



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

Rafael Kabroski Antunes

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDEOS
ISOLADOS DE *Penicillium spinulosum* UCP1347
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.**

Recife

2018

Rafael Kabroski Antunes

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDEOS
ISOLADOS DE *Penicillium spinulosum* UCP1347
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-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: Prof.^a Dra. Galba Maria Campos Takaki

Co-orientador: Prof. Dr. Hilário Jorge Bezerra de Lima Filho

Recife

2018

Kabroski Antunes, Rafael

Produção e caracterização de lipídeos isolados de *Penicillium spinulosum* UCP1347 utilizando resíduos agroindustriais / Rafael Kabroski Antunes; orientadora Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki e Co-orientador: Prof. Dr. Hilário Jorge Bezerra de Lima Filho ; Recife, 2018. 67p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2018.

1. Óleo microbiano 2. Fungo filamentoso 3. Substratos renováveis 4. Biodiesel I. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação-PROPESP. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais - PPGDPA.

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDEOS ISOLADOS DE
Penicillium spinulosum UCP1347 UTILIZANDO RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS.**

RAFAEL KABROSKI ANTUNES

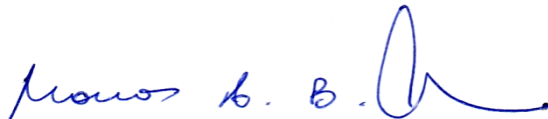
Examinadores:



Prof^ª. Dr^ª. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP



Prof^ª. Dr^ª. Luciana de Oliveira Franco (Titular externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE



Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa Lima (Titular Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Defendida em 8 de outubro de 2018.

Coordenadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

A Nossa maior fraqueza consiste em desistir.

A maneira mais segura de ter sucesso é sempre tentar mais uma vez.

Thomas Edison

Dedico

À minha família: meus pais, Antunes e Elisabeth.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antunes e Elisabeth que sempre me apoiaram em todas as decisões tomadas, e que sempre mostraram como perseverar diante das adversidades, afinal, fracos são os que desistem. Obrigado por serem pais acima da média, e, nesse momento, e agradeço por todo esforço e dedicação recebidos.

À minha namorada Isabela Bezerra, por toda a assistência, compreensão, carinho e amor.

À minha amiga de trabalho Nathalia de Sá, que me ajudou muito durante o Mestrado e nos trabalhos de laboratório, e no auxílio aos estudos realizados.

Ao meu grande amigo Hugo Maciel, que verdadeiramente é um irmão que a vida me deu.

A todos os amigos do NPCIAMB e do PPGDPA, pela amizade e apoio.

Aos meus orientadores Prof.^a Dr.^a Galba Maria de Campos Takaki e Prof. Dr. Hilário Jorge B. de Lima, por todo aprendizado, atenção, carinho, apoio, confiança e principalmente por todas as oportunidades que me foram concedidas. Sou infinitamente grato.

Ao Magnífico Reitor, Prof. Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S.J., pelo apoio na continuidade do Mestrado e uso dos laboratórios do NPCIAMB-UNICAP.

Agradeço aos Professores do mestrado e pelo suporte em todos os momentos.

À FACEPE e CNPq, pela disponibilização de recursos financeiros destinados à bolsa e para o desenvolvimento do projeto de Dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO I	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.2 Objetivos	12
1.2.1 Objetivo Geral	12
1.2.2 Objetivos Específicos	12
1.3 Revisão da Literatura	13
1.3.1 Biodiesel.....	13
1.3.2 Micro-organismos Oleaginosos.....	15
1.3.2.1 <i>Penicillium</i>	17
1.3.3 Lipídeos microbianos (Single Cell Oil)	18
1.3.3.1 Perfil de ácidos graxos da biomassa fúngica	19
1.3.4 Efeito da temperatura na acumulação de lipídeos.....	261
1.3.5 Tecnologias de extração de óleo de biomassa	272
1.3.5.1 Pré-tratamento para extração de lipídeos Erro! Indicador não definido.	23
1.3.5.2 Métodos de Extração de lipídeos com solventes	24
1.3.6 Substratos agroindustriais para produção de biomassa	216
1.3.6.1 Milhocina	Erro! Indicador não definido.26
1.3.6.2 Óleos residuais.....	228
1.4 Referências Bibliográficas.....	28
CAPÍTULO II	36

Efeitos da temperatura na conversão de resíduos agroindustriais para a produção de biomassa e acumulação de lipídeos por uma nova linhagem de <i>Penicillium spinulosum</i> UCP 1347	37
CAPÍTULO III	52
Considerações Gerais	53
ANEXOS	52
Journal Title.....	55

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Esquema representativo da reação geral de transesterificação do óleo de soja com álcool primário (metanol) produzindo biodiesel e glicerol como subproduto.....15

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Composição química de milhocina.	28
--	----

Capítulo II

Tabela 1. Produção de biomassa por <i>Penicillium spinulosum</i> cultivado meio residual contendo diferentes temperaturas comparados com os registros da literatura	445
--	-----

Tabela 2. Rendimento do teor de lipídeos totais obtido de <i>P. spinulosum</i> após cultivo em diferentes temperaturas, pré-tratamentos e métodos de extração,.....	456
--	-----

Tabela 3-A. Habilidade de <i>Penicillium spinulosum</i> na conversão de biomassa (g/L-1), acumulação de lipídeos (mg/g) sob diferentes temperaturas e lipídeos totais (%) com pré-tratamento por vórtex/agitação com solventes usando quatro metodologias	477
---	-----

Tabela 3-B. Habilidade de <i>Penicillium spinulosum</i> na conversão de biomassa (g/L-1), acumulação de lipídeos (mg/g) sob diferentes temperaturas e lipídeos totais (%) com pré-tratamento por ultrassom	477
---	-----

Tabela 4. Percentual dos ácidos graxos obtidos em diferente temperaturas da biomassa oleaginosa produzida por <i>P. spinulosum</i>	478
---	-----

Tabela 5. Viscosidade do lipídeo microbiano produzido por <i>Penicillium spinulosum</i> em meio constituído por milhocina (5%) e óleo de soja pós fritura (3%) nas diferentes temperaturas	489
---	-----

RESUMO

Micro-organismos oleaginosos são promissores considerando a acumulação de lipídios intracelulares em mais de 20% de sua biomassa seca, durante o crescimento. Neste sentido, investigações foram realizadas avaliando o potencial biotecnológico da nova linhagem de *Penicillium spinulosum* UCP1347 em acumular lipídeos utilizando o meio a base de sais, suplementado com óleo de soja pós-fritura e milhocina, como fontes de carbono e nitrogênio, mantido sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) por fermentação submersa. A maior produção de biomassa foi observada na temperatura de 20°C com rendimento de 19,9 g/L, seguido de 15,8 g/L a 25°C e 14,5 g/L a 30°C, respectivamente. Os lipídeos totais foram extraídos das biomassas previamente tratadas por sonicação e ou sonicação e agitação, seguido do uso de solventes orgânicos, de acordo com quatro metodologias baseadas em diferentes combinações de polaridades. Os resultados obtidos demonstraram que *P. spinulosum* apresentou conteúdo mais elevado de lipídeos para a biomassa tratada por sonicação seguido de agitação, pelo uso dos solventes clorofórmio: metanol (1:1, 1:2 e 2:1 v/v), correspondendo ao valor mais elevado a 25°C (67,80%), a 20°C (67,02%) e a 30°C (57,80%), respectivamente. E, a análise dos ácidos graxos por GCMS revelou maior conteúdo do ácido linoleico em todas as temperaturas testadas, destacando-se a temperatura de 25°C, seguido de 20°C e 30°C. A análise da influência da temperatura na viscosidade dos lipídeos indicou que a 30°C observou-se uma viscosidade 13,8 vezes mais elevada do que os lipídeos obtidos das biomassas produzidas a 20°C (0,95cP) e 25°C(0,92Cp), respectivamente. As alternativas tecnológicas promissoras demonstradas pela nova linhagem de *P. spinulosum* UCP1347 sugerem sua indicação como fungo oleaginoso, com potencial para produção de biodiesel, como também sugere possibilidades de uso como biolubrificantes.

Palavras-Chave: Fungo filamentoso, Substratos renováveis, Óleo celular, Biodiesel.

ABSTRACT

Oleaginous microorganisms are promising in the accumulation of intracellular lipids in more than 20% of their dry biomass weight during the growth period. In this sense, investigations were carried out evaluating the biotechnological potential of the new strain of *Penicillium spinulosum* UCP1347 in accumulating lipids using the salt-based medium, supplemented with post-frying soybean oil and corn steep liquor, as sources of carbon and nitrogen, under different temperatures (20°C, 25°C and 30°C) by submerged fermentation. The highest biomass production was observed at a temperature of 20°C with a yield of 19.9 g / L, followed by 15.8 g / L at 25°C and 14.5 g / L at 30°C, respectively. Total lipids were extracted from biomasses previously treated by sonication and / or sonication and agitation, followed by the use of organic solvents, according four methodologies based on different combinations of polarities. The results obtained showed that *P. spinulosum* had a higher content of lipids for the biomass treated by sonication followed by agitation, using the solvents chloroform: methanol (1: 1, 1: 2 and 2: 1 v / v), corresponding to highest value at 25°C (67.80%), 20°C (67.02%) and 30°C (57.80%), respectively. And, the analysis of fatty acids by GCMS revealed a higher content of linoleic acid at all temperatures tested, highlighting the temperature of 25°C, followed by 20°C and 30°C, respectively. The analysis of the influence of temperature on the viscosity of the lipids indicated that at 30°C a viscosity 13.8 times higher was observed than the lipids obtained from biomasses produced at 20 ° C (0.95cP) and 25 ° C (0 , 92Cp), respectively. The promising technological alternatives demonstrated by the new strain of *P. spinulosum* UCP1347 suggest its indication as an oleaginous fungus, with potential for biodiesel production, but also suggests possibilities for use as biolubricants.

