondendo a 31,64% de lipídeos, tornando-se eficiente na produção de biomassa e lipídeos, sendo o meio mais econômico e eficiente pela ausência do extrato de levedura. Comparando os resultados obtidos com resíduo de cenoura e de mandioca observa-se que cenoura propiciou elevada produção de lipídeos, provavelmente devido ao maior conteúdo em carbono, fonte essencial para acumulação de lipídeos. As biomassas formadas ricas em lipídeos geram perspectivas de utilização em ração animal, na área de alimentos e de cosméticos.

Palavras-chave: Substratos Renováveis. Biomassa. Resíduos agroindustriais. Lipídeos. Ácidos Graxos.

ABSTRACT

Investigations were carried out with *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 in the conversion to biomass and lipid production using agro-industrial residues. The initial studies with the disposal of carrot (*Daucus carota* L.), yeast extract and peptone, a solution rich in mineral salts, in submerged fermentation. Employing a complete factorial design 2³, to evaluate the influence of the components of the medium in the yield of biomass and lipids. The results showed in condition 8 with the highest biomass yield (8.11 g / L) and accumulation of more than 35% of lipids. However, the maximum production of lipids was 64.44%, in condition 1 (2% of discarded carrots and 1% of peptone), indicating that carrots are a promising carbon source for lipid accumulation. Then, comparative studies were carried out with the cassava peel (*Monihot esculenta*), residue from the indigenous village from the production of flour and with crude glycerol, supplementing with conventional substrates yeast extract and peptone, using complete factorial design 2³, to evaluate the influence of the components of the medium in the biomass yield and accumulation of lipids by *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295. The results indicated that condition 8 (6% of cassava peels, 1% of yeast extract and 3% of peptone) influenced the increase in biomass production (12.92 g / L), being observed 398.02 mg of lipids per g of biomass, corresponding to 30.42%. However, in percentage, the highest accumulation of lipids was observed in condition 7 (2% of cassava peels, 1% of yeast extract and 3% of peptone), with 35.39% of lipids. The use of crude glycerol was observed higher biomass production in test 6 (5% crude glycerol and 3% peptone), producing 22.1 g / L of biomass, 699.60 mg of lipids per g of biomass, corresponding to 31.64% of lipids, making it the most efficient medium in the production of biomass and lipids, being the most economical medium due to the absence of yeast extract. These results were confirmed by the Pareto diagrams. Comparing the results obtained with carrot and cassava residue, it is observed that carrots provided high lipids, probably due to the higher carbon content, an essential source for lipid accumulation. The biomasses formed rich in lipids generate prospects for use in animal feed, in the area of food and cosmetics.

Keywords: Fatty Acids. Renewable Substrates. Biomass. Agroindustrial wastes.

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO

A produção de biodiesel tem sido incentivada por ser um combustível renovável, biodegradável e não tóxico obtido pela transesterificação de um óleo ou gordura com um álcool monovalente, formando ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol bruto. Dessa forma, grandes quantidades de glicerol bruto é gerado na síntese do biodiesel a partir de óleos vegetais, sendo um dos grandes problemas enfrentados por esse setor devido ao aumento do uso das áreas de oleaginosas para atender à crescente demanda do mercado, promovendo a competição pela produção de biocombustíveis (BEATRIZ et al. 2011; YANG et al., 2012; POLI et al., 2015).

Neste sentido, torna-se fundamental encontrar estratégias biotecnológicas que possam servir de alternativas para converter estes resíduos líquidos e sólidos, respectivamente, em elevado valor agregado. Dessa forma, os lipídios de fonte microbiana, ricos em triacilgliceróis, os quais podem ser convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME - Fatty Acids Methyl Esters). Averiguou-se também, que a produção de lipídios por fungos possui inúmeras vantagens devido ao seu rápido crescimento, menor susceptibilidade a alterações por estação, local e clima, maior facilidade de ampliação de escala. (THIRU et al, 2016; BARDHAN et al., 2020).

Assim, a produção de biocombustíveis de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica, principalmente o bioetanol, continua sendo uma tecnologia desafiadora, considerando os requisitos especiais de equipamento de custo mais elevado, além do consumo de água pesada, tornando-se uma tecnologia de produção complexa (SINDHU et al., 2016; ABDUH et al., 2017).

Segundo Santos (2013) e Silva (2013), o uso de subprodutos industriais vêm se tornando importante para a economia e o meio ambiente, uma vez que podem evitar possíveis impactos ambientais. Além disso, os resíduos agroindustriais podem ser utilizados para crescimento de micro-organismos e recuperação de biomassa em diversas áreas da biotecnologia, como saúde, agricultura, energia e meio ambiente.

Contudo, a produção de etanol celulósico não se apresenta economicamente viável, e torna-se ambientalmente hostil, demonstrando a necessidade urgente de se identificar outras fontes e tecnologias com potencial para a produção de biocombustíveis, indicando também, o reaproveitamento dos resíduos (BANAT et al., 2014; SATPUTE et al., 2017). A biomassa é considerada matéria-prima para a bioenergia, cujas transformações em energia podem transitar pelas formas de biocombustíveis (biodiesel e etanol) (SILVA, 2016).

As matérias-primas são classificadas em duas categorias principais: a) culturas de cana-de-açúcar, amido, sorgo doce, e as lignocelulósicas, culturas oleaginosas, silagem de grama, culturas marinhas, ou seja, algas; e b) resíduos de produtos como óleo de

cozinha, sebo, resíduo lignocelulósico, resíduos ou rejeitos de mandioca, como resultado do processo de extração do amido que ainda pode conter um valor significativo do amido não extraído, tornando-se fonte de carboidratos de rápida fermentação (CARDOSO, 2004), além da casca de arroz, bagaço de tomate, extração de madeira e resíduos orgânicos industriais. Em termos econômicos, é importante destacar que os usos de substratos renováveis oferecem excelente finalização para outros mercados (BANAT et al., 2014; SATPUTE et al., 2017). A cenoura apresenta-se como substrato de elevado teor de lignina, hemicelulose e celulose, possibilitando o seu uso como fonte de carbono e substrato alternativo (OLOFSSON et al., 2017).

Uma grande variedade de substratos não-convencionais como resíduos ricos em carboidratos, óleos vegetais, ácidos graxos, n-alcanos, etanol, glicerol e ácidos orgânicos têm sido utilizados como fontes nutricionais para a produção de biomassa rica em lipídeos (PAPANIKOLAOU; AGGELIS 2011). Investigações dirigidas para uma abordagem mais economicamente viável e ambientalmente amigável torna-se fundamental para a produção de biomassa rica em lipídeos, reforçando o conceito da bioeconomia circular (SATPUTE et al., 2017), por meio da biotransformação dos resíduos agroindustriais por via microbiana (XU et al., 2016; OLOFSSON et al., 2017). A contribuição desse estudo está baseada na literatura que afirma ser uma alternativa atraente e de baixo custo a produção de biomassa oleaginosa por fungos filamentosos (THLVEROS et al., 2014; AURORA et al., 2019). E ainda, é direcionada para a divisão Mucoromycota, particularmente de fungos oleaginosos os produtores de ácido araquidônico e ácidos graxos poliinsaturados, que podem no futuro levar ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos (INNES e CALDER, 2018; KOSA et al., 2018; PATEL et al., 2020).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e extrair lipídeos obtidos a partir da biomassa de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 em fermentação submersa, utilizando substratos agroindustriais, como fontes de carbono.

2,2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de biomassa por *R. arrhizus* var. *arrhizus* usando como fonte de carbono o descarte de cenoura, caldo das cascas de mandioca e glicerol bruto em diferentes concentrações, em fermentação submersa;
- Comparar a produção de biomassa por *R. arrhizus* var. *arrhizus* utilizando as diferentes fontes de carbono;
- Extrair lipídeos de todos os ensaios realizados a partir biomassa produzida por *R. arrhizus* var. *arrhizus* com diferentes fontes de carbono;
- Avaliar a acumulação de lipídeos por *R. arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 utilizando as diferentes fontes de carbono;
- Analisar estatisticamente os dados obtidos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Lipídeos

Os lipídios são moléculas criticamente importantes, com muitas funções essenciais. Eles são os principais constituintes de todos os compartimentos da membrana e são os principais determinantes das interações dentro e entre as estruturas celulares. As células investem um esforço substancial na produção de milhares de espécies lipídicas; no entanto, nosso conhecimento das implicações dessa diversidade lipídica está atrasado em nossa compreensão de proteínas e ácidos nucleicos (STORCK, ÖZBALCI e EGGERT, 2018). As propriedades físico-químicas dos lipídios dependem de suas estruturas químicas, então, é crucial primeiro compreender a extensão da diversidade química de lipídios e como as membranas diferem na composição lipídica antes de abordar as conseqüências biológicas da diversidade lipídica.

A composição lipídica afeta as propriedades físicas da membrana, cuja relevância biológica está se tornando mais clara. Por exemplo, os ácidos graxos poliinsaturados nos glicerofosfolipídios reduzem a rigidez da membrana e afetam os processos que acompanham a deformação da membrana (HARAYAMA, RIEZMAN, 2018; CASARES, ESCRIBÁ, ROSSELLÓ, 2019).

No Planeta Terra há uma pequena gama de micro-organismos eucarióticos, onde as espécies oleaginosas, podem acumular lipídios de armazenamento celular na biomassa. Alguns desses lipídios, contêm altas proporções de ácidos graxos poliinsaturados com uma grande importância tanto nutricional como comercial; estes são conhecidos como óleos unicelulares. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), como ácido araquidônico (ARA), ácido gama linolênico (GLA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), têm papéis estruturais e funcionais cruciais nos eucariontes superiores e são recomendados para prevenção ou tratamento de doenças crônicas, como cardiovasculares e inflamatórias (BELLOU et al., 2016 ; HULBERT et al., 2005 citados por YAO et al., 2019).

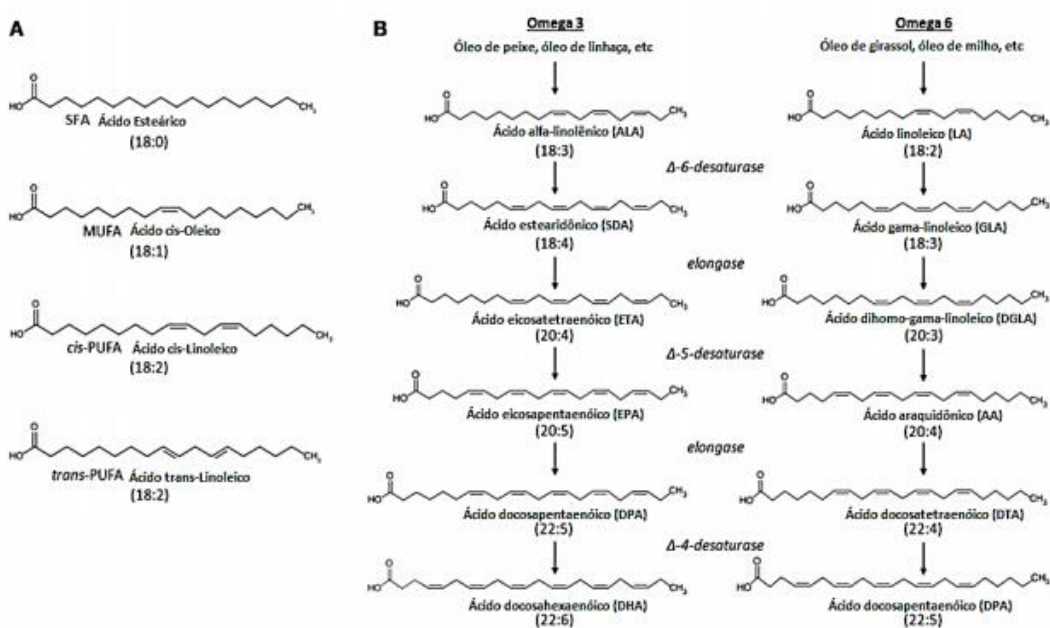
3.2 Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFAs)

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) possuem 18 ou mais carbonos, apresentando dois ou mais metilenos intercalados por uma ligação dupla. Dependendo da posição da primeira ligação dupla próxima ao grupo metil terminal do ácido graxo, os PUFAs podem ser designados por ômega (ω -) ou (n-) seguidos de números e

classificados em 2 grupos majoritários: família do ω -6 (ou n-6) e ω -3 (n-3) (HOU, 2005). Os produtores de PUFAs são plantas, alguns microrganismos (fungos filamentosos, leveduras, microalgas e bactérias). Algumas espécies de animais como o ser humano, é incapaz de sintetizar os ácidos graxos poli-insaturados (ω -3 e ω -6) pela falta das enzimas dessaturases e elongases. Na figura 1, são observadas essas cadeias. Porém, os mamíferos podem metabolizar estes dois ácidos graxos, considerados essenciais, obtidos da dieta alimentar para formar outros ácidos graxos poli-insaturados e mais longos para necessidades metabólicas (LEE et al., 2016).

Em mamíferos, os ácidos graxos poli-insaturados têm uma importante função estrutural, modulando a fluidez e a permeabilidade da membrana. Ainda agem localmente em diversos mecanismos sinalizadores que têm efeitos em funções celulares induzindo quimiotaxia, permeabilidade vascular, inflamação, vasoconstrição entre outros. Podem esses ácidos graxos, ser classificados de acordo com o número de duplas ligações entre os carbonos da cadeia (NELSON & COX, 2014). Os ácidos graxos saturados (SFA), como o ácido esteárico, não possuem ligações duplas. Os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), como o ácido oleico, tem uma ligação dupla. E ainda segundo, Nelson & Cox (2014), os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), como ácido linoleico, ácido araquidônico (AA) e ácido docosa-hexaenóico (DHA) têm duas ou mais ligações duplas.

Figura 1- A classificação dos ácidos graxos não esterificados é de acordo com a presença, número e geometria de duplas ligações (A). (B) Caminhos metabólicos da síntese de ácidos graxos ω -3 e ω -6.



FONTE:(ELINDERF; LIIN, 2017, Adaptado pelo autor).

Por ser alto o custo a escassez das fontes convencionais de PUFAs, o uso de óleos unicelulares (SCOs), como fonte alternativa de ácidos graxos essenciais recebeu crescente interesse devido à sua alta produtividade e baixa exigência de terra (FANG et al., 2016 citado por YAO et al., 2019), apresentados na tabela 1.

Por ter um consumo pequeno de PUFAs na maior parte do mundo aumenta o risco de doenças em humanos (SAINI et al, 2018). O câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e osteoporose são as principais doenças crônicas relacionadas à dieta e sedentarismo. Como outras fontes alimentares, os lipídios desempenham papéis críticos na prevenção e ocorrência de todas estas doenças (BERQUIN et al, 2008; FREDMAN & TABAS, 2017). Para aumentar a ingestão de PUFAs, há propostas de estratégias para tal, como: o consumo de peixes marinhos ricos em PUFAs; Ingestão de alimentos com produtos ricos em PUFAs, como óleo vegetais, óleos de castanhas oleaginosas (SAINI, et al 2018); Aumento da quantidade de PUFAs em plantas oleaginosas por biotecnologia (GARG, 2006).

Tabela 1 – Principais ácidos graxos poli-insaturados que podem ser obtidos a partir da dieta

Ácido Graxo	Abreviatura
Família n-3	
9,12,15-Octadecatrienoico (linolênico)	C18:3 n-3
5,8,11,14,17-Eicosapentanoico (EPA)	C20:5 n-3
4,7,10,13,16,19-Decosaexanóico (DHA)	C22:6 n-3
Família n-6	
9,12-Octadecadienoico (linoleico)	C18:2 n-6
5,8,11,14-Ecosatetraenoico (araquidônico)	C20:4 n-6

Fonte: Adaptação do Autor (2019)

A fonte principal que contém PUFAs é peixe de água marinha e tem sido amplamente utilizado na indústria de alimentos em conjunto com os óleos vegetais para obter concentrados de PUFAs. Segundo a FAO, consumo mundial de peixe tem crescido, e em 2016 atingiu o recorde de 20 kg por pessoa/ano. No entanto, a disputa de mercado do pescado entre o consumo e a suplementação dietética, aumenta substancialmente o preço do peixe e encarece os produtos derivados. Outra desvantagem, é que a grande maioria da produção de pescado explora os recursos

naturais marinhos, e com o aumento dessa demanda, os níveis podem ficar insustentáveis.

A produção de PUFA's por métodos alternativos, como a biotransformação mediada por fungos filamentosos, pode ser uma das alternativas para suprir a demanda desses ácidos graxos destinados como suplemento na alimentação.

3.3 Fungos Filamentosos produtores de Ácidos Graxos

Fungos são organismos eucarióticos, uni ou pluricelulares, heterótrofos e podem se reproduzir de forma sexuada e assexuadamente. Sendo a maioria anaeróbios, com temperatura de crescimento entre 25 a 30°C e pH entre 4 e 7. Os fungos são utilizados em muitos processos biotecnológicos, tais como a produção de quitina, quitosana, bioemulsificantes, vitaminas, enzimas, polissacarídeos, lipídios, pigmentos e outros processos de produção de alimentos (KUO; TSAI,2010; PAREEK et al.; SALAM et al.; 2011;ABU-ELREESH-HALEE, 2014; et al.; PEREIRA et al.; 2017).

Os microrganismos oleaginosos produtores de óleo microbiano, também conhecido como SCOs, contêm > 20% de lipídios de sua biomassa celular podendo alcançar acúmulo excessivo alterando especificamente a via metabólica microbiana (KOSA e RAGAUSKAS, 2011 ; LEDESMA-AMARO, 2015 ; RATLEDGE, 1991 citados por YAO et al., 2019).

No século XX, o interesse de outros países e principalmente os EUA e o Reino Unido em relação à produção de SCOs na aplicação em indústrias de alimentos, tratamento de água, farmacêuticas e demais. (WOODBINE 1959 citado por PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2019). Contudo, no início dos anos 50 ocorreu um considerável desenvolvimento na prática agrícola, de fato, que os óleos comuns derivados de fontes microbianas (ou seja, lipídios ricos em ácidos oleico, linoleico e α -linolênico) nunca seriam capazes de competir economicamente com os óleos básicos a granel, como óleo de soja, óleo de girassol e óleo de colza (RATLEDGE; WYNN, 2002 citados por PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2019).

Devido a capacidade de crescimento em substratos simples e de baixo custo, e por produzir diversos metabólitos, onde são utilizados em muitos processos nas diferentes áreas indústria como na produção de glicolipídios, lipídios, pigmentos, polissacarídeos, enzimas e vitaminas. Portanto pesquisas estão sendo realizadas por seu potencial biotecnológico (MEYER, 2018). Na tabela 2, estudos relatam variedades de micro-organismos oleaginosos para o acúmulo de lipídios utilizando diferentes fontes de carbono presentes em substratos de baixo custo. Em termos de produção de SCOs,

leveduras oleaginosas têm inúmeras vantagens, assim, como bactérias, fungos e microalgas com base em sua alta taxa de crescimento e rendimento lipídico. Inúmeros esforços foram feitos na produção competitiva de lipídios, combinando o uso de matérias-primas baratas com a casca de mandioca e o glicerol bruto (QIN, Lei et al., 2017.)

Tabela 2 - Quantidade de lipídios acumulados por diferentes espécies de Mucorales

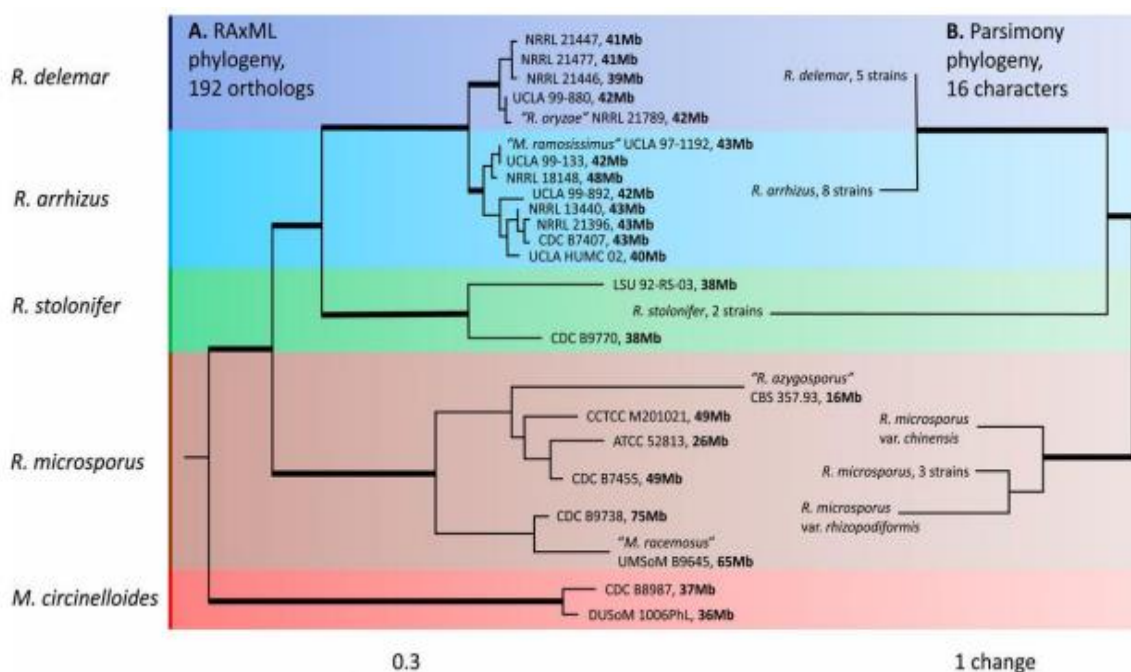
Espécie	Fonte de carbono	Lipídio (% da biomassa seca)	Fonte
<i>Thamnidium elegans</i>	Glicose	64,1	Papanikolaou et al. (2010)
<i>Thamnidium elegans</i>	Frutose	65,9	Papanikolaou et al. (2010)
<i>Thamnidium elegans</i>	Sacarose	64,6	Papanikolaou et al. (2010)
<i>Mortierella isabelina</i>	Casca de arroz hidrolisado	64,3	Economou et al. (2011)
<i>Mortierella isabelina</i>	Farelo de trigo	53,0	Zeng et al. (2013)
<i>Mortierella isabelina</i>	Soro de leite coalhado	21,3	Demir et al. (2013)

Fonte: Autoria própria (2019).

As abordagens filogenômicas têm o potencial de melhorar a confiança sobre as interações das espécies na ordem Mucorales na árvore fúngica da vida. As espécies de *Rhizopus* são especialmente importantes como patógenos vegetais e animais e fermentadores bioindustriais para a produção de alimentos e metabólitos. Um conjunto de dados de 192 genes ortólogos foi utilizado para construir uma árvore filogenética de 21 cepas de *Rhizopus*, classificadas em quatro espécies isoladas de habitats de importância industrial, médica e ambiental. A figura 2 são demonstradas as semelhanças das espécies na morfologia e fisiologia. O gênero *Rhizopus* consiste em três grandes clados, com *R. microsporus* como espécie basal e linhagem irmã de *R. stolonifer* e duas espécies intimamente relacionadas *R. arrhizus* e *R. delemar* (GRYGANSKYI et al., 2018).

Figura 2 - Filogenia de máxima verossimilhança baseada em genoma e filogenia de parcimônia com base em caracteres não moleculares. (A) Árvore de máxima

verossimilhança enraizada do gênero *Rhizopus* com base em 192 genes ortólogos. (B) Árvore de parcimônia não enraizada de 16 caracteres não moleculares (14 micromorfológicos e dois ecológicos). Os dados morfológicos e fisiológicos para diferentes linhagens da mesma espécie são consolidados na árvore, exceto para aquelas que diferem em pelo menos um caractere. Ramos grossos indicam valores de bootstrap estatisticamente significativos.



Fonte: GRYGANSKYI et al., 2018

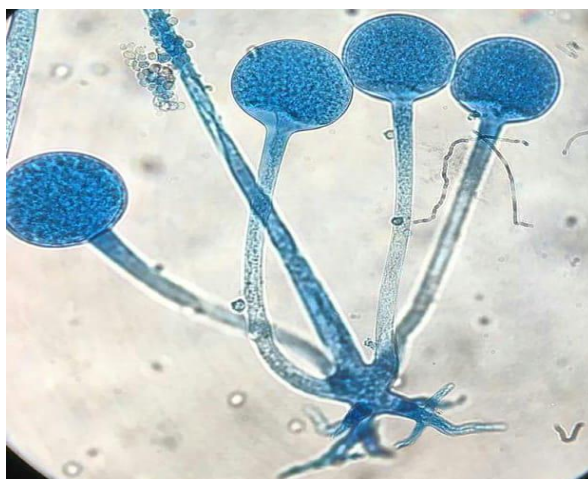
Rhizopus (Ehrenb. 1821) é um gênero de fungos zigomicetos saprotróficos (Mucoromycotina, Mucoromycota) que é onipresente no solo, excremento de animais e vegetação em decomposição (PIDOPLICHKO e MIL'KO 1971). O gênero é especialmente relevante para empresas humanas. Por exemplo, certas espécies podem atuar como patógenos vegetais que afetam as culturas, algumas são produtoras de enzimas na biofermentação industrial e outras são usadas como agentes de fermentação na produção de alimentos. Além disso, certas espécies são agentes causais de doenças em animais, incluindo seres humanos, e são usadas como organismos modelo no estudo da biologia celular e molecular dos fungos (ABE et al., 2006 , OGAWA et al., 2004 , SAITO et al., 2004 , MUSZEWSKA et al., 2014).

Durante séculos, as espécies *Rhizopus* têm sido usadas na produção de produtos fermentados, como tempeh e raji (OGAWA et al., 2004, DOLATABADI et al. 2016). Dada a importância do *Rhizopus* na saúde humana e na indústria, é necessário um sistema de classificação robusto para refletir as principais diferenças entre as

espécies e como as relações entre as espécies se correlacionam com as propriedades relacionadas às atividades humanas. Tradicionalmente, as espécies têm sido diferenciadas com base em características morfológicas e fisiológicas discretas, como temperatura máxima de crescimento, formação de estruturas morfológicas (clamidosporos, esporângios e rizóides), curvatura da columela, características de esporangióforos (cor, forma e tamanho), esporângios diâmetro (INUI et al., 1965).

As espécies do fungo filamentoso *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 (Figura 3) vem sendo utilizado desde a antiguidade na obtenção de condimentos e alimentos, salientando a grande importância econômica desse fungo, apesar de serem conhecidos como grandes patógenos oportunistas (DOLATABADI et al., 2015; LONDOÑO-HERNANDEZ et al., 2017; DOTIS et al., 2019).

Figura 3- Características macroscópicas de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 cultivadas em ágar Saboraud. rizóides e esporangios sob o microscópio óptico.



Fonte: Autoria própria.