Keywords: Filamentous fungus, Renewable substrates, Single Cell Oil, Biodiesel.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A busca de novas alternativas energéticas limpas, sustentáveis, facilmente acessíveis e favoráveis ao meio ambiente, fazem parte das investigações de vários pesquisadores, considerando as desvantagens ambientais e os problemas de saúde resultantes do uso de combustíveis fósseis (LANG et al., 2001; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014; GONG et al., 2018). Neste sentido, o biodiesel é renovável, compatível com os atuais motores a diesel e possibilita claros benefícios em relação ao diesel, incluindo biodegradação, toxicidade reduzida e baixo perfil de emissão (VICENTE; MARTINEZ; ARACIL, 2004; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2013; 2014; CELEBI e AYDIN, 2018).

O biodiesel vem sendo produzido a partir de óleos vegetais tais como: óleo de soja, palma e mamona. Recentemente, um grande número de estudos envolvendo a produção de biocombustíveis por micro-organismos vem sendo aumentado, com a finalidade de encontrar alternativas promissoras para a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais comestíveis (AHMAD et al., 2016).

A capacidade de acumular lipídeos de composição muito próxima a óleos vegetais vem sendo demonstrada por alguns micro-organismos, como bactérias e fungos, a partir do excesso de fonte de carbono e ou condições limitadas de nitrogênio (APPARAO; VIJAYALAKSHMI; RANJITHA, 2016; KHOT et al., 2018).

Por sua vez, a aplicação industrial dos óleos microbianos é limitada, considerando os elevados custos dos processos de fermentativos utilizados para obtenção de lipídeos. O custo elevado dos bioprocessos são devidos, principalmente, às fontes de carbono utilizadas para o crescimento dos micro-organismos oleaginosos, sendo responsável em grande parte por 30 a 40% dos custos na produção. A elevação dos custos para o cultivo de fungos oleaginosos é devido ao uso de fontes de carbono convencionais, tornando-se fundamental a busca, de substratos alternativos, como os resíduos agrícolas e industriais (LIANG; JIANG, 2013;; CARVALHO et al.,2015; KHOT et al., 2018).

Assim, a utilização de matérias-primas renováveis e de baixo custo se colocam como promissoras, principalmente, os resíduos lignocelulósicos provenientes da agroindústria. Por sua vez, o bagaço da cana-de-açúcar apresenta uma biomassa lignocelulósica amplamente disponível, sendo considerada uma matéria-prima importante para a produção de óleos microbianos (AHMAD et al., 2016).

Desta forma, a produção de lipídios baseada na acumulação em biomassa, apresenta-se como uma abordagem importante e de ampla aplicabilidade em diferentes

industrias como alimentos, produtos farmacêuticos e probióticos, entre outros. Portanto, os fungos oleaginosos vêm sendo sugeridos como matéria-prima, devido ao potencial promissor para uma indústria sustentável (ZINOVIEV, et al., 2010; PENG; CHEN, 2008; ZHAO, et al., 2011; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014; KHOT et al., 2018).

Vale ressaltar que de acordo com a Coherent Market Insights, o mercado global afirma a ampla aplicabilidade dos lipídeos na saúde, cujo mercado foi avaliado em 6,21 bilhões de dólares em 2016, e ao longo do período de 2017-2025. Assim, grande parte da produção de lipídeos poderá ser destinada a área da nutrição, bem como na redução das doenças crônicas, possibilitando condições favoráveis para o crescimento do mercado, fomentando em paralelo as pesquisas e investimentos.

Uma outra possível aplicação dos lipídeos microbianos vem sendo o seu uso como matéria-prima na produção de biodiesel, por ser este um óleo produzido a partir de fontes renováveis (DABDOUB et al., 2009; KIM et al., 2018). Portanto, as investigações propostas com *Penicillium spinulosum* na produção de lipídeos microbianos são justificadas, considerando o grande potencial de fungo filamentosos nos diversos setores, incluindo o de biocombustíveis segundo Magdum (2015), possibilitando o fornecimento de energia sustentável, sendo considerado um dos principais desafios que a humanidade enfrentará nas próximas décadas. Assim, a biomassa microbiana oleaginosa pode contribuir substancialmente para suprir a demanda futura de energia de maneira sustentável.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de acumulação de lipídeos por *Penicillium spinulosum* UCP 1347, utilizando resíduos agroindustriais como substratos, bem como a influência de diferentes temperaturas na produção, quantificação e caracterização de lipídeos, visando à minimização dos custos de produção e aplicabilidade futura.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento de *P. spinulosum* em milhocina e óleo de soja pós-fritura em uma base de sais, sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C);
- Investigar a acumulação de lipídeos por *P. spinulosum* em milhocina e óleo de soja pós-fritura, sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C);
- Realizar dois tratamentos prévios a biomassa obtida sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C);
- Extrair os lipídeos a partir das biomassas de *P. spinulosum* previamente tratadas empregando quatro métodos distintos;
- Quantificar e caracterizar os lipídeos produzidos por *P. spinulosum* em milhocina e óleo de soja pós-fritura sob diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C);
- Analisar os resultados obtidos e sugerir a sua aplicabilidade.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Biodiesel

No período atual, com a intensificação das atividades humanas e a alta demanda de energia, os problemas de poluição ambiental são cada vez mais frequentes devido ao consumo excessivo de combustíveis fósseis não renováveis como, por exemplo, petróleo, carvão e gás natural. Para aliviar a crise energética e reduzir a poluição ambiental, algumas soluções estão sendo realizadas para explorar e desenvolver combustíveis alternativos. O biodiesel, como um recurso energético alternativo potencial, tornou-se mais atrativo com os benefícios ambientais, a renovabilidade e as fontes brutas (HUANG et al., 2016). As matérias-primas tradicionais para a produção de biodiesel são óleos vegetais (que requerem muitas áreas para plantio) e gorduras animais (ciclos de crescimento longo e baixa produtividade), resultando numa concorrência com a indústria de alimentos (HUANG et al., 2016; ZHENG et al., 2017).

Nos últimos anos tem aumentado o número de estudos envolvendo a produção de biocombustíveis por via microbiana, a fim de encontrar alternativas para a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais comestíveis (AHMAD et al., 2016). O primeiro registro do termo biodiesel na literatura foi em 1980, foi popularizando-se a partir dessa data. Embora o termo tenha mais de décadas de utilização, a história da utilização de óleos vegetais e gorduras como matérias-primas para a produção de combustível se inicia no final do século XIX, com as pesquisas visando o uso de diferentes combustíveis em motores na indústria automobilística (SUAREZ e MENEGHETTI, 2007).

De acordo com a Legislação Federal, nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel é definido como “um combustível derivado de biomassa renovável para a utilização em motores de combustão interna por ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” (BRASIL, 2005, art. 6º). A produção pode ser realizada através de óleos vegetais, gorduras de origem animal, e até óleos e gorduras residuais (BORUGADDA; GOUD, 2012).

Além disso, o uso de biodiesel é ansiado pelo segmento econômico, visando reduzir a dependência do diesel importado ao mesmo tempo, que minimiza os danos ambientais e a redução dos gases geradores do efeito estufa. No Brasil, o Programa

Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) estrutura a cadeia produtiva e regula o mercado do biocombustível no Brasil. Destaca-se ainda o número de investimentos no setor do biodiesel no Brasil bem como nos Estados Unidos e Alemanha. (SUAREZ, 2013.)

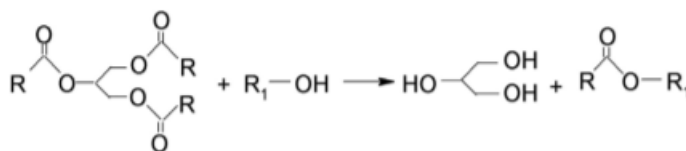
O biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e sua queima é mais limpa que o diesel (MOTHÉ, 2005). Sua constituição é uma mistura de ésteres etílicos ou metílicos extraídos de ácidos graxos, obtidos pela transesterificação de quaisquer triglicerídeos com álcool de cadeia curta (metanol ou etanol). Além disso, o biodiesel apresenta uma série de vantagens técnicas em relação ao diesel mineral: prolonga a vida do motor, apresenta melhor lubrificidade, baixo risco de explosão, biodegradável, e, é claro, a baixa emissão de gases poluentes durante sua queima. Entretanto, também apresenta suas desvantagens, possuindo maior viscosidade e alto custo para sua produção (MOTHÉ, 2005; DE PAULA SCAMILHE et al, 2016).

A produção de biodiesel a partir de plantas é bem consolidada no Brasil e no mundo, há mais de uma década, no entanto, as lacunas existentes no processo e em fontes alternativas continuam atraindo o interesse de vários setores, especialmente a indústria de biocombustíveis (CREMONEZ et al, 2015). Continua sendo um tema importante para a economia nacional que, ainda necessita de desenvolvimento de novas tecnologias quanto soluções para questões econômicas e sociais. (RICO et al, 2015). Neste sentido, atualmente, há necessidade de pesquisas para diversas finalidades: diversificar fontes de matéria-prima, incluindo renováveis ou óleos residuais, diminuir custos de produção, criar novas metodologias de produção, melhorar características físico-químicas, qualidade e consequente rendimento e emissões do motor (SHAHIR et al, 2015).

O processo de transesterificação em duas etapas (TDSP - Transesterification Double Step Process) utilizado neste estudo foi inicialmente desenvolvido por Samios et al.(2009) para produzir biodiesel metílico a partir de alguns óleos clássicos no Brasil como girassol e linhaça, por ser um método simples e rápido de síntese, que facilita o procedimento de separação dos produtos e resulta em ótima eficiência de conversão. Ao longo dos anos também vem sendo aprimorada desde a sua criação, resultando na aplicação para produção de biodiesel etílico também segundo Guzzato 2012, além de possibilitar o uso de outras fontes de matéria-prima, como banha, sebo e a reutilização de óleo de fritura por exemplo. No geral, independentemente das quantidades e

condições de reação utilizadas, o processo de produção segue um padrão estabelecido pelo método de transesterificação em duas etapas (TDSP).

Figura 1. Esquema representativo da reação geral de transesterificação do óleo de soja com álcool primário (metanol) produzindo biodiesel e glicerol como subproduto (RUSCHEL et al, 2016).



No entanto, os elevados custos das matérias-primas para a obtenção de biodiesel (óleos comestíveis), restringem muito a ampliação em larga escala da sua produção. Existe um consenso sobre o uso de fontes alimentícias na produção de biocombustíveis sendo considerada uma ameaça à segurança alimentar global. Portanto, torna-se necessário explorar novas matérias-primas que reduzam o preço do biodiesel sem competir com a produção de alimentos. (VICENTE, 2009; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014).

A produção de biodiesel a partir de óleos microbianos apresenta diversas vantagens em comparação aos óleos vegetais como, por exemplo, os ciclos de produção são mais curtos, possuem menor intensidade de mão-de-obra, maior escalabilidade e não dependem de sazonalidade (LIANG; JIANG, 2013; AHMAD et al., 2016). A produção de biodiesel por métodos tradicionais (óleos vegetais e gordura animal) não atende à demanda da taxa anual do consumo do biocombustível. Além disso, seu custo de produção por esses métodos convencionais é atribuído cerca de 70-85% do custo oriundo de óleos vegetais como matérias-primas, demonstrando modelos de economia circular (MOHAN et al., 2016).

Outros aspectos importante para investigar a nova linhagem de *Penicillium spinulosum* UCP1347, considerando que estudos aprofundados demonstram o potencial biotecnológico de fungosfilamentosos, principalmente, o gênero *Penicillium*, de acordo com a Tabela 1.

1.3.2 Micro-organismos Oleaginosos

Os fungos oleaginosos, apresentam como conteúdo lipídico entre 70% e 90%, sendo superior ao das bactérias contendo entre 20% e 50% (APPARAO; VIJAYALAKSHMI; RANJITHA, 2016). Entre outras fontes alternativas os fungos são considerados uma matéria prima atrativa devido à acumulação de lipídeos e a possível síntese de biodiesel. (RATLEDGE,1991; RATLEDGE, 2004; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014).

Uma alternativa que tem recebido destaque corresponde ao uso de lipídios microbianos, possíveis de serem utilizados como matéria-prima para este fim. Comparado com óleos vegetais e gordura animal, a produção de óleo microbiano não é afetada pela localização ou clima, devido a que sua produção pode ser conduzida em biorreatores de elevado volume por unidade de superfície em condições controladas (PEREZ-GARCIA et.al., 2011; CARVALHO et.al.,2015).

Desta maneira, a produção de biodiesel utilizando single cell oil (SCOs) tem recebido importância recentemente por ser um potencial fonte de energia renovável e compatível com o conceito das biorrefinarias (CARVALHO et al.,2015). O termo “single cell oil” foi cunhado com a intenção de denominar principalmente os triglicerídeos de micro-organismos, similares aos encontrados em óleos e gorduras provenientes de fontes animais e vegetais.

Os óleos microbianos, extraídos dos micro-organismos, como leveduras, microalgas, fungos e bactérias, são considerados como fontes de óleo mais limpas para a alta produtividade e menor tempo de cultivo (HUANG et al., 2016). Entre os diferentes micro-organismos oleaginosos, os fungos filamentosos são considerados como uma fonte atraente de óleos, os quais são matérias-primas promissoras para o biodiesel devido a uma série de vantagens: ciclo de vida curto, menor tempo de trabalho, menor espaço para cultivo, independe da sazonalidade, facilidade no escalonamento (WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011; HUANG et al., 2016).

Embora, os óleos provenientes de fungos filamentosos mostrem algumas vantagens para a produção de biodiesel, existem três obstáculos que restringem a alta produção de lipídeos (LEITE; ABDELAZIZ; HALLENBECK, 2013; HUANG et al., 2016). A primeira é uma cepa produtora de alto teor de óleo. A produção por fungos filamentosos pertence principalmente aos gêneros *Mortierella*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Mucor* e *Rhizopus* (HUANG et al., 2016). Entre eles, existem apenas cerca de 64 espécies, que possuem mais de 25% de teor de óleo; o maior percentual

foi para *Mortierella isabellina*, que armazena até 86% de sua biomassa como óleos, mas a maioria deles são de 20 a 25% (HUANG et al., 2016).

Assim, os lipídeos microbianos representam uma matéria-prima alternativa valiosa para a produção de biodiesel e uma solução potencial. O desenvolvimento de processos para produzir “*single cell oil*” (SCO) usando micro-organismos oleaginosos tem desencadeado uma atenção significativa. Considerando que os lipídeos, se apresentam principalmente na forma de triacilgliceróis (TAG). A ocorrência de TAG como compostos de reserva é generalizada entre todos os organismos eucarióticos como fungos, plantas e animais, e raramente foi descrito em bactérias (AZÓCAR,2010; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2013; MENG,2009; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014).

Os lipídeos microbianos são metabolitos secundários produzidos em condições de excesso de fonte de carbono ou condições limitadas de nitrogênio. Os lipídios são produzidos por todos os micro-organismos para uso em membranas e em outras estruturas celulares. Organismos que são capazes de acumular corpos lipídicos intracelulares em quantidades superiores a 20% do seu peso de seco são conhecidos como micro-organismos oleaginosos (LEIVA-CANDIA et al., 2015). Levedura, fungos e algumas bactérias têm a capacidade de acumular lipídeos considerando o excesso de fonte de carbono ou condições limitadas de nitrogênio, os quais possuem composição semelhante aos óleos vegetais (APPARAO; VIJAYALAKSHMI; RANJITHA, 2016).

1.3.2.1 *Penicillium*

Ecologicamente, as espécies do gênero *Penicillium* são de extrema importância na natureza, pois participam ativamente em ciclos biogeoquímicos, atuando na decomposição de matéria orgânica. Embora, o solo seja o habitat natural dessas espécies, elas podem ser encontradas em todos ecossistemas. Devido à sua elevada competência metabólica, não são muito exigentes nutricionalmente, tolerando uma imensa variedade de condições físicas e químicas, como temperatura, atividade da água e pH. É exatamente esta alta tolerância às condições extremas que lhes confere a capacidade de crescer em quaisquer ambientes que lhes proporcionem o mínimo de sais minerais até às mais complexas fontes de carbono (SAMSON, 2011).

Numerosas espécies do gênero *Penicillium* apresentam um valor particular, como na indústria alimentar, destaca-se o *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti*, que estão associados na produção de determinados tipos de queijos. Outra

espécie muito conhecida é o *Penicillium notatum*, produtor de antibiótico – penicilina (CHAVEZ et al., 2006; SPECIAN et al., 2015).

Além da importância ambiental na degradação de matéria orgânica, espécies de *Penicillium* possuem largo potencial biotecnológico, sendo amplamente utilizadas para a produção de enzimas de interesse industrial, ambientais, farmacêutico, alimentício, entre outros. As espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* são utilizadas como modelo em estudos básicos, porém muitas pesquisas têm apresentado o seu enorme potencial biotecnológico. Algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole, e micoparasitismo. (LACERDA; PINOTTI, 2015).

As investigações realizadas por Papanikolaou et al. (2011) demonstraram que culturas limitadas em carbono foram realizadas empregando óleo de olive usado, adicionado ao meio produziu elevadas quantidades de biomassa por *Penicillium* e *Aspergillus*. Os lipídios celulares foram acumulados em quantidades notáveis em quase todas as culturas. *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. E demonstrou ainda, que as estirpes de *Aspergillus* e *Penicillium* são capazes de converter resíduos de óleo de cozinha em produtos de alto valor agregado, confirmando assim a escolha da estirpe de *Penicillium espinulosum* para os estudos propostos..

1.3.3 Lipídeos microbianos (Single Cell Oil)

Os lipídeos microbianos (ou Single Cell Oil, SCO) podem ser definidos como óleos e/ou gorduras produzidos por algas, fungos filamentosos, e principalmente leveduras. São similares em tipo e composição aos óleos e gorduras obtidos de animais e plantas (RATLEDGE, 2005; ENSHAEIEH, 2015). Os triglicerídeos são os principais componentes lipídicos produzidos pelos micro-organismos, compostos de cadeias de ácidos graxos com tamanhos entre 14 e 20 carbonos (ZHAO, 2011).

Os lipídeos microbianos são considerados fontes alternativas de óleos e principalmente de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poliinsaturados (PUFAs) e podem vir a contribuir para a produção de óleos, visto que em geral sua estrutura é similar aos óleos vegetais comuns. Os principais ácidos graxos dos lipídeos produzidos por micro-organismo são o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) que são os principais compostos do biodiesel (FEI et al., 2011; KUSS et al., 2015).

Ultimamente, tem sido dada muita atenção para os óleos produzidos por micro-organismos, como fungos, microalgas e bactérias, que são capazes de acumular óleos sob condições de cultivo especial. Em comparação com outros óleos vegetais, os óleos microbianos têm muitas vantagens, tais como ciclo de vida curto, menos trabalho requerido, são menos afetados pelo local, estação e clima, e de crescimento mais rápido. Com a expansão do biodiesel, futuramente os óleos microbianos podem se tornar uma das matérias-primas lipídicas com potencial para a produção do biodiesel, mesmo que ainda muitos trabalhos associados a micro-organismos produzindo óleos necessitam serem realizados (CASTANHA et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

O custo com a produção do biodiesel de micro-organismos oleaginosos deve-se principalmente ao alto custo da glicose, o qual é estimado em aproximadamente 80% do custo total do meio. Assim, consideráveis esforços têm sido direcionados para minimizar os custos da fonte de carbono e encontrar novas fontes alternativas (TSIGIE et al., 2011).

Para reduzir os custos dos óleos microbianos têm sido estudadas outras fontes de carbono para substituir a glicose, especialmente para óleos utilizados na produção de biodiesel. Foram encontrados relatos que xilose, arabinose, manose, glicerol, e outros resíduos agrícolas e industriais vêm sendo usados como fonte de carbono para o acúmulo de óleos em leveduras (CASTANHA et al., 2014; KUSS et al., 2015).

1.3.3.1 Perfil dos ácidos graxos na biomassa fúngica

Independentemente do substrato utilizado para o crescimento de fungos, a maioria dos lipídeos produzidos na biomassa fúngica é representado principalmente por ácido palmítico (C16:0), ácido oléico (C18:1) e ácidos graxos linoléicos (C18:2), além de ácido docosa-hexaenoico (DHA-C22:6), que é caracterizado como um ácido graxo relevante para a saúde, devido à capacidade nutricional (SILVEIRA et al., 2010).