3.4 Substratos Alternativos (Resíduos Agroindustriais)

A atividade industrial é responsável pela geração de milhões de toneladas de resíduos agroindustriais em todo o mundo (MAKRIS et al., 2007). Grande parte desses resíduos não é aproveitada, sendo descartada diretamente no meio ambiente e podendo causar danos à flora e fauna presentes, desequilibrando ecossistemas. Os resíduos de origem agroindustrial são considerados promissores nos processos fermentativos, tanto por fermentação submersa, como em estado sólido, por possuírem um elevado valor nutritivo em suas moléculas. Assim sendo, as sobras agroindustriais vêm sendo empregados como fontes de carbono e nitrogênio favorecendo o crescimento

microbiano e a produção de metabólitos (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; MENESES, 2016 citados por DA COSTA LIMA et al., 2019).

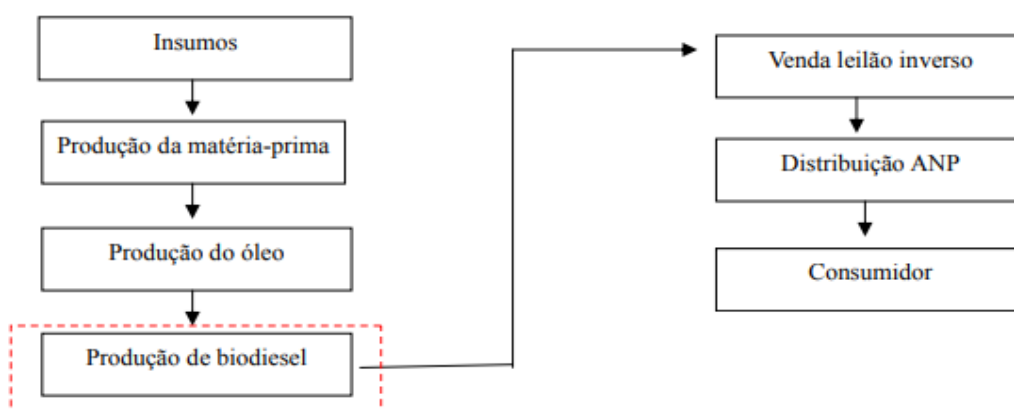
3.4.1 Glicerol Bruto da Síntese de Biodiesel

O Biodiesel, uma mistura combustível proveniente da reação de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal na presença de um catalisador em meio alcoólico, originando alquil ésteres derivados de ácidos graxos e o glicerol como coproduto (LÔBO; FERREIRA, 2009; RAMOS et al., 2009; FELIZARDO et al., 2006 citados por PEITER, 2016).

O glicerol é o principal coproduto, também chamado de glicerina, na forma pura possui inúmeras aplicações industriais, como por exemplo em aditivos para a indústria de cosméticos, de medicamentos, de alimentos e indústria química em geral (VASCONCELOS, 2012 citados por PEITER, 2016). A sobra de glicerol gerado como subproduto do combustível biodiesel e da produção oleoquímica está resultando no desligamento das plantas tradicionais de produção / refino de glicerol e novas aplicações são necessárias para esta agora abundante fonte de carbono.

Por ser um combustível renovável e biodegradável, o biodiesel passa a ser uma alternativa. E sua produção pode cooperar com o desenvolvimento econômico de diversas regiões do Brasil, sendo possível explorar melhor cada região de acordo com alternativa de matéria-prima. Tendo um impacto social com a geração de emprego e renda. A figura 4 demonstra um modelo descritivo geral da produção de biodiesel, tendo como base a técnica de modelagem IDEF0 (Integration Definition for Function Modeling) (DE OLIVEIRA; DA ROSA, 2010).

Figura 4 – Cadeia produtiva do biodiesel



Fonte: DE OLIVEIRA; DA ROSA (2010)

A Lei Federal nº 12.305 / 2010, trata da política brasileira de resíduos sólidos, e traz suas diretrizes sobre gestão integrada e gestão de resíduos sólidos. O descarte

correto dos resíduos inclui reutilização, reciclagem, compostagem, recuperação e uso de energia ou outros destinos permitidos pelas autoridades competentes, incluindo o descarte final, observando regras operacionais específicas para evitar danos ou riscos à saúde pública, minimizar os impactos ambientais adversos. Compreendendo a legislação, o resíduo sólido é um material, substância, objeto ou o resultante de atividades humanas (Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2010 citado por ORO et al., 2019). Sendo a glicerina uma substância derivada da produção de biodiesel, pode ser introduzida como alimento para animais como frangos de corte devido ao alto nível de glicerol, um composto de alta energia, representando possibilidade de redução dos custos de produção (LAGE, 2010; LIMA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2019).

3.4.2. Cenoura (*Daucus carota*) de descarte de feira orgânica

A cenoura (*Daucus carota*) é uma planta originária no norte da África, mais especificamente na região do mediterrâneo, pertencente a família das Umbelíferas (Apiaceae). Sua introdução no Brasil ocorreu juntamente com o processo de colonização e expansão portuguesa no país no século XVI. Entretanto, pressupõe-se que as primeiras lavouras só foram instaladas no século XIX no Sul do país (VILELA e BORGES, 2008).

Um dos seus principais componentes é a presença em grande quantidade de β -caroteno, substância precursora da vitamina A, responsável por diversas funções na nutrição humana. A tabela 3 mostra as propriedades nutricionais da cenoura. A presença de açúcares solúveis (como sacarose, glicose e frutose) também se destaca em quantidade neste vegetal, chegando a representar 70% da matéria seca das raízes (FINGER et al., 2005).

Tabela 3- Composição nutricional da cenoura (100g).

Componentes	Unidades	Quantidades
Cobre	Ug	0,1
Lipídios	G	0,2
Carboidratos	G	7,7
Fibras	G	3,2
Proteínas	G	1,3
Sódio	Mg	3,3
Potássio	Mg	314,8
Cálcio	Mg	22,5
Ferro	Mg	0,2

Zinco	Mg	0,2
Vitamina C	Mg	5,1
Fósforo	Mg	27,9

Fonte: Autoria própria, 2019

As cenouras são grandes fontes de fibra dietética, antioxidantes, minerais e β -caroteno. As cenouras, originalmente, apareciam com cores púrpura, branca e amarela. É considerado o alimento com maior quantidade de β -caroteno, além disso, tem seu consumo recomendado por ser uma grande fonte de fibra e potássio (GONZAGA e RODRIGUES, 2001).

3.4.3. Casca da mandioca (*Manihot esculenta*) de farinha em Aldeia Índigena

Da família das Euforbiáceas, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), é uma das culturas mais difundidas no país devido sua facilidade de cultivo, diversidade genética, resistência a pragas, capacidade de regeneração e adaptação ecológica sendo utilizada na fabricação de produtos alimentícios e uso industrial (EMBRAPA, 2003). A safra de produtividade média de mandioca no Brasil de 2018/2019 correspondeu a 19.301.000 toneladas (SEAB, 2020).

Parte do processamento é residuo das raízes da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) saudáveis, limpas e secas, que são prensadas e lavadas, resultando um volume extra de um líquido amarelo claro, conhecido popularmente como manipueira (BARRETO et al., 2014; BRITO et al., 2015). A composição nutricional da manipueira é excelente, devido à presença de minerais, como fósforo, potássio, magnésio; além de a manipueira ser boa fonte de açúcares fermentescíveis e nitrogênio, favorável ao crescimento de micro-organismos, esta pode ser também utilizada como fertilizante (DUARTE et al., 2012).

O vegetal mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um arbusto tropical perene da família Euphorbiaceae. A mandioca é uma espécie que produz raízes tuberosas com alto teor de amido, as quais são utilizadas como alimento por milhões de pessoas em diversos países (SILVA et al., 2011). O Brasil ocupa a segunda posição entre os produtores mundiais de mandioca, com produção estimada de 24 milhões de toneladas de raízes frescas de mandioca em aproximadamente dois milhões de hectares (IBGE, 2015). A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) caracteriza-se por ser uma excelente opção para alimentação animal, por ser fonte de carboidratos, proteínas, vitaminas, minerais e carotenoides (MODESTO et al., 2004; MONTAGNAC et al., 2009). A mandioca é cultivada com foco na produção de raízes para consumo próprio ou com

fonte de renda, enquanto as folhas são deixadas na própria lavoura, sem nenhum tipo de aproveitamento. Por outro lado, diversos estudos têm demonstrado que, dentro de certos limites, a substituição de alimentos convencionais pelos derivados da mandioca, a exemplo da silagem da parte aérea e feno, não afeta negativamente o desempenho animal em ruminantes. Em diversos países africanos a mandioca é considerada uma cultura de segurança alimentar pela sua ampla adaptação a solos marginais e condições irregulares chuvas, condições estas que são limitantes para a maioria das culturas agrícolas convencionais (ADJEBENG-DANQUAH e SAFO-KANTANKA, 2013).

Neste sentido, a Tabela 4 apresenta a composição centesimal da raiz de mandioca, sendo observado que carboidratos (94,10%) é o maior constituinte. Portanto, o líquido produzido das cascas da mandioca por prensagem é denominado de manipueira que em tupi-guarani significa “o que brota da mandioca”, com elevado impacto ambiental e toxicidade. O carboidrato obtido é um glicosídeo característico da planta de mandioca a laminarina, que está presente em todas as partes da planta. A elevada toxicidade da manipueira é devido ao processo de hidrólise da laminarina que origina a glicose, acetona e o ácido cianídrico [28]. O HCN é portanto, um componente altamente tóxico, que apresenta com 38,00% na matéria seca. Observa-se ainda, outro componente em segundo lugar o ácido fítico com 76%, seguido de sódio com 56,00%.

Tabela 4- Composição centesimal da raiz e casca de mandioca (*Manihot esculenta*)

Componentes da raiz	%	Componentes da casca	%
Umidade	71,5	Matéria seca	mg/Kg
Matéria seca		Manganês	12,00
Proteína bruta	0,43	Ferro	18,00
Carboidrato	94,10	Cobre	8,40
Cinza	2,40	Boro	3,30
Minerais da cinza g/Kg	7,20	Zinco	24,00
Nitrogênio	0,84	Molibdênio	0,90
Fósforo	0,15	Alumínio	19,00
Potássio	1,38	outros	-
Cálcio	0,13	Oxalato	0,32
Magnésio	0,04	HCN	38,00
		(mg/100g)	
Sódio	56,00	Ácido fítico	76,00

Fonte: Oke [29]

No nordeste do Brasil, a mandioca é processada em pequenas unidades fabris, as chamadas “casas de farinha”, situada nas aldeias indígenas, comunidades e associações. Os equipamentos são primitivos e, em sua maioria, fabricados à mão, no próprio meio rural. Todos os membros da família trabalham na “desmancha” e a força humana ainda é largamente utilizada, embora já existam muitas unidades que dispõem de motores a explosão (SCHOLZ, 1971). O uso das cascas de farinha é antigo, desde o período dos índios, e até hoje ainda se mantém viva, nas comunidades rurais menos favorecidas, onde, no Brasil Colonial, a mandioca era transformada em farinha. Na biotransformação para a biomassa é composta por celulose, hemicelulose, lignina, extrativos, cinzas e outros componentes menos representativos (LIMA, 2013; DA COSTA et al.; 2020), numa estrutura vegetal cristalina altamente estável que deve ser rompida, a partir de pré-tratamento a fim de disponibilizar celulose e hemicelulose (DIAS et al, 2013).

Em muitos locais, a transformação da raiz da mandioca ainda é processada por métodos primitivos, herdados tradicionalmente dos índios, primeiros cultivadores dessa espécie, onde a casca da mandioca é descartada sem nenhum aproveitamento. (BEZERRA, 2006).

3.4.3.1 Danos ambientais causados por mandioca (*Manihot esculenta*)

A mandioca por prensagem produz um líquido denominado de manipueira que em tupi-guarani significa “o que brota da mandioca”, apresentado grande impacto ambiental, com elevada toxicidade, devido à presença de glicosídeo característico da planta de mandioca (laminarina), presente em todas as partes da planta e que por hidrólise origina a glicose, acetona e o ácido cianídrico (BRANCO, 1979).

Segundo HESS (1962) uma tonelada de mandioca produz cerca de 300L de manipueira e uma tonelada de raízes de mandioca/dia equivale à poluição ocasionada por 200-300 habitantes/dia.

Recentemente, estudos realizados em processos biotecnológicos demonstraram o potencial de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 e *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266, na bioconversão de manipueira na produção de biomassa e síntese de quitosana (SOUZA et al., 2020).

REFERÊNCIAS

ABDUH, MY; MANURUNG, R; FAUSTINA, A; AFFANDA, E; SIREGAR, IRH. Bioconversion of *Pandanus tectorius* using black soldier fly larvae for the production for the production of edible oil and protein-rich biomass. *Journal of Entomology and Zoology Study*, n.5, p .803–809, 2017.

ABE A., ASANO K., SONE T., 2010 Taxonomia baseada em filogenia molecular do gênero *Rhizopus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 74: 1325 - 1331.

ADJEBENG-DANQUAH, J.; SAFO-KANTANKA, O. Genetic variation in foliage and protein yield of some elite cassava (*Manihot esculenta crantz*) genotypes in Ghana. *Journal of Plant Breeding and Genetics*, v.1, p.46-55, 2013.

ARAÚJO, R.S.; SOUZA, K.R.S.; SOUZA, F.C.B.; OLIVEIRA, A.C.; DOURADO, L.R.B.; GUIMARÃES, S.E.F.; ARAÚJO, A.C. Efeito da suplementação de glicerina na expressão de genes antioxidantes e mitocondriais em frangos de corte. *Ciência da Produção Animal*. v. 59, n. 3, p. 408-415, 201.