Segundo com Adrio e Demain (2008), *Mortierella isabelina* e *Mucor circinelloides* podem acumular até 5 g de ácido linoleico conjugado (CLA) quando cultivada em meio contendo melaço ou glicose, enquanto *Mortierella alpinis*, quando cultivada em baixas temperaturas, é capaz de acumular ácido eicosapentaenoico. Ácido eicosapentaenoico (EPA-C20: 5, ÔMEGA-3) Fakas et al. (2008) observaram ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e Ácidos graxos gama-linolênicos (C18:3) na biomassa produzida pelo fungo *Cunninghamella echinulata* quando foi cultivada em Agar Dextrose De Batata contendo glicose, concentrado de soro e resíduo

de tomate hidrolisado, além de infusão de milho e extrato de levedura como nitrogênio fontes.

Gayathri et al. (2010) investigou economicamente ácidos graxos importantes produzidos por fungos, em ordem para realizar o experimento, duas espécies de fungos isoladas do solo, *Trichoderma sp.* e *Aspergillus niger*, foram cultivadas em meio batata dextrose ágar (BDA). Os autores observaram que *Trichoderma sp.* produziu omega-3 e ácido docosaenoico (EPA20: 5 e DHA-C22: 6) e elevadas concentrações de ácidos graxos polinsaturados, com 0,298 mg/g e 7,47 mg/g, respectivamente.

Quanto a *Aspergillus niger*, os autores relataram a produção de 0,136 mg/g de DHA. Silveira et al. (2010), utilizou arroz e farelo de trigo como substratos para fermentação fúngica, a fim de alterar seu perfil em ácidos graxos essenciais como alternativa para adicionar valor a esses produtos. Durante o experimento, o meio BDA enriquecido com arroz e farelo de trigo foi usado para o crescimento do fungo *Aspergillus oryzae*, onde produção de ácido linolênico a 0,2% (C18: 3 - ω 3) foi observada, entre outros ácidos graxos. Um estudo avaliou a segurança de ácidos graxos omega-6 ácidos gama-linolênico presentes em *Mucor rouxii* (CFR-G15) biomassa.

Os pesquisadores forneceram ração para ratos contendo biomassa seca de *Mucor rouxii* durante 13 Semanas. Após esse período, verificaram que os animais não apresentaram alterações significativas, os órgãos estavam intactos e os níveis de triglicérides e colesterol foram reduzidos. Portanto, a biomassa do fungo *Mucor rouxii* (CFR-G15) poderia ser incorporada em rações e administrada a animais para fornecer ácidos graxos essenciais para o controle dos níveis de colesterol e triglicérides (MAMATHA et al., 2012). De acordo com Vadivelan e Venkateswaran (2014), a fisiologia dos fungos pertencentes as espécies de *Mortierella alpina* podem ser alteradas por mutação indução, inibidores químicos e condições de estresse, entre outros fatores a fim de aumentar a produção de ácidos polinsaturados.

Assim, as espécies de *Mortierella alpina* foram cultivadas sob condições de estresse (2% de amido, 0,5% de extrato de levedura e temperatura de 12 °C por 4 dias) para aumentar a produção de ômega-3 e ácidos graxos poliinsaturados. Sob estas condições, esse fungo foi capaz de aumentar a produção de EPA de 2,4% a 4,7% e DHA de 1,84% para 3,8%, que pertencem à família dos omega-3, em células de peso seco.

1.3.4 Efeito da temperatura na acumulação de lipídeos

Os fungos filamentosos são uma importante plataforma de produção biotecnológica devido à sua capacidade de produzir biomassa e compostos de alto valor agregado através de diversas vias metabólicas. Essa aptidão facilita a valorização de fluxos de resíduos de vários setores industriais. O conteúdo de lipídeos fúngicos, os tipos de classes e a composição dos ácidos graxos variam em resposta as condições de cultivo. Fatores de estresse ambiental, como alta temperatura e esgotamento de nitrogênio, afetam a acumulação de lipídeos e o rendimento da biomassa. Além disso, os fungos filamentosos podem crescer em uma ampla gama de fontes de carbono renováveis, permitindo que diferentes subprodutos agrícolas sejam utilizados como substratos alternativos economicamente viáveis para produção de biomassa rica em nutrientes. Parâmetros fundamentais como pH, temperatura e aeração devem ser estudados para uma fermentação consistente e desejável. O pH ótimo de cultivo para espécies de fungos filamentosos varia de acordo com o objetivo da pesquisa e o micro-organismo utilizado. Em geral, os valores de pH entre 5 e 6 são os mais adequados para o crescimento fúngico, embora existam algumas exceções (XIA et al., 2011; RUAN et al., 2012; LEONG et al., 2018; SHOAIB et al., 2018).

Fora do alcance do pH ótimo, o crescimento da biomassa e a produção de lipídios podem ser prejudicados (ALI & EL-GHONEMY 2014, VENKATA & VENKATA 2014). Conseqüentemente, é essencial determinar a faixa de pH afetando o crescimento celular e a composição da biomassa. O pH de cultivo também pode influenciar a morfologia de grânulos ou micélio dos fungos. Além disso, o pH baixo pode ser explorado para minimizar a competição bacteriana em uma cultura mista, eliminando assim a necessidade de esterilização do meio de cultivo (NAIR et al., 2016).

Os fungos filamentosos são tipicamente mesófilos, com crescimento e produção de metabolitos geralmente favorecidos entre 20 °C e 40 °C. A temperatura de incubação foi encontrada para afetar o rendimento de biomassa e conteúdo lipídico e composição (XIA et al. 2011; ALI & EL-GHONEMY 2014). A temperatura ideal é frequentemente expressa como um platô, com inibição de crescimento de fungos acima e abaixo da faixa de temperatura ideal. Temperaturas extremas podem induzir síntese lipídica e podem modular o perfil dos ácidos graxos alterando a atividade enzimática dessaturase (TENG et al., 2005). Por exemplo, a composição de ácidos graxos de *Mucor rouxii* cultivado a baixa temperatura (15 °C) resultou em maior expressão do gene da 9-

dessaturase com um aumento do conteúdo de ácidos graxos saturados (RONG et al., 2018).

A introdução de oxigênio por aeração é crucial para o cultivo de fungos filamentosos, com transferência de massa de oxigênio ditando a cinética de produção de biomassa e acumulação de óleos. A transferência de massa de oxigênio é muitas vezes um fator limitante de crescimento por causa do baixo teor de solubilidade de oxigênio em caldos e sua rápida absorção pelo micro-organismo, particularmente, na fase exponencial de crescimento. Métodos para melhorar a capacidade de transferência de oxigênio foram investigados minuciosamente (BURR & ESPENSHADE, 2018).

É crucial compreender o coeficiente de transferência de massa volumétrica (kLa), que descreve a eficiência com a qual o oxigênio pode ser entregue, durante a concepção e operação de biorreatores para culturas submersas. Além dos efeitos das condições de processamento de cultivo sobre produção e composição de biomassa fúngica, compreendendo a composição nutritiva do crescimento, desta forma, é de grande relevância otimizar o meio de produção e os processos de fermentação.

1.3.5 Tecnologias de extração de óleos de biomassa

O desenvolvimento de sistemas e técnicas para extração de lipídeos com solventes múltiplos têm a finalidade de fragilizar e interromper as paredes celulares para liberação de óleo. Isto é especialmente importante para organismos com células com complexa parede celular como micélio fúngico. Em geral, as eficiências de extração/interrupção celular são um desafio para comparar e normalizar devido a diferenças inerentes na estrutura e composição da parede celular, mesmo entre organismos semelhantes.

A interrupção física ou mecânica das células envolve fragilizar até danificar as paredes celulares por qualquer através de manipulação mecânica com vortéx ou elétrica com uso de micro-ondas ou tratamento ultrassônico. Destruindo a membrana celular sendo um tratamento mecânico, simples e de fácil manipulação. Os principais tipos de interrupção física incluem batida de grânulos, ultrassonografia, pré-tratamento de micro-ondas, eletroporação (campo elétrico pulsado) e homogeneização de alta pressão. No entanto, este último exige uma suspensão de célula bombeável que não bloqueia as válvulas de homogeneização e, portanto, pode não ser apropriada para interromper a biomassa de fungos filamentosos oleaginosos (PATEL, MIKES, MATSAKAS, 2018).

1.3.5.1 Pré-tratamento da biomassa para extração de lipídeos

Foi reconhecido que, em qualquer sistema microbiano, a interrupção física tem a maior potencial de comercialização e dimensionamento. Tratamento com pérolas de vidro envolve a ruptura mecânica intensa de células da biomassa em altas frequências, e apresenta grande rendimento na recuperação de lipídeos intracelulares.

As ondas ultrassônicas rompem a membrana celular de micro-organismos oleaginosos através da criação de pequenas bolhas de cavitação que explodem na superfície da célula, auxiliando a liberação de compostos da biomassa intracelular. As características das bolhas de cavitação são determinadas pela frequência das ondas ultrassônicas, bem como pelo meio através do qual se propagam. Atualmente, a ultrassonografia está associada ao uso de solventes inflamáveis para extração de lipídeo fúngico, como visto na tripla melhora na extração de petróleo de *M. circinelloides* ao usar o método de Bligh e Dyer (CARVALHO et al., 2015, VICENTE et al., 2009). Apesar de serem comuns para auxiliar a extração de solventes, as micro-ondas raramente são usadas como pré-tratamento em biomassa úmida. Os solventes perto da parede celular podem ser direcionados devido à especificidade das micro-ondas atividade em compostos polares, como a água, resultando em melhoramento da parede celular e transferência de massa. Embora a escalabilidade deste processo seja questionável, a extração de óleo em escala de laboratório para fungos usando etanol com micro-ondas quase dobraram o rendimento de óleo em comparação com a ultrassonografia (22% a 42% p / p de biomassa seca) com um sistema de clorofórmio: metanol (2: 1) (CARVALHO et al., 2015).

Além disso, um sistema contínuo de extração assistida por micro-ondas seguidas de extração de hexano foi capaz de recuperar óleo de 77% da biomassa de algas a 95°C por 30 min (BALASUBRAMANIAN et al., 2013).