BANAT, I.M.; SATPUTE, S.K.; CAMEOTRA, S.S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N.V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 697-708, 2014.

BARRETO, M. T. L.; MAGALHÃES, A. G.; ROLIM, M. M.; PEDROSA, E. M. R.; DUARTE, A. S.; TAVARES, U. E. Desenvolvimento e acúmulo de macronutrientes em plantas de milho biofertilizadas com manipueira. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 18, n. 5, p. 487-494, 2014.

BARDHAN, GUPTA, K., KISHOR, S., CHATTOPADHYAY, P., CHALIHA, C., KALITA, E., ... & MANDAL, M. Leveduras oleaginosas isoladas de alimentos e bebidas fermentados tradicionais de Manipur e Mizoram, na Índia, como uma fonte potente de lipídios microbianos para a produção de biodiesel. *Annals of Microbiology* , v. 70, n. 1, p. 1-14, 2020.

BEATRIZ A, ARAÚJO YJK, LIMA DP. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estéreo seletivas. *Quim Nova*.v.34, p.306–319, 2011..

BEZERRA, Valéria Saldanha. Farinhas de mandioca seca e mista. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológica, 2006. 44p.

BRANCO, S.M. Investigation on biological stabilization of toxic wastes from manioc processing. Programme Water Technology, v. 11, f. 6, p. 51-4, 1979.

BRITO, V. H. S.; SILVA, E. C.; CEREDA, M. P. Digestibilidade do amido in vitro e valor calórico dos grupos de farinhas de mandioca brasileiras. Brazilian Journal of Food Technology, v. 18, n. 3, p. 185-191, 2015.

DIAS M.O.S, JUNQUEIRA T.L, CAVALETT O, PAVANELLO L.G., CUNHA M.P., JESUS C.D.F., BONOMI A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. Applied Energy. 2013, v. 109:72-78, doi: 10.1016/j.apenergy.2013.

C.D.C.; NASCIMENTO, A.E.; OKADA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. Molecules, n.18, p. 10095-10107, 2013.

CARDOSO, C. E. L. Restrições à melhoria da competitividade da cadeia agroindustrial de fécula de mandioca. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA/CNPMP, 2004. (Documentos, 145), 59 p.

DA COSTA LIMA, M.; MENDES, S. C. D. C.; DE SOUZA, A. F.; LUNA, M. A. C.; ANDRADE, R. F. S.; DA SILVA, C. A. A.; OKADA, K. Produção simultânea de biomassa e lipídeos utilizando meios contendo resíduos agroindustriais por *Mucor subtilissimus* Ucp/Wfcc 1262, *Cunninghamella schinulata* Ucp/Wfcc 1299 e *Rhizopus microsporus* Ucp/Wfcc 1304 isolados do solo da caatinga de Pernambuco. Engevista, v. 19, n. 5, p. 1417-1430, 2017.

DA COSTA LOUREIRO, A., SOARES, J. V. S., DA SILVA CHAAR, J., DE FREITAS HIDALGO, A., SOUZA, L. D. S. S., & PEREIRA, A. M. Avaliação do potencial dos resíduos (casca, entrecasca e pontas) do beneficiamento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) para a produção de bioetanol utilizando hidrólise ácida/Evaluation of the waste potential (peel, bark and bridges) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) processing for bioethanol production using acid hydrolysis. Brazilian Applied Science Review, v. 4, n. 2, p. 606-620, 2020.

DE OLIVEIRA, J. N. D.; DA ROSA, L. C. Modelagem de processos IDEF: modelo descritivo da cadeia produtiva do biodiesel. *Revista Gestão Industrial*, v. 6, n. 2, 2010.

DEMIR, M.; TURHAN, I.; KUCUKCETIN, A.; ALPKENT. Produção de petróleo por *Mortierella isabelina* a partir do soro tratado com lactase. *Tecnologia Bioresource*, v.128, p.365-369,2013.

DOLATABADI S., SCHERLACH K., FIGGE M., HERTWECK C., DIJKSTERHUIS J., et al., 2016 Preparação de alimentos com fungos mucoraleanos: um potencial problema de biossegurança? *Biol fungoso*. 120 : 393 - 401

DUARTE, A.; SILVA, Ê. F. F.; ROLIM, M. M.; FERREIRA, R. F. A. L.; MALHEIROS, S. M. M.; ALBUQUERQUE, F. S. Uso de diferentes doses de manípueira na cultura da alface em substituição à adubação mineral. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 16, n. 3, p. 262-267, 2012.

ECONOMOU, CH.N.; ANGGELIS, G.; PAVLOU, S.; VAYENAS, D.V. Produção de petróleo a partir de uma única célula casca de arroz hidrolisado. *Bioresource Technology*, v.102, p.9737-9742, 2011.

ELINDERF; LIIN S. I. Actions and mechanisms of polyunsaturated fatty acids on voltage-gated ion channels. *Frontiers in Physio.*, v8, p. 1-4, 2017.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200. 2016.

GRYGANSKYI, A. P., GOLAN, J., DOLATABADI, S., MONDO, S., ROBB, S., IDNURM, A., ... & GAJDECZKA, M. T. (2018). Phylogenetic and phylogenomic definition of *Rhizopus* species. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(6), 2007-2018.

HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Compreendendo a diversidade da composição lipídica da membrana. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 5, p. 281, 2018.

IBGE. DPE/COAGRO. LSPA: janeiro de 2015: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: pesquisa acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201->

levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=o-que-e> Acesso em 13 de novembro de 2019.

IEES OUT LOOK. Prospects and Challenges until 2050. Energy, Environment and Economy. 2018, 24 p. Capturado em: <http://eneken.ieej.or.jp/data/7577.pdf>. Acessado em 19 de junho de 2019.

INNES, J. K.; CALDER, P. C. Ácidos graxos ômega-6 e inflamação. Prostaglandinas, Leucotrienos e Ácidos Graxos Essenciais, v. 132, p. 41-48, 2018.

INUI T., TAKEDA Y., IIZUKA H., 1965 Estudos taxonômicos no gênero *Rhizopus*. J. Gen. Appl. Microbiol. 11: 1 - 121.

KOSA G.; ZIMMERMANN, B.; KOHLER, A. et al., High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low and high-value lipids. Biotechnol Biofuels v.11, n.66, p1-17, 2018.

LEE J. M.; LEE H.; KANG S.; PARK W. J. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. Nutrients. v. 8, p. 23-30, 2016.

LIMA, D.X.; VOIGT, K.; DE SOUZA, C.A.F.; DE OLIVEIRA, R.J.V., SOUZA-MOTTA, C.M.; SANTIAGO, A.L.C.M.D.A. Descrição de *Backusella constricta* sp. nov. (Mucorales, ex Zygomycota) da Mata Atlântica brasileira, incluindo uma chave para espécies de *Backusella*. Phytotax. Phytotaxa., v. 289, n.1, p. 59, 2016.

MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. Journal of Food Composition and Analysis, v. 20, n. 2, p. 125-132, 2007.

MANGAS-SÁNCHEZ, J; ADLERCREUTZ, P. Highly efficient enzymatic biodiesel production promoted by particle-induced emulsification. Biotechnology Biofuels. n. 8, p.58, 2015.

MEYER, V. Genetizing engineering of filamentous fungi – Progress obstacles and future trends. Biotechnology Advances, v.16, p.177-85, 2008.

MODESTO, E.C.; SANTOS, G.T.; VILELA, D.; SILVA, D.C.; FAUSTINO, J.O.; DETMANN, E.; ZAMBOM, M.A.; MARQUES, J.A. Caracterização químico-bromatológica da silagem do terço superior da rama de mandioca. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v.26, p.137-146, 2004.

MONTAGNAC, J.A.; DAVIS, C.R.; TANUMIHARDJO, S.A. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.8, p.181-194, 2009.

MUSZEWSKA A., PAWŁOWSKA J., KRZYŚCIAK P., 2014 *Biologia, sistemática e manifestações clínicas de infecções por Zygomycota*. *EUR. J. Clin. Microbiol. Infectar. Dis.* 33 : 1273 – 1287

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. USA. W. H. Freeman & Company, 2004.

OGAWA Y., TOKUMASU S., TUBAKI K., 2004 Um habitat original de moldes de tempeh. *Mycoscience* 45 : 271 – 276.

OKE, O.L., Cassava as food in Nigéria. *World Rev. Nutr. Dietetics*, v. 96, p.227-50, 1968.

OLOFSSON, J.; BARTA, Z.; BÖRJESSON, P.; WALLBERG, O. Integrating enzyme fermentation in lignocellulosic ethanol production: life-cycle assessment and techno-economic analysis. *Biotechnology Biofuels*, n.10, p. 51, 2017.

ORO, C.E.D, BONATO, M., Oliveira, J.V., TRES, M.V., MIGNONI, M.L., & DALLAGO, R.M. Uma nova abordagem para remoção de sais da glicerina bruta proveniente da unidade industrial de produção de biodiesel. *Jornal de Engenharia Química Ambiental*, v. 7, n. 1, p. 102883, 2019.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, n. 8, p. 1031-1051, 2011.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 4, p. 63, 2019.

PAPANIKOLAOU, S.; DIAMANTOUPPOULOU, P.; CHATZIFRAGIKOU, A.; PHILIPPOUSSIS, A.; ANGGELIS, G. Suitability of low-cost sugars as substrates of lipid production by the fungus *Tamnidium elegans*. *Energy Fuel*, v.24, p.4078-4086, 2010.

PATEL, A.; KARAGEORGOU, D.; ROVA, E. et al. An Overview of Potential Oleaginous Microorganisms and Their Role in Biodiesel and Omega-3 Fatty Acid-Based Industrie. *Microorganisms*, v. 8, p.2- 40, 2020.

PEITER, G. C., ALVES, H. J., SEQUINEL, R., BAUTITZ, I. R. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v. 5, n. 4, 2016.

PIDOPLICHKO N. M., MIL'KO A. A., 1971 Atlas de fungos mucoraleanos, Naukova Dumka Kiev (em russo). *Revista Processos Químicos / SENAI. Departamento Regional de Goiás - v.10, n.19 (jan/jun 2016). Goiânia: SENAI/ DR. Gerência de Educação Profissional / Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, 2016.*

POLI JS, LÜTZHOFT HH, KARAKASHEV DB, VALENTE P, ANGELIDAKI I. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Bioresource Technology*, v.151, p.388–391, 2014.

QIN, LEI.; LIU, L., ZENG, AP & WEI, D. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource technology*, v.245, p.1507-1519, 2017.

SAITO K., SAITO A., OHNISHI M., ODA Y., 2004 Diversidade genética em cepas de *Rhizopus oryzae*, conforme revelado pela sequência dos genes da lactato desidrogenase. *Arco. Microbiol.* 182: 30 – 36

SANTOS, E.R.; SILVA, M.C.F., SOUZA, P.M.; SILVA, A.C., PAIVA, S.C., ALBUQUERQUE, SATPUTE, S.K.; PŁAZA, G.A.; BANPURKAR, A.G. Biosurfactants' production from renewable natural resources: example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. *Management Systems Production Engineering.*, v.1, n. 25, p. 46-54, 2017.

SCHOLZ, H. K. B. W., Aspectos industriais da mandioca no Nordeste. Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil, 1971.

SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Mandioca: Análise da Conjuntura. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2019-12/Mandioca%202020.pdf. Acesso em: 16 de Jun. de 2020.

SILVA, A. C. B.da; ALVES, M. P. V.; AQUINO, D. T. de. A importância da produção da mandioca na comunidade do Castanho – Garanhuns, PE. Breves Contribuciones del Instituto de Estudios Geográficos, n. 22, p. 75-90, 2011.

SILVA, R.L.; SILVA, A.M.P. Bioenergia da biomassa residual: potencial energético da combustão da casca de arroz em Dourados-MS e região. Revista Brasileira de Energias Renováveis. v.5, p.91-105, 2016.

SINDHU, R., BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass an overview. Bioresource Technology. v.199, p.76-82, 2016.

SOUZA, A.F.; Galindo, H.M.; Lima, M.A.B.; Ribeaux ,D,R,; Rodríguez , D.M.; Andrade, R.F.S.; Gusmão, N.B.; Campos-Takaki, G.M.. Biotechnological Strategies for Chitosan Production by Mucoralean Strains and Dimorphism Using Renewable Substrates, International Journal Molecular Science, v, 21, p.4286, 2020.

STORCK, E. M.; ÖZBALCI, C.; EGGERT, U. S. Biologia celular lipídica: um foco em lipídios na divisão celular. Revisão Anual de Bioquímica, v. 87, p. 839-869, 2018.

TECNOLÓGICA, EMBRAPA INFORMAÇÃO. Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: polpa e suco de fruta. Brasília: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2003.

XU, F.; SUN, J.; KONDA, N.V.S.N.M.; SHI, J.; DUTTA, T.; SCOWN, C.D. Transforming biomass conversion with ionic liquids: process intensification and the development of a high-gravity one-pot process for the production of cellulosic ethanol. Energy Environmental Science, n.9, p.1042, 2016.

YAO, Q.; CHEN, H.; WANG, S.; TANG, X.; GU, Z.; ZANG, H.; CHEN, W. Uma estratégia eficiente para a triagem de fungos filamentosos oleaginosos poliinsaturados que produzem ácidos graxos. Revista de Métodos Microbiológicos, v. 158, p. 80-85, 2019.

YANG F, HANNA MA, SUN R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology Biofuels*, v. 5, p.13, 2012..

ZENG, J.; ZHENG, Y.; YU, X.; YOU, L.; GAO, D.; CHEN, S. A biomassa lignocelulósica como fonte de hidratos de carbono para produção de lipídio por *Mortierella isabellina*. *Tecnologia Bioresouse*, v.35, p.1906-1911, 2011.

ZIAEE, A.; ZIA, M.; BAYAT, M.; HASHEMI, J. Identificação de isolados de Mucorales do solo por métodos morfológicos e moleculares. *Micologia Médica Atual*, v. 2, n. 1, p. 13, 2016.

CAPÍTULO II

Artigo apresentado e publicado no Evento Internacional



QUÍMICA E MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIOMASSA OLEAGINOSA POR *Rhizopus arrhizus* UCP 1295 UTILIZANDO CENOURA DE DESCARTE COMO FONTE DE CARBONO ALTERNATIVA

Camila Freire Novaes ¹; Adriana Ferreira Souza ²; Isabela Natália da Silva Ferreira¹; Rosileide Fontenele da Silva Andrade ^{3,4}; Galba Maria de Campos-Takaki ⁴

¹ Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife-PE, Brasil, novaesmila@hotmail.com, isabelanatalia13@hotmail.com.

² Doutorado em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife-PE, Brasil, adrife.souza@gmail.com.

³ Programa Nacional de Pós-Doutorado PNPd-CAPEs, Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife-PE, Brasil, rosileide_fontenele@yahoo.com.br.

⁴ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife-PE, Brasil, galba_takaki@yahoo.com.br.

RESUMO

Apesar das vantagens apresentadas pelos lipídeos microbianos não são amplamente utilizados pelas indústrias devido ao alto custo de produção, associado à baixa produtividade e ao uso de substratos caros. Nesse sentido, é crescente o estudo por formas alternativas para obtenção dos lipídeos microbianos. A utilização de substratos agroindustriais é uma maneira de reduzir os custos de produção e valorizar a rica fonte de nutrientes presentes nesses substratos. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo explorar o potencial de produção de biomassa pelo fungo *Rhizopus arrhizus* UCP 1295 com aproveitamento na obtenção de lipídeos, utilizando cenoura descartada como fonte de carbono. A produção de biomassa fúngica ocorreu por fermentação submersa e um planejamento fatorial composto de 2³ foi realizado a fim de avaliar a influência das fontes de carbono na otimização do processo. Em seguida a biomassa foi extraída para avaliar as condições onde há maior produção de lipídeos. No ensaio 8 foi possível observar a maior produção de biomassa, 8,11 g/L. na biomassa fúngica, se obteve mais de 20% de lipídeo em todas as condições testadas, o que indica que o fungo é micro-organismo oleaginoso. Contudo, a maior produção se obteve na condição 1 (64,44%) com

2% de cenoura de descarte e 1% de petona, o que indica que a cenoura é uma fonte de carbono promissora para acumulação de lipídeos pelo fungo.

Palavras-chave: Lipídeos; fungos Mucorales; resíduos agroindustriais, Single Cell Oils

INTRODUÇÃO

A busca por fontes renováveis de energia aumentou nos últimos anos, devido ao uso incessante dos combustíveis fósseis que estão ficando escassos e à crescente poluição ambiental (ATHENAKI et al., 2018). Os óleos vegetais comestíveis e não comestíveis ricos em triacilgliceróis neutros (TAGs), são fontes convencionais como combustível alternativo, o biodiesel. No entanto, essa matéria-prima convencional, não irá suprir a alta demanda de biocombustíveis sem acarretar em valores decrescentes de vários produtos alimentícios (ATHENAKI et al., 2018; DIWAN et al., 2018). Portanto, a busca de fontes alternativas, renováveis e sustentáveis de matérias-primas oleaginosas torna-se imprescindível.

Neste contexto, existe um grande interesse na produção de óleos microbianos como alternativa promissora para a obtenção de biodiesel, podendo alcançar elevados níveis de lipídeos, independentemente de sazonalidade, clima e sem utilizar grandes extensões de terra (RATLEDGE, 2004; CERTIK et al., 2006). Diversos micro-organismos são capazes de acumular lipídeos, comumente denominados óleos de células simples (SCO, do inglês *single cell oils*), desempenhando papel fundamental na substituição do biodiesel vegetal (VICENTE et al., 2009; LIANG e JIANG, 2013). Tradicionalmente, os micro-organismos que podem acumular mais de 20% de lipídeos do seu peso seco, podendo chegar até 70% durante o período de estresse metabólico, são considerados micro-organismos oleaginosos (ROSSI et al., 2011; ZHENG et al., 2012; KOSA et al., 2018).

Por razões ambientais e econômicas, a obtenção de biocombustíveis a partir de biomassa microbiana é considerada uma possibilidade de integração dessas tecnologias nas plantas industriais atuais. Além disso, a produção destes micro-organismos não necessariamente compete com a produção de alimentos, visto que resíduos agroindustriais e substratos renováveis podem ser utilizados como fontes alternativas de carbono, reduzindo também o custo de produção (GÁLAN et al., 2019). Nesse sentido, os restos de frutas e legumes como cascas, sementes, e até mesmo descartes em feiras são restos de alimentos que contribuem para o aumento de resíduos sólidos urbanos no mundo, porém promissores devido aos altos valores de fontes de carbono e que podem ser explorados como substratos para a produção de biomassa lipídica (DIWAN et al., 2018).

Vários táxons de fungos da ordem Mucorales são relatados como oleaginosos, como representantes do gênero *Cunninghamella*, *Mucor* e *Rhizopus* (RATLEDGE, 2005; BHARATHIRAJA et al., 2017; KOSA et al., 2018), sendo promissores para a exploração para produção de biodiesel, aplicações farmacêuticas e cosméticas e aditivos alimentares (BHARATHIRAJA et al., 2017, ZININGA et al., 2019). *Rhizopus arrhizus* vem sendo utilizado desde a antiguidade na obtenção de condimentos e alimentos, salientando a grande importância econômica desse fungo, apesar de serem conhecidos como grandes patógenos oportunistas (DOLATABADI et al., 2015; LONDOÑO-HERNANDEZ et al., 2017. DOTIS et al., 2019). Dentre as mais recentes aplicações desses micro-organismos, estão citados na literatura a produção de enzimas pectinase, lipase (STRINSKA et al., 2017, ZHENG et al., 2017); ácido fumárico (LIU et al., 2017), produção de quitosana (BERGER et al., 2014; PAIVA, SOUZA, BATISTA, 2017) , biossurfactante (PELE et al., 2018) e lipídeos (GALÁN et al., 2019).

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar a produção de biomassa oleaginosa por *Rhizopus arrhizus* UCP 1549 utilizando cenoura de descarte como fonte alternativa de carbono.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e condições de manutenção

O fungo filamentosso *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 foi isolado de solos da Caatinga e foi depositado na Coleção de Culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco), e registrado no banco World Federation for Culture Collection (WFCC). Mantido a 5°C em ágar Sabouraud e repiques a cada três meses para manutenção da cultura.

Substratos de baixo custo

O substrato utilizado como fonte de carbono para obtenção da biomassa fúngica foi o resíduo de cenoura descartada, *Daucus carota* L. da família Apiaceae, obtida a partir do descarte de feira de produtos orgânicos, a cenoura foi triturada e adicionada ao meio in natura.

Preparação do inoculo

O fungo foi transferido para placas de Petri contendo o meio ágar Sabourad. As placas foram incubadas a 28°C, por 96 h. A suspensão de esporos foi preparada em água destilada estéril com esporos da cultura jovem numa concentração de 10^7 células/mL.

Condições de cultivo e obtenção de biomassa

O processo fermentativo para obtenção da biomassa fúngica foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo cenoura descartada, associado aos substratos extrato de levedura e peptona. O inóculo foi adicionado na proporção de 5% de uma suspensão esporíca de 10^7 células/mL de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295. Os frascos foram incubados a 28°C, sob agitação orbital de 200 rpm por 96 h. A biomassa foi obtida por centrifugação a 5.000g, filtrada, lavada e liofilizada. O teor de biomassa foi estabelecido em g/L.

Extração de lipídeos

A biomassa liofilizada (1,0 g) foi extraída com 20 vol. cada um de clorofórmio / metanol como misturas 2: 1, 1: 1 e 1: 2 (v / v). As culturas foram suspensas em clorofórmio / metanol (2: 1 v / v) e homogeneizadas durante 1 h. O extrato foi separado por centrifugação a $5000 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi seco até peso constante sob vácuo num dessecador (MANOCHA et al., 1980). A porcentagem de lipídios totais presentes na biomassa foi quantificada pelo método gravimétrico de acordo com a equação 1.

$$\text{Lípidos totais (\%)} = \frac{\text{Lipídeos}}{\text{Biomassa seca}} \times 100 \text{ equação (1)}$$

Avaliação da interferência dos substratos na produção de biomassa fúngica

Um planejamento fatorial completo 2^3 foi utilizado para avaliar os principais efeitos e interações das três variáveis independentes (cenoura de descarte, extrato de levedura e peptona) sobre o rendimento de biomassa como variável resposta. Cada variável independente foi investigada em três níveis, mínimo (-1), central (0) e máximo (+1), conforme a Tabela 1. Foram realizados 11 ensaios experimentais e os dados obtidos foram analisados pelo software Statistica®, versão 10.0 (StatSoft Inc., USA), testando a significância dos resultados ($p < 0,05$).

Tabela 1: Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial completo 2^3 para a produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus* UCP 1295.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Cenoura de descarte (% v/v)	2	4	6
Extrato de levedura (% v/v)	0	0,5	1

Peptona (% v/v)	1	2	3
-----------------	---	---	---

Fonte: Autor, 2019

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar das vantagens apresentadas pelos lipídeos microbianos não são amplamente utilizados pelas indústrias devido ao alto custo de produção, associado à baixa produtividade e ao uso de substratos caros (CHEIRSILP et al., 2013; SATARI & KARIMI, 2017). Uma possível estratégia para reduzir os custos da produção associados a obtenção de lipídeos microbianos é o uso de substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais ou de indústrias alimentícias, que geralmente contêm altos níveis de carboidratos ou lipídeos necessários para a biossíntese destas biomoléculas (VICENTE et al., 2009; CHEIRSILP et al., 2013;). Além disto, o uso de resíduos contribui para a redução da poluição ambiental e para a valorização econômica destes produtos (MAKKAR et al., 2011; MONTERO-RODRÍGUEZ et al., 2016).

Neste trabalho se avaliou a cenoura descartada de feira como fonte de carbono alternativa e de baixo custo para a produção de biomassa e lipídeos por *R. arrhizus* UCP 1295 e os resultados se mostram na Tabela 2.

Tabela 2: Planejamento fatorial completo 2^3 utilizado para a produção de biomassa e lipídeos por *Rhizopus arrhizus* UCP 1295.

Ensaio	Cenoura descartada (%)	Extrato levedura (%)	de Peptona (%)	Biomassa (g/L)	Lipídeos (%)
1	2	0	1	1,88	61,66
2	6	0	1	3,60	42,77
3	2	1	1	3,19	50,55
4	6	1	1	6,28	55,55
5	2	0	3	2,90	52,77
6	6	0	3	6,53	39,44
7	2	1	3	5,33	37,77
8	6	1	3	8,11	52,22
9	4	0,5	2	4,63	46,11

10	4	0,5	2	5,17	49,44
11	4	0,5	2	5,17	40,55

Fonte: Autor, 2019

De acordo aos resultados obtidos, se constatou a produção de biomassa em todas as condições testadas, evidenciando que a cenoura descartada constitui uma fonte de carbono apropriada para o crescimento do fungo. Contudo, o maior rendimento de biomassa (8,11 g/L) foi obtido na condição 8 do planejamento, utilizando as concentrações máximas de cada componente do meio. Esse resultado foi similar ou superior aos obtidos previamente por outros fungos da ordem Mucorales, utilizando diferentes substratos agroindustriais (Tabela 3).

Tabela 3: Produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus* UCP 1295 utilizando cenoura de descarte comparada com outros fungos da ordem Mucorales.

Micro-organismo	Substratos	Biomassa (g/L)	Referência
<i>R. arrhizus</i>	Manipueira e milhocina	8,80	BERGER et al. (2011)
<i>Cunninghamella elegans</i>	Manipueira e milhocina	5,67	BERGER et al. (2014)
<i>C. elegans</i>	Milhocina	7,54	OLIVEIRA et al. (2014)
<i>Mucor plumbeus</i> FRR 2412	Melaço de cana-de -açúcar	7,25	ZHANG et al. (2017)
<i>C. echinulata</i> UCP 1299	Milhocina, óleo de soja pós-fritura e resíduo de macarrão instantâneo	8,56	ANDRADE et al. (2018)
<i>R. arrhizus</i> UCP 1295	Cenoura de descarte	8,11	Este estudo

Fonte: Autor, 2019

Por outro lado, se comprovou a acumulação de lipídeos acima de 20% em todas as condições do planejamento, mostrando que *R. arrhizus* UCP 1295 é um micro-organismo oleaginoso com enorme potencial biotecnológico. A maior produção de lipídeos (61,66 %), se obteve na condição 1, no meio constituído por 2% de cenoura descartada e 1% de peptona. Este resultado foi superior aos alcançados por outros fungos da ordem Mucorales

referidos na literatura (Tabela 4), indicando que a cenoura descartada é um substrato promissório e de baixo custo para a produção de lipídeos microbianos.