A eletroporação, comumente referida como campo elétrico pulsado (PEF), é um novo processo não-térmico que pasteuriza bebidas, mas também pode ser aplicado a micro-organismos oleaginosos para romper a parede celular. O PEF permeabiliza a parede celular de fungos, permitindo que os solventes penetrem nas membranas e acesse os corpos lipídicos (YOUSUF et al., 2017). Esta tecnologia foi validada na escala piloto para algas, mas ainda não foi avaliado para extração de lipídeo de fungo.

Foi determinado que o PEF e a ultrassonografia são os métodos de lise da parede celular física mais eficientes em termos energéticos, com mais de 90% de economia de energia em comparação com o “Bead Beating” (PATEL, MIKES, MATSAKAS, 2018).

1.3.5.2 Métodos de extração de lipídeos

Isolar os lipídeos da biomassa define a conversão de subprodutos agrícolas em óleo de alto valor agregado. Embora as avaliações tecnológicas e abrangentes da produção de óleo fúngico ainda não foram realizadas, obtenção de biomassa, secagem e posterior extração de óleo.

Os solventes orgânicos vem sendo utilizados para extração de óleo de matrizes biológicas há décadas, mas técnicas envolvendo novas substâncias químicas para processamentos mais sustentáveis de extração celular mais eficientes são fundamentais no caminho da viabilidade econômica e redução do impacto ambiental.

A secagem da biomassa antes da extração de óleo também é um processo extremamente intensivo em energia, em que estima-se o gasto de 106 j de energia por quilograma de óleo extraído para a biomassa seca (LANGE & HEIJNEN, 2001).

A extração de óleo geralmente é desafiada pela escalabilidade do sistema. Encontrando procedimentos eficazes de interrupção e extração geralmente são simples na escala de laboratório, mas prova imensamente desafiador nas escalas piloto e industrial para aplicações comerciais. Várias investigações sobre extração de óleo microbiano em escala piloto enfocam principalmente o cultivo, com a separação e processos de extração relativamente negligenciados. Esse fato vem sendo observado, devido aos recursos financeiros elevados, causando impactos dos processos a jusante na produção de óleo microbiano, em escalável e ambientalmente aceita. E, também devem ser desenvolvidos sistemas de extração com sistemas de solventes amigáveis (VASCONCELOS et al., 2018; PATEL, MIKES, MATSAKAS, 2018).

Os sistemas tradicionais de solventes binários com clorofórmio / metanol (por exemplo, Folch, Bligh e Dyer) para a extração de óleo em escala de laboratório é mais eficaz quando combinada com a disrupção celular apropriada pré-tratamentos. Embora os hexanos sejam tipicamente usados na escala industrial para a extração de oleaginosas, eles não são tão eficientes na extração de óleo de fungos como uma mistura de clorofórmio / metanol, mesmo quando combinado com pré-tratamentos de ultrassonom (VICENTE ET AL., 2009, ZHANG et al., 2014). Além do que, além do mais, o uso de hexano e outros solventes inflamáveis nos processos convencionais de

extração de óleo têm levantado várias questões ambientais, de segurança e de saúde (CASTANHA et al., 2013). Alternativamente, o solvente biodegradável e onipresente do acetato de etila é promissor para a extração de óleo microbiano, mas requer mais investigação sobre suas aplicações em fungos (ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014). O tolueno também é um solvente relativamente seguro, e a quantidade de óleo extraído de *M. circinelloides* usando um sistema de solventes de tolueno: metanol (1: 1) foi comparável ao padrão clorofórmio: metanol (2: 1) (MITRA et al., 2012; MAGDUM et al., 2015).

Os rendimentos de óleo usando os dois sistemas solventes foram 46% e 44%, respectivamente. Os gases nas condições ambientais e atmosféricas tornam-se solventes eficazes com extração única propriedades quando usadas em condições supercríticas e podem ser facilmente recuperadas, reduzindo a pressão do sistema. CO₂, N₂O e CHF₃ foram investigados para extração de óleo de fungos (SAKAKI et al. 1990).

Por exemplo, a extração supercrítica de óleo de CO₂ da biomassa *Cunninghamella echinulata* produziu rendimentos de óleo aproximadamente 10% maiores que os de uma extração Folch típica. No entanto, um estudo separado informou que o óleo produz 25% menos quando se usa supercrítico CO₂ na biomassa de *M. alpina* do que quando se utiliza a extração de Soxhlet com hexano (NISHA et al. 2012; BOGDAN et al., 2014).

Os líquidos iônicos (ILs), definidos como sais no estado fundido abaixo de 100° C, emergiram como uma estratégia de solvente ambientalmente amigável. As ILs têm um grande grupo de cátions orgânicos e um menor anions orgânico ou inorgânico. ILs foram investigados para a extração de óleo de algas, ainda que aplicações para extração de óleo fúngico ainda se encontra limitada. Ambos os sistemas IL e IL / Co solvente (tipicamente com metanol ou clorofórmio) relatam uma grande variedade de eficiências de extração, variando de 40% a quase 300% de recuperação de óleo em comparação comum método padrão como Bligh e Dyer's. As inconsistências e resultados conflitantes são prováveis devido à variedade de IL ou Co solventes utilizados, bem como ao uso de diferentes pré-tratamentos de biomassa (por exemplo, tratamentos de micro-ondas ou ultrassons) antes da extração de IL (ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014; BREIL et al., 2016; MENDOZA-LÓPEZ, et al., 2017; BOGDAN et al., 2018).

Assim, torna-se importantes investigações com um maior número de fungos, e substratos para conhecer o potencial como oleaginoso, com vistas a uma maior

consideração da escalabilidade e sistemas de solventes ecologicamente aceitáveis. Além disso, outro aspecto importante trata-se do uso de substratos alternativos para avaliar o potencial biotecnológico desses organismos, visando a redução dos custos de produção, bem como, explorando também a composição química e ampliar as aplicabilidades de uso dos ácidos graxos microbianos.

1.3.6 Substratos agroindustriais para a produção de biomassa

Recentemente, tem havido uma tendência crescente para utilização mais eficiente de subprodutos agroindustriais para a conversão para uma gama de produtos biológicos de valor agregado (FIGUEIRA et al., 2015). Em geral, grandes volumes de resíduos sólidos, resíduos e subprodutos são gerados ao longo do ano como consequência da agricultura e indústria agroalimentar, produzidas tanto no setor primário ou por indústrias de processamento secundário. Por esta razão, o bioprocessamento desses resíduos, merecem uma atenção considerável por serem abundantemente disponíveis e de baixo custo, podendo ser um substrato renovável para resolver problemas do meio ambiente associados à sua disposição (DIAZ et al., 2018).

Dentre os resíduos agroindustriais, destacam-se a milhocina, como fonte de nitrogênio e o óleo residual de soja, obtido a partir do descarte, sendo considerado como fonte de carbono para crescimento do fungo e produção de biomassa e na acumulação de lipídeos por micro-organismos considerados oleaginosos (BOGDAN et al., 2014).

1.3.6.1 Milhocina

A milhocina é um subproduto líquido gerado pela indústria de processamento do milho. É rica em vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas, sendo uma importante fonte de nitrogênio para muitos processos biotecnológicos (BERGER et al., 2014). O custo desse subproduto é 40 euros/toneladas segundo a COPAM (Companhia Portuguesa de Amidos, S.A. Portugal).

A água de maceração do milho, milhocina ou “corn steep liquor” (CSL) vem sendo utilizada como fonte alternativa para obtenção de produtos como: antibióticos, ração animal, alcoóis, biomassa, enzimas, iscas para insetos, biossurfactantes e quitina/quitosana (NASCIMENTO et al., 2015; RAGA; VIEIRA, 2015). Segundo Silveira (2001), a água de maceração do milho pode substituir o extrato de levedura, com

excelentes resultados. A milhocina, entretanto, é de difícil conservação e seu uso é

Aminoácidos (%)	Vitaminas (mg/Kg)	Minerais (mg/ Kg)	(%)		
Alanina	9,83	Biotina	0,3	Cálcio	0,14
Argniina	3,68	Cholina	3.500,0	Cobre	15,0
Á aspártico	5,82	Inositol	6000,0	Ferro	100,0
Cisteína	2,20	Niacina	80,0	Manganês	20,0
Ac glutâmico	18,07	Piridoxina	9,0	Manganês	0,60
Triptófano		Riboflavina	6,0	Potássio	2,80
Glicina	5,27	Tiamina	3,0	Sódio	0,10
Histidina	3,72	Ácido Pantotêmico	15	Fósforo	1,18
Isoleucina	3,07			Selênio	0,3
Leucina	8,28			Zinco	60,0
Lisina	4,75			Enxofre	0,60

dependente do valor do produto a ser obtido.

As características físico-químicas da milhocina correspondem a uma variação de pH de 3,5 a 4,1, concentração de nitrogênio está entre 3,8 % a 40,5 % no efluente bruto, açucares não ultrapassam 5 % e ácido láctico entre 5 – 15 %, devido a já estarem em processo de fermentação nessa faixa de pH. A quantidade de matéria orgânica presente pode ser elevada, tornando-se um dos grandes problemas de tratamento para as indústrias (RAGA; VIEIRA, 2015). Em seus estudos, Akhtar (1998), analisou a composição da milhocina estudada em base seca, o pH apresentava-se em 3,9, 40,8% de proteínas; ácido láctico correspondendo a 16%; açucares redutores 12,8%; compostos variados a 30,4% (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química de milhocina

Fonte: Silveira (2001).

1.3.6.2 Óleos residuais

Os óleos vegetais, quando usados em frituras, principalmente quando depositados no meio ambiente via esgoto, geram um passivo ambiental capaz de causar grandes problemas de poluição. Durante o processo de fritura, os óleos são continuamente expostos a vários fatores que levam a uma grande diversidade de

reações químicas, tais como: oxidação, hidrólise, e polimerização da molécula do triacilglicerol (SANIBAL; MANCINI-FILHO, 2002).