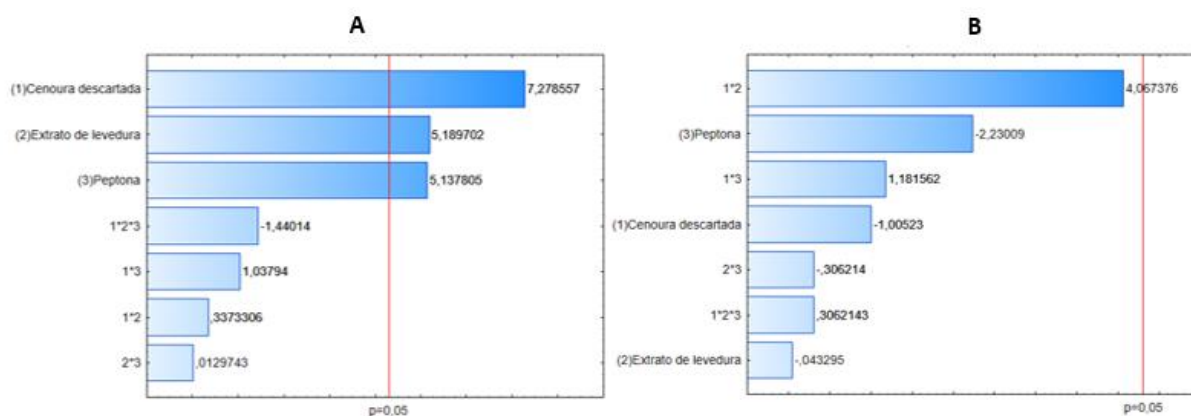
Tabela 4: Produção de lipídeos por representantes da ordem Mucorales utilizando diferentes substratos agroindustriais.

Micro-organismo	Substratos	Lipídeos (%)	Referência
<i>Rhizopus microsporus</i>	Milhocina, farelo de trigo e manipueira,	69	LIMA et al. (2015)
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411	Glicerol bruto	30,7	MOUSTOGIANNI et al. (2015)
<i>Mortierella ramanniana</i> MUCL 9235		32,9	
<i>C. echinulata</i> UCP 1299	Melaço de cana-de-açúcar e milhocina	49,96	LIMA et al. (2017)
<i>Mucor circinelloides</i>	Hidrolisado de bagaço de cana de açúcar	~25	CARVALHO et al. (2019)
<i>R. arrhizus</i> UCP 1295	Cenoura de descarte	61,66	Este estudo

Análise estatística

Se realizou a análise de variância (ANOVA) com os valores de biomassa obtidos, resultando em um elevado coeficiente de determinação ($R^2=0,96939$), demonstrando que o modelo matemático utilizado está de acordo aos dados experimentais. O diagrama de Pareto (Figura 1A) indicou que as três variáveis foram estatisticamente significativas sobre o rendimento de biomassa, quando analisados no nível de confiança de 95%.

Figura 1: Diagramas de Pareto obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2^3 para determinar a influência das variáveis independentes: cenoura descartada (1), extrato de levedura (2) e peptona (3) sobre as variáveis dependentes rendimento de biomassa (A) e lipídeos (B).



Por outro lado, os dados experimentais obtidos de porcentagem de lipídeos não foram estatisticamente significativos, quando analisados no nível de confiança de 95%. O diagrama de Pareto indicou que nem as variáveis testadas nem a interação dentre elas demonstraram efeito significativo sobre a concentração de lipídeos, nas concentrações utilizadas para cada nível. Assim, sugere-se que um outro planejamento fatorial seja desenhado, com novas concentrações de cenoura de descarte, extrato de levedura e peptona, para analisar a influência destes componentes do meio, uma vez que *R. arrhizus* UCP 1295 demonstrou seu potencial de produzir biomassa oleaginosa utilizando estes substratos (Tabela 2). O acúmulo de lipídios em micro-organismos oleaginosos é geralmente provocado pela falta de nutrientes, fósforo e especialmente nitrogênio, em relação à fonte de carbono, e/ou pela indução de condições ambientais adversas, pelo que estes fatores devem ser considerados (TANG et al., 2016; REIS et al., 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou o potencial biotecnológico de *R. arrhizus* UCP 1549 na produção de biomassa oleaginosa utilizando cenoura de descarte de feira como fonte de carbono alternativa e de baixo custo, tornando o processo mais econômico e competitivo para a indústria.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da FACEPE (APQ.0291-2.12/15), da CAPES e do CNPq (Processo No. 314422/2018-8).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATHENAKI, Maria et al. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of applied microbiology*, v. 124, n. 2, p. 336-367, 2018.
- BERGER, Lúcia et al. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 9082-9102, 2014.
- BHARATHIRAJA, B. et al. Microbial oil—a plausible alternate resource for food and fuel application. **Bioresource technology**, v. 233, p. 423-432, 2017.
- CHEIRSILP, B.; LOUHASAKUL, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 329-337, 2013.

- DIWAN, Batul; PARKHEY, Piyush; GUPTA, Pratima. From agro-industrial wastes to single cell oils: a step towards prospective biorefinery. **Folia microbiologica**, p. 1-22, 2018.
- DOLATABADI, Somayeh et al. Food preparation with potentially unsafe fungi: a new biosafety issue. **Mucorales between food and infection**, p. 151, 2015.
- DOTIS, John et al. Disseminated mucormycosis in an adolescent kidney transplant recipient. **Kidney international**, v. 95, n. 1, p. 236, 2019.
- GALÁN, Beatriz et al. Microbial Oils as Nutraceuticals and Animal Feeds. **Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids**, p. 1-45, 2019.
- KOSA, Gergely et al. High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low-and high-value lipids. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 66, 2018.
- LIMA, J. M. D. N. Potencial biotecnológico de amostras de *Rhizopus* na produção de lipídios e biossurfactante utilizando resíduos agroindustriais como substratos, 2015.
- LIMA, M. C. et al. Produção simultânea de biomassa e lipídeos utilizando meios contendo resíduos agroindustriais por *Mucor subtilissimus* ucp/wfcc 1262, *Cunninghamella echinulata* ucp/wfcc 1299 e *Rhizopus microsporus* ucp/wfcc 1304 isolados do solo da caatinga de Pernambuco. **Engevista**, v. 19, n. 5, p. 1417-1430, 2017.
- LIU, Huan et al. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9# on loofah fiber in a stirred-tank reactor. **Bioresource technology**, v. 244, p. 929-933, 2017.
- LONDOÑO-HERNÁNDEZ, Liliana et al. *Rhizopus oryzae*—Ancient microbial resource with importance in modern food industry. **International journal of food microbiology**, v. 257, p. 110-127, 2017.
- MONTERO-RODRÍGUEZ, Dayana, et al. Conversion of agroindustrial wastes by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 into lipids suitable for biodiesel production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49, p. 307-312, 2016.
- MOUSTOGIANNI, A, et al. Feasibility of raw glycerol conversion into single cell oil by zygomycetes under non-aseptic conditions. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 827-831, 2015.
- OCHSENREITHER, Katrin et al. Production strategies and applications of microbial single cell oils. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1539, 2016.

PAIVA, W. S.; SOUZA NO, F. E.; BATISTA, A. C. L. Characterization of polymeric biomaterial chitosan extracted from *Rhizopus stolonifer*. **Journal of Polymer Materials**, v. 34, n. 1, p. 115-121, 2017.

PATEL, Alok et al. Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 604-616, 2017.

PELE, Milagre A. et al. Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 150-157, 2018.

REIS, C E R., et al. Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context. **Critical reviews in biotechnology**, p. 1-16, 2019.

SATARI, B. & KARIMI, K. Mucoralean fungi for sustainable production of bioethanol and biologically active molecules. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 102, n. 3, p. 1097-1117, 2018.

STRINSKA, H. N. et al. Isolation and purification of lipase from *Rhizopus arrhizus* by ultrafiltration and fractional precipitation. **Bulgarian chemical communications**, v. 49, p. 137-143, 2017.

TANG X et al. Proteomics analysis of high lipid-producing strain *Mucor circinelloides* WJ11: an explanation for the mechanism of lipid accumulation at the proteomic level. **Microbial Cell Factories**, v.15, p. 15-35, 2016.

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

ZHENG, Yu-xi et al. Semi-continuous production of high-activity pectinases by immobilized *Rhizopus oryzae* using tobacco wastewater as substrate and their utilization in the hydrolysis of pectin-containing lignocellulosic biomass at high solid content. **Bioresource technology**, v. 241, p. 1138-1144, 2017.

Concomitant production of chitosan and lipids from a newly isolated *Mucor circinelloides* ZSKP for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 272, p. 545-551, 2019.

CAPÍTULO III



microorganisms

IMPACT FACTOR 4.152 ·

Qualis: B1

Uso de Caldo de Resíduo da Mandioca e Glicerol Bruto como Estratégias de Baixo Custo na Produção de Biomassa e Lipídios por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295

Camila Freire Novaes¹; Ana Paula Bione². Amanda Barbosa²; Rosileide Fontenele da Silva Andrade^{3A}; Galba Maria de Campos-Takaki^{4*}

¹ Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife-PE, Brasil, E.mail: novaesmila@hotmail.com.

² Doutorado da Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, E.mail: anapaulabione@hotmail.com; amanlins@hotmail.com

³ Programa Nacional de Pós-Doutorado PNPd-CAPES, Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife-PE, Brasil, rosileide_fontenele@yahoo.com.br

⁴ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife-PE, Brasil, galba_takaki@yahoo.com.br

* Correspondence: galba.takaki@yahoo.com.br.com; Tel.: (55 81 21194044 (G.M.C.T.) 50050-590 (Recife-PE, Brazil.)

Resumo

Estudos foram dirigidos para o desenvolvimento de um meio alternativo de produção de biomassa rica em lipídeos por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 isolado de solo da Caatinga, comparando os substratos caldo de cascas de mandioca *Manihot esculenta* (Crantz) oriunda da farinha de aldeia indígena da etnia Pankará e glicerol residual da produção de biodiesel, utilizados como fontes de carbono, mantendo a fonte de nitrogênio, em cultivo submerso. Os efeitos da indução das duas diferentes fontes de carbono na produção de biomassa e acumulação de lipídeos foram investigados empregando um planejamento factorial completo de 2³. Os resultados obtidos indicaram que o meio suplementado com o caldo de cascas de mandioca no ensaio 8 (6% de cascas de mandioca, 1% de extrato de levedura e 1% de peptona) apresentou maior produção de biomassa (12,92%), maior conteúdo de lipídeos na biomassa correspondendo a 393,02 mg/g e 30,0% de lipídeos totais. No ensaio 7 (2% de cascas de mandioca, 1% de extrato de levedura e 1% de peptona) demonstrou maior conteúdo de lipídeos totais correspondendo a 35,0%, porém menor conteúdo na biomassa (211mg/g). A estratégia de uso de glicerol bruto indicou o ensaio 6 (6% de glicerol bruto e 3% de peptona) com a maior produção de biomassa (22,10g/L), 699,60mg/g de biomassa é 31,64% de lipídeos. Os estudos realizados indicam o meio utilizando glicerol bruto como o mais eficiente e baixo custo, possibilitando valorização do glicerol bruto e ampla aplicabilidade industrial.

Palavras-chave: fungos filamentosos, resíduos agroindustriais, biomassa, alimentos

1. Introdução

A busca por fontes renováveis de energia para os meios de cultura aumentou nos últimos anos, devido ao uso crescente de combustíveis fósseis estão ficando escassos [1]. Os óleos vegetais comestíveis e não comestíveis ricos em triacilgliceróis neutros (TAGs), são fontes convencionais importantes para alimento, bem como para combustível alternativo, o biodiesel. No entanto, essa matéria-prima convencional, não irá suprir a alta demanda de biocombustíveis sem acarretar valores decrescentes de vários produtos alimentícios [2]. Portanto, a busca de fontes alternativas, renováveis e sustentáveis de matérias-primas oleaginosas torna-se imprescindível.

Neste contexto, existe um grande interesse na produção de óleos microbianos como alternativa promissora para a obtenção de biodiesel, podendo alcançar elevados níveis de lipídeos, independentemente de sazonalidade, clima e sem utilizar grandes extensões de terra [3, 4].

Diversos micro-organismos são capazes de acumular lipídeos, comumente denominados óleos de células simples (SCO, do inglês single cell oils), desempenhando papel fundamental na substituição do biodiesel vegetal [5, 6]. Tradicionalmente, os micro-organismos que podem acumular mais de 20% de lipídeos do seu peso seco, podendo chegar até 70% durante o período de estresse metabólico, são considerados micro-organismos oleaginosos [7,8,9].

Por razões ambientais e econômicas, a obtenção de biocombustíveis a partir de biomassa microbiana é considerada uma possibilidade de integração dessas tecnologias nas plantas industriais atuais. Além disso, a produção destes micro-organismos não necessariamente compete com a produção de alimentos, visto que resíduos agroindustriais e substratos renováveis podem ser utilizados como fontes alternativas de carbono, reduzindo também o custo de produção. Neste sentido, os resíduos de frutas e legumes, como cascas, sementes, e até mesmo descartes de alimentos contribuem para o aumento de resíduos sólidos urbanos no mundo, porém são subprodutos promissores que podem ser explorados como substratos para a produção de biomassa lipídica, considerando os elevados valores de fontes tradicionais [11].

Vários táxons de fungos da ordem Mucorales são considerados oleaginosos, como espécies dos gêneros *Cunninghamella*, *Mucor* e *Rhizopus* [3, 9,12], sendo promissores para produção de biodiesel, aplicações farmacêuticas, cosméticas e aditivos alimentares [13].