Esses óleos, quando usados em frituras, principalmente quando depositados no meio ambiente via esgoto, geram um passivo ambiental capaz de causar grandes problemas de poluição. Diariamente são geradas grandes quantidades de óleo de cozinha nos lares, indústrias e estabelecimentos produtores de refeições no país. Por falta de informação da população, o óleo residual muitas vezes é descartado de forma inadequada, ou seja, despejado diretamente em águas, como rios e riachos, pias e vasos sanitários, causando danos pelo entupimento de canos e aumentando o custo dos processos de tratamento do esgoto, além de poluição do meio aquático devido à formação de filmes oleosos na superfície da água dificultando a troca de gases com a atmosfera (SILVA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013).

1.4 Referências Bibliográficas

ABU-ELREESH, G.; ABD-EL-HALEEM, D.. An effective lipid-producing fungal sp. strain DGB1 and its use for biodiesel production. **African journal of biotechnology**, v. 12, n. 34, 2013.

ABU-ELREESH, G.; ABD-EL-HALEEM, D. Promising oleaginous filamentous fungi as biodiesel feed stocks: Screening and identification. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 1, p. 576-582, 2014.

ADRIO, J.; DEMAIN, A. Microbial Cells and Enzymes A Century of Progress
In book: **Microbial Enzymes and Biotransformations**, p.1-27, 2008.

AHMAD, Farah B. et al. Microbial oil production from sugarcane bagasse hydrolysates by oleaginous yeast and filamentous fungi. In: **Proceedings of the 38th Annual Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**. Australian Society of Sugar Cane Technologists-ASSCT, p. 251-259, 2016.

AKHTAR, P.; JAMES, I.; AMINA ASGHAR, G. Synthesis of lipids by certain yeast strains grown on whey permeate. *Journal of Food Lipids*, vol.5, n.5, 1914.

AKPINAR-BAYIZIT, A. Fungal Lipids: The Biochemistry of Lipid Accumulation. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 5, 2014.

ALI, T.; EL-GHONEMY, D. H. Optimization of culture conditions for the Highest Lipid Production from some Oleaginous Fungi for Biodiesel Preparation. **Asian Journal of Applied Sciences**, v. 2, n.5, p.600-609, 2014.

APPARAO, U.; VIJAYALAKSHMI, S.; RANJITHA, J. A Review on Current Research Activities: Biological Conversion of Crude Glycerol from Biodiesel Industry into Value-Added Products. **International Journal of Chemistry Technology**, v. 9, n. 4, p. 576-586, 2016.

ARAUJO, P. H.; ALMEIDA, M. D.; DA SILVA, C. S. Produção de Biodiesel a partir de Óleo Comestível Usado. **Revista de Ciências da Amazônia**, v. 1, n. 1, 2013.

AZÓCAR, L.; CIUDAD, G.; HEIPIEPER, H.J.; NAVIA, R. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, n. 3, p. 621-636, 2010.

BALASUBRAMANIAN, Y.K.; DOAN, Y.; OBBARD, J. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. s 215–216, p.929–936, 2013.

BERGER, L.R.R., STAMFORD, T.C.M., STAMFORD-ARNAUD, T.M., FRANCO, L.O.; NASCIMENTO, A.E., CAVALCANTE H.M., MACEDO, R.O., Campos-Takaki, G.M. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. **Molecules**, v.19, n.3, p. 2771–2792, 2014..

BOGDAN, V. I.; KOKLIN, A. E.; KRASOVSKY, V. G.; LUNIN, V. V.; SERGEEVA, YA. E.; IVASHECHKIN, A. A.; FEOFILOVA, E. P. Production of fatty acid methyl esters that are the basis for biodiesel fuel from mycelial fungi lipids extracted by supercritical CO₂. **Russian Journal of Physical Chemistry B**, v.8, p.1004–1008, 2014.

BORUGADDA, V. B.; GOUD, V.V. Biodiesel production from renewable feedstocks: status and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 7, p. 4763-4784, 2012.

BREIL, C; MEULLEMIESTRE, A.; MARYLINE VIAN, M.; CHEMAT, F. Bio-Based Solvents for Green Extraction of Lipids from Oleaginous Yeast Biomass for Sustainable Aviation Biofuel. **Molecules**, v. 21, n.2, p.196, 2016.

BURR, R. & ESPENSHADE, P.J. Oxygen-responsive transcriptional regulation of lipid homeostasis in fungi: Implications for anti-fungal drug development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 81, p.110–120, 2018.

CARVALHO, A.K., RIVALDI, J.D., BARBOSA J.C., DE CASTRO. H.F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides*--a sustainable pathway for biofuel production. **Bioresource Technology**,v.181, p.47-53, 2015.

CASTANHA, R.F.; MARIANO, A.P.; MORAIS, L.A.S. Optimization of lipids production by *Cryptococcus laurentii* 11 using cheese whey with molasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.2, 379-387, 2013.

ÇELEBI, Y. and AYDIN, H. Investigation of the effects of butanol addition on safflower biodiesel usage as fuel in a generator diesel engine. **Fuel**, v. 222, p.385-393, 2018.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.

CREMONEZ, P.A.; FEROLDI, M.; NADALETI, W.C.; DE ROSSI, E.; FEIDEN, A.; CAMARGO, M.P.; CREMONEZ, F. E.; KLAJN, F.F.; Biodiesel production in Brazil: current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 415-428, 2015.

DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L.; RAMPIN, M.A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 776-792, 2009.

DE PAULA SCAMILHE, E.; PIMENTA, L. S.; PEREIRA, E. B. Potencial Dos Óleos De Café Verde E De Soja Na Produção De Biodiesel Via Rota Etilica. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 1, p. 464-473, 2019.

DIAZ, A.B.; A BLANDINO, A.; CARO, I. Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 52-64, 2018.

ENSHAEIEH, M.; ABDOLI, A.; MADANI, M. Single cell oil (SCO) production by *Rhodotorula mucilaginosa* and its environmental benefits. **Journal Agriculture Science Technology**, v. 17, p.387-400, 2015.

FEI, Q.; CHANG, H.N.; SHANG, L.; CHOI, J.D.; KIM, N.; KANG, J. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.102, n.3, p.2695-2701, 2011.

FIGUEIRA, J. A.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. Avaliação da produção de α -glicosidase pela linhagem de *Aspergillus niger* Iba 02 em meio semissólido utilizando resíduos agroindustriais, extrato de levedura e sais, por meio da ferramenta de planejamento experimental. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, n.2, 2015.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Penicillium* subgenus *Penicillium*-A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in mycology**, v.49, p.1-174, 2004.

GAYATHRI, S.; MITRA, A.; PRABHU, S.; KUMAR, V. Soil microorganisms produce omega-3 fatty acids. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n.5, p.499-503, 2010. ·

GONG, C.; LI, Z.; LI, D.; LIU, J.; SI, X.; YU, J.; HUANG, W.; LIU, F.; HAN, Y. Numerical investigation of hydrogen addition effects on methanol-air mixtures combustion in premixed laminar flames under lean burn conditions. **Renewable Energy**, v.127, p. 56-63, 2018.

GUZATTO, R.; REIZNAUTT, Q.; DEFFERRARI, D.; CADORE, I.R. Transesterification double step process modification for ethyl ester biodiesel production from vegetable and waste oils. **Fuel**, v. 92, n. 1, p. 197-203, 2012.

HUANG, H.; LONG, S.; SINGH, V. Modeling and Analysis: Techno-economic analysis of biodiesel and ethanol co-production from lipid-producing sugarcane. **Biofuels, Bioproducts and Biorefineries**, v. 10, p.299–315, 2016.

KHOT, M.; KATRE, G.; ZINJARDE, S.; RAVIKUMA, A. Single Cell Oils (SCOs) of Oleaginous Filamentous Fungi as a Renewable Feedstock: A Biodiesel Biorefinery Approach. In: **Fungal Biorefineries**. Sachin Kumar, Pratibha Dheeran, Mohammad Taherzadeh and Samir Khanal (Ed.), pp 145-183.

KIM, K.H.; LEE, O.K.; LEE, E.Y. Nano-immobilized biocatalysts for biodiesel production from renewable and sustainable resources. **Catalysts**, v. 8, n.2, p.2-13, 2018.

KUSS, W.; KUSS, A.V.; DA ROSA, R.G.; ARANDA, D.A.G.; CRUZA, Y.R. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.50, p. 1013-102, 2015.

LACERDA, J. X.; PINOTTI, L. M. Produção de celulases por *Penicillium* sp. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1362-1367, 2015.

LANG, X.; DALAI, A.K.; BAKHSHI, N.; REANEY, M.J.; HERTZ, P.B. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. **Bioresource Technology**, v. 80, n. 1, p. 53-62, 2001.

LANGE, H.C. & HEIJNEN, J.J. Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 75, n.3, p.334-344, 2001.

LEITE, J.G. D. B.; BIJMAN, J.; GILLER, K.; SLINGERLAND, M. Biodiesel policy for family farms in Brazil: One-size-fits all? **Environmental Science & Policy**, v. 27, p. 195-205, 2013.

LEIVA-CANDIA, D. E.; TSAKONA, S.; KOPSAHELIS, N. Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products. **Bioresource Technology**, v.190, p.57-65, 2015.

LEONG, W.H.; LIM, J.W.; LAM, M. K.; Y UEMURA, Y.; HOD, YEEK-CHIA. Third generation biofuels: A nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.91, p. 950-961,2018.

LIANG, Ming-Hua; JIANG, Jian-Guo. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in lipid research**, v. 52, n. 4, p. 395-408, 2013.

LIGGETT, R. Winston; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriological reviews**, v. 12, n. 4, p. 297, 1948.

MAGDUM, S.; MINDE, G.; ADHYAPAK, U.; KALYANRAMAN, V. Competence Evaluation of Mycodiesel Production by Oleaginous Fungal Strains: *Mucor circinelloides* and *Gliocladium roseum*. **International Journal of Energy and Environment**, v.6,n.4, p.377-382, 2015.

MANOCHA, M. S.; SAN-BLAS, G.; CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 147-154, 1980.

MAMATHA, S.S.; MUTHUKUMAR, S.P.; VENKATESWARAN, G. Safety evaluation of *Mucor rouxii* CFR-G15 biomass containing x-6 fatty acids in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.62, n.1, p.183-190, 2012.

MENDOZA-LÓPEZ, M.R.; VELEZ-MARTÍNEZ, D.; ARGUMEDO-DELIRA, R.; ALARCÓN, A.; GARCÍA-BARRADAS, O.; SÁNCHEZ-VIVEROS, G.; FERRERA-CERRATO, R. Lipid extraction from the biomass of *Trichoderma koningiopsis* MX1 produced in a non-stirring culture for potential biodiesel production. **Environmental Science and Pollution Research International**, v,24, n.33, p.25627-25633, 2017.

MENG, X.; XIN XU, X.; JIANMING, Y.; ZHANG, L. . Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MITRA, D.; RASMUSSEN, M.L.; CHAND, P.; CHINTAREDDY, V.R.; YAO, L.; GREWELL, D.; VERKADE, J.G.; WANG, T.; VAN LEEUWEN, J. Value-added oil and animal feed production from corn ethanol stillage using the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Bioresource Technology**,v.107, p.368-375, 2012.

MOHAN, V. et al. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 2-12, 2016.

MOTHÉ, Cheila G. et al. Otimização da produção de biodiesel a partir de óleo de mamona. **Revista Analytica**, v. 19, p. 40-44, 2005.

NAIR, R.B.; LENNARTSSON, P.R.; TAHERZADEH, M.J. Mycelial pellet formation by edible ascomycete filamentous fungi, *Neurospora intermedia*. **AMB Express**, v. 6, p. 31,2016..

NASCIMENTO, R.A.L. et al. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). **e-Xacta**, v. 8, n. 1, 2015.

NISHA, A.; KADIMI, U. S.; VENKATESWARA, G. Supercritical CO₂ extraction of *Mortierella alpina* single cell oil: Comparison with organic solvent extraction. **Food Chemistry**, v. 133, n.1, p.220–226, 2012.

PAPANIKOLAOU, S.; DIMOU, A.; FAKAS, S.; DIAMANTOPOULOU, P. ; PHILIPPOUSSIS, A. ; GALIOTOU-PANAYOTOU, M. ; AGGELIS, G. Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal Applied Microbiology*, v.110, n.5, p. 1138-1150, 2011.

PATEL, A.; MIKES, F.; MATSAKAS, L. An Overview of Current Pretreatment Methods Used to Improve Lipid Extraction from Oleaginous Micro-Organisms **Molecules**, v.23, n.7,p.1-22, 2018.

PENG, Xiaowei; CHEN, Hongzhang. Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3885-3889, 2008.

PEREZ-GARCIA, Octavio et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

RAGA, A.; VIEIRA, S.M.J.. Attractiveness of corn steep liquor plus borax to fruit fly (Diptera: Tephritidae) under field cages. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 00-00, 2015.

RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. **Engineering in Life Sciences**, v. 11, n. 5, p. 429-438, 1991.

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

RICO, J. A. P.; SAUER, I. L. A review of Brazilian biodiesel experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 513-529, 2015.

RONG, C.; CHEN, H.; WANG, M.; GU, Z.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, W.; CHEN, Y.Q. Molecular mechanism of substrate preference for ω -3 fatty acid desaturase from *Mortierella alpina* by mutational analysis and molecular docking. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.102, n.22, p.9679-9689, 2018.

RUAN, Z.; M ZANOTTI, M.; WANG, X.; DUCEY, C.; Y LIU, Y. Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.110, p.198-205, 2012.

RUSCHEL, Carla Felippi Chiella et al. Otimização do processo de transesterificação em duas etapas para produção de biodiesel através do planejamento experimental Doehlert. **Química nova. São Paulo. Vol. 39, n. 3 (2016), p. 267-272**, 2016.

SAKAKI, K.; YOKOCHI, T.; SUZUKI, O.; Hakuta, T. Supercritical fluid extraction of fungal oil using CO₂, N₂O, CHF₃ and SF₆. **Journal of the American of oil chemistry Society**, v.67, n.9, p. 553-557, 1990.

SAMIOS, D. et al. A Transesterification Double Step Process—TDSP for biodiesel preparation from fatty acids triglycerides. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 4, p. 599-605, 2009.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 159-183, 2011.

SANIBAL, E. A. A.; MANCINI-FILHO, J. Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. **Caderno de Tecnologia de Alimentos & Bebidas**, p. 48-54, 2002.

SHAHIR, V. K.; JAWAHAR, C. P.; SURESH, P. R. Comparative study of diesel and biodiesel on CI engine with emphasis to emissions—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 686-697, 2015.

SHOAIB, A., BHRAN, A.; RASMEY, A.H.;MIKKY, Y. Optimization of cultural conditions for lipid accumulation by *Aspergillus wentii* Ras101 and its transesterification to biodiesel: application of response surface ... **3 Biotech**, v.8, p. , 2018.

SILVA, M. V. et al. Reciclagem de óleos residuais para a produção de sabão no município de Itapetinga-BA. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 9, n. 13, p. 106-120, 2012.

SILVEIRA,C.M.; OLIVEIRA, M.D.S. Lipid content and fatty acid profile of defatted rice bran and wheat bran submitted to solid state fermentation by *Aspergillus oryzae*. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.28, n.1, 2010.

SOMASHEKAR, D. et al. Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1719-1724, 2003.

SPECIAN, Vânia et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde; **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 4, 2015.

SUAREZ, Paulo A.Z.; MENEGHETTI, Simoni M. Plentz. Assuntos Gerais. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2068-2071, 2007.

TAKENO, S. et al. Transformation of oil-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, using Zeocin, and application to arachidonic acid production. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 617-622, 2005.

TANG, G.Q.; NOVITZKY, W.P.; CAROL GRIFFIN, C.H.; HUBER, S.C.; DEWEY, R.E. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *Plant Journal*, v. 44, n.3,p.433-446, 2005.

TSIGIE, Y. A.; WANG, CHUN-YUAN ; TRUONG, CHI-THANH ; JU, YI-HSU. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* PO1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology** , v.102, n.19, p.9216-22, 2011.

VADIVELAN, G.; VENKATESWARAN, G. Production and Enhancement of Omega-3Fatty Acid from *Mortierella alpina* CFR-GV15:Its Food and Therapeutic Application. **BioMed Research International**, v.2014, p.1-9, 2014.

VASCONCELOS, B.; TEIXEIRA, J.C.; DRAGONE, G.; AND JOSÉ ANTÓNIO TEIXEIRA, J.A. Optimization of lipid extraction from the oleaginous yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Lipomyces kononenkoae*. **AMB Express**, v.8, p.126-1134, 2018.

VENKATA SUBHASH, G AND VENKATA MOHAN, S. Lipid accumulation for biodiesel production by oleaginous fungus *Aspergillus awamori*: Influence of critical factors. **Fuel**, v.116, p.509-515, 2013 .

VICENTE, Gemma; MARTINEZ, Mercedes; ARACIL, Jose. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource technology**, v. 92, n. 3, p. 297-305, 2004.

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

VONGSANGNAK, Wanwipa et al. Genome-scale analysis of the metabolic networks of oleaginous Zygomycete fungi. **Gene**, v. 521, n. 1, p. 180-190, 2013.

WAHLEN, B.D.; WILLIS, R.M.; SEEFELDT, L.C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures.**Bioresource Technology**, v.102, n.3, p.2724-2730, 2011.

XIA, C.; J ZHANG, J.; W ZHANG, W.; HU, B A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, p.1-10, 2011.

YOUSUF, A.; KHAN, M.R.; ISLAM, A.; MONIR, M. U.; WAHID, Z.A.; PIROZZI, D. Application of Electroporation technique in biofuel processing. Engineering Technology International Conference 2016 (ETIC 2016), **MATEC Web Conference**, v.97, 1-5, 2017.

ZHAO, X. et al. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. **Journal of industrial microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 627-632, 2011.

ZHANG, Huiming et al. Biodiesel produced by waste cooking oil: Review of recycling modes in China, the US and Japan. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 38, p. 677-685, 2014.

ZHENG, Yi.; SHI, J.; TU, M.; CHENG, YU-SHEN. Chapter One - Principles and Development of Lignocellulosic Biomass Pretreatment for Biofuels. **Advances in Bioenergy**, v. 2, p.1-68, 2017.

ZINOVIEV, S. et al. Next-generation biofuels: survey of emerging technologies and sustainability issues. **ChemSusChem**, v. 3, n. 10, p.1106-1133, 2010.

CAPÍTULO II

Efeito da temperatura na conversão de substratos agroindustriais na produção de biomassa e acumulação de lipídeos por uma nova linhagem de *Penicillium spinulosum* UCP 1347

Artigo a ser submetido à revista

International Journal of Microbiology (A3) ISSN-

Efeito da temperatura na conversão de substratos agroindustriais na produção de biomassa e acumulação de lipídeos por uma nova linhagem de *Penicillium spinulosum* UCP 1347

Autores: Rafael Kabroski Antunes¹, Nathália Alencar², Iam Garrard³, Rosileide F. da S. Andrade⁴, Adriana Ferreira, Patrícia Nunes, Hilário J. Neto⁵ and Galba M. Campos-Takaki⁵

Afiliações:

1. Programa de Pós-graduação Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50.050-900 Recife, PE, Brazil.
2. Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste em Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife-PE, Brazil.
3. Programa Nacional de Pós-Doutorado -CAPES, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900 Recife-PE, Brazil
4. Brunel Institute for Bioengineering, Brunel University, Kingston Ln, London, Uxbridge UB8 3PH, Reino Unido
5. Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Pernambuco, Brazil.