Rhizopus arrhizus vem sendo utilizado desde a antiguidade na obtenção de condimentos e alimentos de grande importância econômica, apesar de ser conhecido como patógeno oportunista [14,15,16]. Dentre as mais recentes aplicações de *R. arrhizus* são citados na literatura a produção da enzima pectinase e lipase [17, 18], ácido fumárico [19], produção de quitosana[20,21], biossurfactante [22] e lipídeos [23,24].

Neste sentido, investigações comparativas foram realizadas avaliando o potencial biotecnológico de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 na utilização de subprodutos de cascas de mandioca e glicerol bruto, como fontes de carbono para produção de biomassa e síntese de lipídeos em fermentação submersa.

2. Materiais e Métodos

2.1 Micro-organismo e manutenção

O fungo filamentoso *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 foi obtido da solos da Caatinga e foi depositado na Coleção de Culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco), e registrado no banco World Federation for Culture Collection (WFCC).

Mantido a 5°C em ágar Sabouraud e repiques a cada três meses foram realizados para manutenção da cultura.

2.2 Produtos químicos e substratos alternativos

Os componentes utilizados como fonte de nitrogênio no meio de cultura foram extrato de levedura e peptona universal da Merck, suplementado com o caldo de cascas da mandioca, de acordo com o desenho experimental.

O substrato utilizado como fonte de carbono para obtenção de biomassa e lipídios foi a casca, entrecasca e ponta transformada em caldo extraído de mandioca, *Manihot esculenta* Crantz da família Euphorbiaceae, obtida a partir do descarte de farinha de uma aldeia indígena (etnia Pankará), em Carnaubeira da Penha, sertão Pernambucano, Brasil.

2.3 Condições de preparo do caldo da casca de mandioca

Para obtenção do caldo 100 g da casca, entrecasca e ponta a mandioca seca a 38° C, em seguida triturada, peneirada para partículas da casca (32 Mesh). As cascas trituradas foram colocadas em Erlenmeyer com 1.000mL de capacidade contendo 500mL de água destilada em seguida foi levado a autoclave em vapor fluente por 15 minutos. Após filtração em filtro de papel Whatman o filtrado foi utilizado na preparação do meio de cultura. As concentrações de água e o caldo da casca de mandioca foram aplicados de acordo com o planejamento fatorial de 2³.

2.4 Condições de cultivo: Produção de biomassa

O pré-inóculo foi realizado transferrindo *R. arrhizuz* var. *arrhizus* UCP 1295 para placas de Petri contendo o meio ágar Sabouraud, incubadas a 28°C, por 96 h. A suspensão de esporos foi preparada em água destilada estéril com esporos da cultura jovem na concentração de 10⁷ células/mL.

O processo fermentativo para obtenção da biomassa fúngica foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 4% de fonte de carbono (caldo da casca da mandioca), associado ao extrato de levedura (0,5%) e peptona (2%) conforme o planejamento fatorial. O inóculo foi adicionado na proporção de 5% de uma suspensão esporíca de 10⁷ células/mL do fungo. Os frascos foram incubados a 28°C, mantidos sob agitação orbital de 200 rpm por 96 h. A biomassa foi obtida por centrifugação a 5.000g, filtrada em papel Whatman, lavada e liofilizada. O teor de biomassa foi determinado por gravimetria e expresso em g/L.

2.5 Extração de lipídeos totais

A biomassa liofilizada foi submetida a extração de lipídeos pelo método de Manocha et al., [25]. Cerca de 1,0 g da biomassa liofilizada foi submetida ao tratamento com 20 volumes dos sistemas de solventes clorofórmio / metanol, com proporções 2: 1, 1: 1 e 1: 2 (v/v). Cada tratamento biomassa e sistema de solvente foi submetido a agitação de 150 rpm por 1 h. O extrato foi obtido por centrifugação a 5000 × g por 10 min. Ao final os sobrenadantes foram reunidos, seco por evaporação e mantidos à vácuo em dessecador até peso constante. A porcentagem de lipídeos totais presentes na biomassa foi determinada por gravimetria, e calculado de acordo com a equação 1.

Lípídeos totais (%) = Lipídeos/(Biomassa seca) x 100 equação (1)

2.6 Avaliação da interferência dos substratos na produção de biomassa e de lipídeos totais

Um planejamento fatorial completo 2^3 foi utilizado para avaliar os principais efeitos e interações das três variáveis independentes (caldo da casca de mandioca, extrato de levedura e peptona), sobre o rendimento de biomassa e do teor de lipídeos como variáveis respostas. Cada variável independente foi investigada em três níveis, mínimo (-1), central (0) e máximo (+1), conforme a Tabela 1. Foram realizados 12 ensaios experimentais e os dados obtidos foram analisados pelo software Statistica®, versão 10.0 (StatSoft Inc., USA) [26], testando a significância dos resultados ($p < 0,05$).

Tabela 1: Variáveis e níveis avaliados no planejamento fatorial completo 2^3 para a produção de biomassa por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Caldo da Casca de Mandioca de descarte (% , p/v)	2	4	6
Extrato de levedura (% , p/v)	0	0,5	1
Peptona (% , /v)	1	2	3

3. Resultados e Discussão

3.1 Cascas de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma cultura de alimentos básicos em muitas áreas dos trópicos, principalmente na região Nordeste do Brasil. O processamento da mandioca para obtenção de amido envolve várias operações unitárias: lavagem, ralagem, moagem, peneiração, descoloração, prensagem e secagem. Na produção de amido é utilizado grandes volumes de água, resultando na descarga de grandes quantidades de água residual.

3.3 Utilização de cascas de mandioca na produção de biomassa e lipídeos totais por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295

Os estudos realizados com o desenvolvimento de um meio de produção de biomassa e lipídeos totais por *R. arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 está baseado no uso de caldo da casca de mandioca descartada, como fonte de carbono, associado aos constituintes extrato de levedura e peptona, como fonte de nitrogênio, visando um meio de alternativo e de baixo custo. Os resultados do planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 2.

Conforme os resultados apresentados é possível observar que houve produção de biomassa em todas as condições testadas, indicando que o caldo de cascas da mandioca do descarte constitui uma fonte de carbono promissora para o crescimento do fungo filamentosso *R. arhizus* var. *arrhizus* UCP 1295. O maior rendimento de biomassa (12,92 g/L) foi observado na condição 8 do planejamento, contendo 6 % de caldo de cascas de

mandioca, 1% de extrato de levedura e 3 % de peptona. No entanto, a maior produção total de lipídeos totais foi observada no ensaio 7 (contendo 2 % de caldo de cascas de mandioca, 1% de extrato de levedura e 3 % de peptona). Contudo, quando o conteúdo de lipídeos é expresso em gramas de biomassa, o ensaio 8, corresponde a 39,30 % w/w. Assim, o ensaio 7 apresentou um conteúdo menor em lipídeos totais (21,20% w/w).

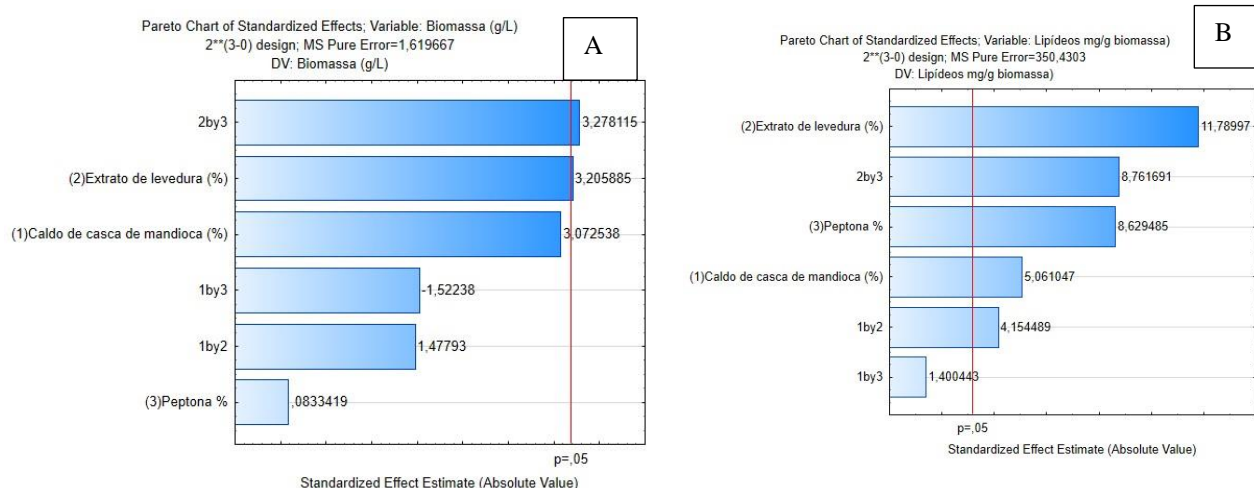
Tabela 2. Planejamento fatorial completo 2^3 utilizando caldo de cascas de Mandioca (*Manihot esculenta*) na produção de biomassa e lipídeos por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295.

Ensaio	Cascas de mandioca (%)	Extrato de levedura (%)	Peptona (%)	Biomassa (g/L ⁻¹)	Lipídeos (mg/g biomassa)	Lipídeos (%)
1	2	0	1	2,97	1,45	4,89
2	6	0	1	10,00	4,92	4,92
3	2	1	1	5,80	4,83	7,04
4	6	1	1	7,04	10,31	14,64
5	2	0	3	5,69	3,55	6,23
6	6	0	3	1,53	2,50	16,19
7	2	1	3	5,97	21,20	35,39
8	6	1	3	12,92	39,30	30,42
9	4	0,5	2	6,66	9,00	13,51
10	4	0,5	2	5,17	7,00	13,46
11	4	0,5	2	7,13	9,63	13,51
12	4	0,5	2	8,24	11,50	13,96

Os substratos são considerados um dos maiores entraves industriais na produção de biomoléculas ativas, como observado na produção dos lipídeos microbianos, dificultando a sua utilização pelas indústrias, devido principalmente, à baixa produtividade e aos substratos convencionais onerosos [30, 31,32].

Para confirmação estatística foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com os valores de biomassa obtidos, resultando em um elevado coeficiente de determinação ($R^2=0,96939$), demonstrando que o modelo matemático utilizado está de acordo aos dados experimentais. O diagrama de Pareto (Figura 1A) indicou que as três variáveis foram estatisticamente significativas sobre o rendimento de biomassa, quando analisados no nível de confiança de 95%.

Figura 1: Diagramas de Pareto obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2^3 para determinar a influência das variáveis independentes: cascas de mandioca (1), extrato de levedura (2) e peptona (3) sobre as variáveis dependentes rendimento de biomassa (A) e lipídeos totais(B)(Figura 1B).



Os resultados obtidos foram superiores aos alcançados por outros fungos filamentosos como o *Mortierella isabellina* utilizando como substrato agroindustrial e fonte de carbono e nitrogênio amido solúvel, extrato de levedura e peptona, respectivamente, ocorrendo produção de lipídios totais de 29,61% [38] (YAO et al. 2019).

Neste contexto, uma possível estratégia para a redução dos custos da produção na obtenção de biomassa e acumulação de lipídeos microbianos, vem sendo o uso de substratos alternativos, sendo indicado os resíduos agroindustriais ou de indústrias alimentícias, que geralmente contêm elevados conteúdos de carboidratos ou substratos necessários para a biossíntese das biomoléculas bioativas [30,33]. Além disto, os resultados com o uso de cascas de mandioca confirmam [34, 35, 36,37], uso eficiente dos resíduos na redução da poluição ambiental possibilitando a valorização econômica desses substratos alternativos, além de minimizar os custos de produção.

3.4 Avaliação do uso do glicerol bruto na produção de biomassa e lipídeos totais por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295.

Na tabela 3 o resultado mais satisfatório de produção de lipídeos pelo fungo filamentoso por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 foi da condição 6 de acordo com o planejamento, onde tem 6% de glicerol residual, inexistente de extrato de levedura e 3% de peptona.

Tabela 3. Planejamento fatorial completo 2³ utilizando glicerol residual para a produção de biomassa e lipídeos por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295

Ensaio	Glicerol residual (%)	Extrato de levedura (%)	Peptona (%)	Biomassa (g/L)	Lipídeos (mg/g biomassa)	Lipídeos (%)
1	2	0	1	3,70	82,00	22,17
2	6	0		3,98	94,17	23,66
3	2	1	1	15,98	491,54	30,76
4	6	1	1	13,25	337,61	25,49
5	2	0	3	8,76	177,91	20,31
6	6	0	3	22,11	699,60	31,64
7	2	1	3	10,57	164,90	15,60
8	6	1	3	20,47	604,70	29,54
9	4	0,5	2	16,58	351,70	21,21
10	4	0,5	2	16,83	332,06	19,73
11	4	0,5	2	16,50	332,97	20,18
12	4	0,5	2	16,41	358,06	21,82

O emprego de substratos de baixo custo para a produção de lipídeos é de importância crucial para minimizar o custo, e ao mesmo tempo, remover o impacto negativo causado ao ambiente pela presença de resíduos altamente poluídos, que podem ser oriundos de diferentes atividades agroindustriais. Neste sentido, a utilização dessas matérias-primas, principalmente o glicerol bruto (subproduto de vários processos agroindustriais como o da produção de biodiesel), torna-se necessário alternativas para o seu uso considerando o excedente formado a partir do processo de transesterificação (Huang et al. 2013; Qin et al. 2017).

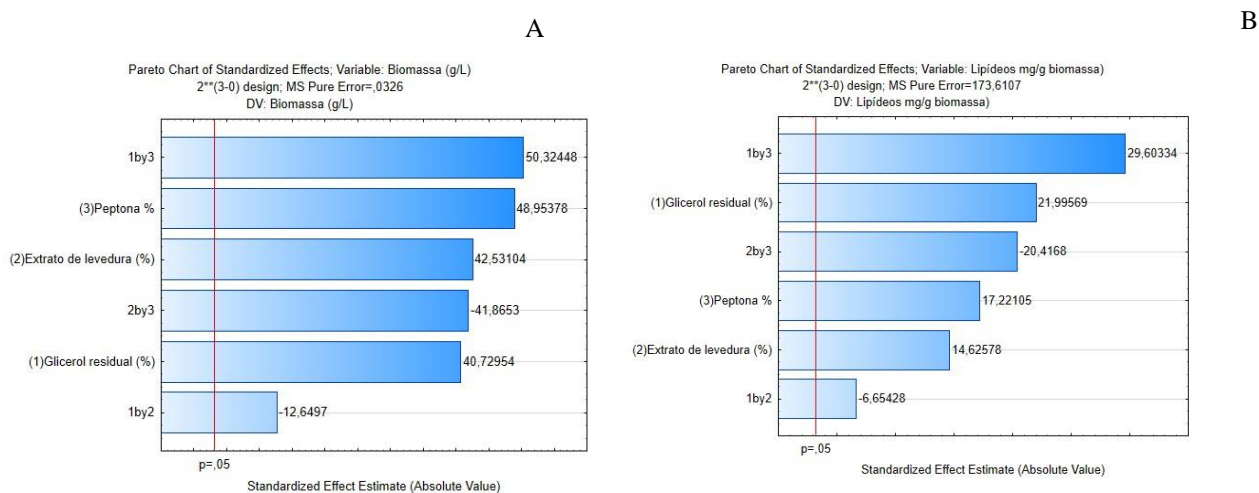
Neste contexto, o uso do glicerol bruto por *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 empregando um planejamento fatorial de 2^3 utilizando extrato de levedura e peptona demonstrou elevada produção de biomassa (22,11 g/L) no ensaio 6 (6% de glicerol e 3% de peptona), sendo observado também a acumulação de lipídeos (70,00% w/w), além de 31,64% de lipídeos totais.

A confirmação estatística dos resultados obtidos foi demonstrada pelo diagrama de Pareto, figura 2, indicando a excelente interação entre o glicerol e peptona nos níveis mais elevados e ausência do extrato de levedura. Por outro lado, o extrato de levedura quando presente no nível maior, associado a níveis mais elevados de glicerol e peptona induz a síntese de lipídeos.

Outro aspecto importante dos estudos com glicerol bruto, trata-se da exigência fisiológica de *R. arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 pelo excesso da fonte de carbono ou nitrogênio e a deficiência de algum outro nutriente, geralmente nitrogênio, como observado no ensaio 6. Durante essas condições utilizadas no Planejamento Fatorial é

possível que tenham ocorrido várias alterações fisiológicas e metabólicas na inibição de biomassa e ou de lipídeos, Segundo observações da literatura (Ratledge,1988, 2011, 2013; Bellou et al. 2012;n

Figura 2: Diagramas de Pareto obtidos a partir do planejamento fatorial completo 2^3 para determinar a influência das variáveis independentes: glicerol bruto (1), extrato de levedura (2) e peptona (3) sobre as variáveis dependentes rendimento de biomassa (A) e lipídeos totais(B).



Por outro lado, os dados experimentais obtidos por porcentagem de lipídeo total foram estatisticamente positivos, quando analisados no nível de confiança de 95%. O diagrama de Pareto indicou que as variáveis testadas houve interação entre elas e demonstraram efeito positivo sobre a concentração de lipídeos e biomassa utilizadas para cada nível. Assim, o planejamento fatorial com as concentrações de casca de mandioca de descarte, extrato de levedura e peptona, para analisar a influência destes componentes do meio, uma vez que *R. arrhizus* UCP 1295 demonstrou um alto potencial na produção biomassa oleaginoso utilizando estes substratos (Figura 2). O acúmulo de lipídios em micro-organismos oleaginosos é geralmente provocado pela falta de nutrientes, fósforo e especialmente nitrogênio, em relação à fonte de carbono, e/ou pela indução de condições ambientais adversas, pelo que estes fatores devem ser considerados (TANG et al., 2016; REIS et al., 2019).

4.Considerações Finais

Os Estudos realizados com *R. arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 investigando a produção de biomassa e lipídeos usando dois substratos caldo de cascas de mandioca e glicerol indicaram como meio alternativo o glicerol e a casca de mandioca, considerando a elevada produção de biomassa, com acumulação de SCO (single cell oil) de 70%, demonstrou ser um fungo oleaginoso e de elevado potencial biotecnológico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da FACEPE (APQ.0291-2.12/15), da CAPES e do CNPq (Processo No. 314422/2018-8).

Funding: Please add: “This research received no external funding” or “This research was funded by NAME OF FUNDER, grant number XXX” and “The APC was funded by XXX”. Check carefully that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at <https://search.crossref.org/funding>, any errors may affect your future funding.

Acknowledgments: In this section you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

Conflito de interesse: Os autores declaram que não existe conflito de interesse.

References

1. Athenaki, Maria et al. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of applied microbiology*, v. 124, n. 2, p. 336-367, 2018.
2. Diwan, Batul; Parkhey, Piyush; Gupta, Pratima. From agro-industrial wastes to single cell oils: a step towards prospective biorefinery. *Folia microbiologica*, p. 1-22, 2018
3. Ratledge, C. (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* **86**, 807– 815.;
4. Čertík, M. and Shimizu, S. (2003) Isolation and lipid analyses of subcellular fractions from the arachidonic acid producing fungus *Mortierella alpina* . *Biologia* 58, 1101– 1110.
5. Vicente, G et al. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, n. 1, p. 22-27, 2009
6. Liang, Y.N., Cui, Y., Trushenski, J. and Blackburn, J.W. (2010) Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresour Technol* 101, 7581– 7586.
7. Rossi, M., Kerga, E. T., Taisch, M., & Terzi, S. (2011). Proposal of a method to systematically identify wastes in New Product Development Process. In *Proceedings of the 2011 17th International Conference on Concurrent Enterprising (ICE 2011)* (pp. 1-9).
8. Zheng, Yu-xi et al. Semi-continuous production of high-activity pectinases by immobilized *Rhizopus oryzae* using tobacco wastewater as substrate and their utilization in the hydrolysis of pectin-containing lignocellulosic biomass at high solid content. *Bioresource technology*, v. 241, p. 1138-1144, 2017
9. Kosa, Gergely et al. High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low-and high-value lipids. *Biotechnology for biofuels*, v. 11, n. 1, p. 66, 2018.
10. Galán, Beatriz et al. Microbial Oils as Nutraceuticals and Animal Feeds. *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, p. 1-45, 2019
11. Shirahigue, L.D.; Sandra Regina Ceccato-Antonini,S.R. Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. *Cienc. Rural*, 50,4,1-17, 2020. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190857>

12. Bharathiraja, B., Sridharana, S., Sowmya, V., Yuvaraj, D. and Praveenkumar, R. (2017) Microbial oil – a plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresour Technol* **233**, 423– 432.
13. Zininga, T.; Puri, A.K.; Govender, A.; Suren Singh, S.; Permaul, K. Concomitant Production of Chitosan and Lipids From a Newly Isolated *Mucor Circinelloides* ZSKP for Biodiesel Production. *Bioresour Technol.* 2019 Jan; 272:545-551.
14. Dolatabadi, Somayeh et al. Food preparation with potentially unsafe fungi: a new biosafety issue. *Mucorales between food and infection*, p. 151, 2015.
15. Londoño-Hernández, Liliana et al. *Rhizopus oryzae*—Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International journal of food microbiology*, v. 257, p. 110-127, 2017.
16. Dotis, John et al. Disseminated mucormycosis in an adolescent kidney transplant recipient. ***Kidney international***, v. 95, n. 1, p. 236, 2019.
17. Strinska, H. N. et al. Isolation and purification of lipase from *Rhizopus arrhizus* by ultrafiltration and fractional precipitation. ***Bulgarian chemical communications***, v. 49, p. 137-143, 2017.
18. Zheng, Yu-xi et al. Semi-continuous production of high-activity pectinases by immobilized *Rhizopus oryzae* using tobacco wastewater as substrate and their utilization in the hydrolysis of pectin-containing lignocellulosic biomass at high solid content. ***Bioresource technology***, v. 241, p. 1138-1144, 2017.
19. Liu, Huan et al. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9# on loofah fiber in a stirred-tank reactor. ***Bioresource technology***, v. 244, p. 929-933, 2017.
20. Berger, Lúcia et al. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. ***International journal of molecular sciences***, v. 15, n. 5, p. 9082-9102, 2014
21. Paiva, W. S.; Souza No, F. E.; Batista, A. C. L. Characterization of polymeric biomaterial chitosan extracted from *Rhizopus stolonifer*. ***Journal of Polymer Materials***, v. 34, n. 1, p. 115-121, 2017
22. Pele, Milagre A. et al. Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil. ***African Journal of Biotechnology***, v. 17, n. 6, p. 150-157, 2018.
23. .Vieira,ACC; Chaves,L.L.;Pinheiro,S.; Pinto, S.; MarinaPinheiro, M.; Lima, S.C; Ferreira, D.;BrunoSarmiento, B.; Reis, S. Mucoadhesive chitosan-coated solid lipid nanoparticles for better management of tuberculosis. *International Journal of Pharmaceutics*, 536, 1, 478-485, 2018
24. Galán P, Kesse-Guyot E, Czernichow S, Briancon S, Blacher J, Hercberg S; SU.FOL.OM3 Collaborative Group. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial.*BMJ*. 2010; 341:c6273. doi: 10.1136/bmj.c6273
25. Deven, J. M. & Manocha, M. S. (1975). The effect of glutamic acid on the fatty acid and lipid composition of *Choanephora cucurbitarum*. *Canadian Journal of Microbiology* 21, 1827-1833
26. Branco, S.M. Investigation on biological stabilization of toxic wastes
27. from manioc processing. *Prog. Wat. Tecnhol.*, v. 11, f. 6, p. 51-4,1979.
28. Cheirsilp, B.; Louhasakul, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 329-337, 2013.

29. Satari, B. & Karimi, K. Mucoralean fungi for sustainable production of bioethanol and biologically active molecules. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 102, n. 3, p. 1097-1117, 2018
30. Tang, S.; Dong, Q.; Fang, Z.; Cong, Wen-jie; Zhang, H. Microbial lipid production from rice straw hydrolysates and recycled pretreated glycerol. *Bioresource Technology*, **2020**, *312*, 123580. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123580>
31. Vicente, G., Bautista, F., Rodríguez, R., Gutiérrez, F.J., Sádaba, I., Ruiz-Vázquez, M.R., Torres-Martínez, S. and Garre, V. (2009) Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochem Eng J* 48, 22– 27
32. Makkar, R.S.; Swaranjit S.; Cameotra, Ibrahim M Banat, *Advances in Utilization of Renewable Substrates for Biosurfactant Production. AMB Express*
33. . 2011 Mar 28;1(1):5. doi: 10.1186/2191-0855-1-5.
34. Montero-Rodríguez, Dayana, et al. Conversion of agro-industrial wastes by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 into lipids suitable for biodiesel production. *Chemical Engineering Transactions*, v. 49, p. 307-312, 2016.
35. Souza et al. 2020
36. Bellou, S., Moustogianni, A., Makri, A. and Aggelis, G. Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by *Zygomycetes* grown on glycerol. *App Biochem Biotechnol* 166, 146– 158, 2912.
37. Yao, Q. Q., Chen, H., Wang, S., Tang, X., Gu, Z., Zhang, H., ... & Chen, YQ . Uma estratégia eficiente para a triagem de fungos filamentosos oleaginosos poliinsaturados que produzem ácidos graxos do solo. *Revista de métodos microbiológicos* , v. 158, p. 80-85, 2019
38. Ratledge, C. (2013) Oils from microalgae: achievements and prospects. <http://bioprosp.com/programme/2013/oils-microalgae-achievements-and-prospects>
39. Ratledge, C. (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86, 807– 815.
40. Patel, Alok et al. Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 77, p. 604-616, 2017.
41. TANG X et al. Proteomics analysis of high lipid-producing strain *Mucor circinelloides* WJ11: an explanation for the mechanism of lipid accumulation at the proteomic level. *Microbial Cell Factories*, v.15, p. 15-35, 2016.
42. Reis, C E R., et al. Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context. *Critical reviews in biotechnology*, p. 1-16, 2019.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As investigações realizadas com a linhagem *R. arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 demonstraram que: Os substratos cenoura de descarte, cascas de mandioca e glicerol bruto podem ser usados como fontes renováveis de carbono; Produção de biomassa e lipídeos utilizando cenoura e caldo das cascas de mandioca indicam elevada produção de biomassa lipídica; O uso do glicerol bruto como fonte de carbono apresentou maior produção de biomassa quando comparado aos outros substratos cenoura e cascas de mandioca; Contudo a produção de lipídeos mais expressiva foi observada com glicerol bruto, possibilitando maior economia, considerando ausência de extrato de levedura; A linhagem de *R. arrhizus* var. *arrhizus* UCP 1295 demonstrou excelente potencial biotecnológico, e por fim, os estudos indicaram o desenvolvimento de novos meios de cultura eficientes e de baixo custo na produção de biomassa oleaginosa e de lipídeos totais.