*Autor correspondente: Galba Maria de Campos-Takaki galba_takaki@yahoo.com.br

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0519-0849>

RESUMO

Estudos foram realizados com uma nova linhagem de *Penicillium spinulosum* UCP1347 avaliando a produção de biomassa e a habilidade de acumulação de lipídeos, utilizando como substrato resíduos agroindustriais, diferentes temperaturas de crescimento (20^o C, 25^o C e 30^oC), em fermentação submersa. A produção de biomassa e lipídios foi realizada em meio basal constituído de sais, suplementado com óleo de soja residual (pós-fritura) e milhocina, como fontes de carbono e nitrogênio, mantido sob agitação orbital de 150 rpm e diferentes temperaturas por 96h. Os lipídeos foram extraídos por métodos mecânicos (agitação e ou sonicação) associados aos tratamentos com solventes orgânicos, por meio de quatro diferentes métodos de extração. O *P. spinulosum* demonstrou conteúdo máximo de lipídeos de 67,8 % e viscosidade de

0,92cP (25°C), seguido de 67,02% e viscosidade de 0,95cP (20°C) e 57,8%, sendo o valor mais elevado de viscosidade (13,2cP), à temperatura de 30°C, respectivamente. A determinação e identificação de ácidos graxos por GC/MS revelou teor mais elevado de ácido linoleico em todas as temperaturas testadas, contudo, conteúdos diferentes por temperatura, sendo o maior na temperatura de 25° C, seguido de 20°C e 30°C, respectivamente. Os resultados promissores obtidos com a nova linhagem oleaginosa de *P. spinulosum*, UCP1347 apresenta potencial para produção de biodiesel, bem como, estudos devem ser realizados para maiores aplicabilidades com o aumento da viscosidade do lipídeo extraído da biomassa obtida a temperatura de 30°C e possível sua aplicabilidade como biolubrificante.

Palavras chave: Ácidos graxos, Biodiesel, Lipídeos, Fungo oleaginoso.

1. INTRODUÇÃO

Os lipídeos microbianos (Single Cell oil) são óleos que podem ser produzidos por alguns micro-organismos e apresentam composição e valor energético similar aos óleos vegetais e animais [1,2].

O acúmulo, composição, qualidade e quantidade de lipídeos dependem do micro-organismo produtor e variam de acordo com sua constituição genética, condições de cultivo (temperatura, pH, tempo, etc) e composição do meio [3,4].

Dentre os micro-organismos, os fungos filamentosos têm sido estudados devido à sua capacidade de acumular elevadas quantidades de lipídeos intracelulares [5,6]. Devido às desvantagens ambientais e sanitárias resultantes do uso de combustíveis fósseis não sustentáveis, encontrar novas alternativas energéticas, sustentáveis, facilmente disponíveis e favoráveis ao ambiente, vem sendo o objetivo de muitos pesquisadores a quase duas décadas [7].

Uma das possíveis aplicações do lipídeo microbiano é o uso como matéria-prima na produção de biodiesel, por ser este um óleo produzido a partir de fontes renováveis. Dentre os tipos de lipídeos mais utilizados para produção do biodiesel estão os ácidos graxos [8].

Em comparação entre óleos de origem vegetal e óleos produzidos por micro-organismos, estes últimos, são considerados mais promissores, podendo ser obtidos em um curto espaço de tempo, independentes do clima e crescimento, apresentam elevada velocidade de crescimento quando comparados às plantas. Neste sentido, a expansão do biodiesel por óleos microbianos surge como alternativa promissora na produção do biodiesel [9].

Estudos prévios realizados por Shimi [10] com *Penicillium spinulosum* demonstraram acumulação de 21,1% de gorduras, o que representa uma potencial fonte de óleo microbiano; No presente trabalho foi investigada a produção de lipídeos microbianos (Single Cell Oil), compatíveis com a produção de biodiesel por uma nova linhagem de *Penicillium spinulosum* isolada de solo da caatinga de Pernambuco, Brasil, utilizando fontes renováveis como substratos e avaliando a influência de diferentes temperaturas e métodos de extração na acumulação e composição de lipídeos.

Penicillium spinulosum é um fungo filamentosos que representa forte potencial para obtenção de óleo microbiano, tornando-se um processo atrativo pelo uso de substratos agroindustriais de baixo custo, além de ser usado em processos de biorremediação de efluentes de curtume, como também na biorremediação ou cooperação microbiana para melhorar o processo de gestão de lixo eletrônico de uma forma mais ecológica [11,12,13]. E, estudos mais recentes, relatam a produção de lipídeos por *Penicillium decumbens* [14] e *P. citrinum* [15]. No presente trabalho foi investigado o potencial biotecnológico de *Penicillium spinulosum* na bioconversão de substratos agroindustriais (milhocina e óleo de soja pós-fritura), como fontes de carbono e nitrogênio para a produção de biomassa e acumulação de lipídeos, por fermentação submersa sob diferentes temperaturas.

2. MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi uma nova linhagem de *Penicillium spinulosum* UCP1347 foi isolada de solo da Caatinga do Estado de Pernambuco, Brasil. Este fungo pertence à Coleção de Culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco) e foi registrado no World Federation Culture for Collection -WFCC. O *P. spinulosum* UCP/WFCC 1347 foi mantido em meio Ágar Sabouraud (SAB) [composto por 10g de peptona, 40g de glicose e 15g de ágar e 1000mL de água destilada, pH 5,0], a 5°C.

2.2 Substratos

Os substratos utilizados foram milhocina (resíduo proveniente do beneficiamento do milho, Cabo-PE, Brasil) e o óleo pós-fritura proveniente de comércio informal da cidade de Recife-PE, Brasil.

2.3. Produção de biomassa por *Penicillium spinulosum*

O pré-inóculo de *P. spinulosum* foi preparado a partir da remoção de esporos do meio Sabouraud dextrose ágar transferidos para meio Sabouraud líquido, mantido à temperatura de 28°C, 150rpm por durante 24h até a obtenção de 10^7 esporos/mL, servindo de pré-inóculo. A produção da biomassa de *P. spinulosum* foi realizada a partir da transferência de 5% do pré-inóculo para frascos de Erlenmyer de 500mL de capacidade, contendo 200mL do meio constituído do meio basal, cerca de 10% da solução salina [KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 1 g/L, 10 mL de solução traço $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,63 mg/L, MnSO_4 0,01 mg/L e ZnSO_4 0,62 mg/L], no pH 5,0, suplementado com 5% de milhocina e 3% de óleo de soja pós-fritura, de acordo com a metodologia de Nunes (2016). Os frascos foram incubados às temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C, 150rpm, durante 96h. Após esse período, a biomassa foi coletada por filtração a vácuo, lavada com água destilada, congelada e liofilizada, e em seguida mantida em dessecador até peso constante. Os resultados foram expressos em g/L.

2.4. Determinação do pH

O pH do meio de cultivo de *P. spinulosum* foi determinado utilizando o potenciômetro Orion modelo 310.

2.5. Métodos analíticos

2.5.1 Pré-tratamento para lise da parede celular

O pré-tratamento para rompimento da parede celular de *P. spinulosum* foi realizado empregando métodos mecânicos (agitação em vórtex e sonicação) associados ao tratamento químico em uma concentração de 50g/L (biomassa/solvente) com uma das diferentes metodologias de extração com solventes orgânicos.

2.5.1.1 Lise celular empregando vórtex , seguido de por agitação associado a solventes

A biomassa seca (1g) foi adicionada de 20ml de um dos sistemas de extração seguido de homogeneização em vórtex, durante 15 min.

2.5.1.2 Lise de parede celular e membrana por sonicação associado a solvente

A biomassa seca (1g) foi adicionada de 20ml de um dos sistemas de extração e colocada em uma câmara de sonicação (sonicador modelo SONOMATIC® da Jencons Cientific Limited), com potência de 70w a uma frequência de 45Hz na temperatura de 25°C durante 15 min.

2.5.2. Extração dos lipídeos totais

Os lipídeos totais foram extraídos utilizando quatro metodologias: a) Extração de acordo com o método de Manocha [16], onde a biomassa liofilizada (1g) foi submetida à extração de lipídeos por um sistema sequencial de solventes polares e apolares, empregando vórtex e sonicação como pré-tratamentos. Neste caso a biomassa foi submetida a extrações sucessivas com um sistema de solvente clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v). Ao final, os 60ml de extratos foram reunidos e evaporados através de rotaevaporador até a secura, sendo mantido em dessecador até peso constante. b) Na segunda metodologia a extração dos lipídeos totais foi segundo Pedersen [17], utilizando 1g de biomassa seca, homogeneizada em vórtex e sonicação com o sistema clorofórmio: metanol (1:1 v/v), tendo seu extrato (20ml) seco em rotaevaporador e mantido em dessecador até peso constante. c) O terceiro método foi o de Bligh & Dyer [18] utilizando como sistema solvente clorofórmio: metanol: água na proporção (1: 2: 0,8; v/v), posteriormente tendo sido recolhido seu extrato (20ml) e seco em rotaevaporador e mantido em dessecador até peso constante. d) O quarto método foi realizado utilizando também clorofórmio e metanol (2:1) de acordo com Folch [19]. Recebendo também as mesmas etapas consequentes da extração.

2.5.3 Processo de esterificação dos lipídeos

Para a obtenção dos ácidos graxos, a fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil-ésteres, segundo metodologia proposta por Metcalfe [20]. Um tubo de ensaio contendo aproximadamente 100mg de lipídeo, adicionado de 4ml uma solução de 0,5 M de hidróxido de sódio, com posterior aquecimento em banho Maria a 100°C, por 2 min, seguido de resfriamento em banho de gelo.

Após estabilização da temperatura, adição de 3ml da solução de trifluoreto de boro-metanol a 14%, posterior aquecimento 100°C, por 2 min. Em seguida, foi adicionado 4ml de solução saturada de cloreto de sódio, homogeneização e adição de 3ml de n-hexano para a separação das fases. É retirado uma alíquota da fase orgânica analisada em cromatógrafo gasoso.

2.5.4. Identificação dos ácidos graxos

A identificação e quantificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia em fase gasosa (CG). Esta análise foi realizada em cromatógrafo Agilent Technologies-7890A com injetor automático equipado com detector de ionização de chama, contendo coluna com pressão interna de 91.5 kpa e fluxo de 1ml/min. A temperatura inicial foi de 150°C por 5 min; aumentando até 240°C numa razão de 4°C min⁻¹ por 8 min. O gás hélio (1cm³min⁻¹) foi utilizado como gás de arraste. Os parâmetros de análise GC-MS: temperatura do injetor: 250°; interface: 250°; forno inicial: 150° por 5 min aumenta até 240° com taxa de 4° por 8 min e aumenta até 250° com taxa de 5° por 5 min. Controle de gás de arraste: hélio; modo de controle: Split; pressão interna da coluna: 91.5 kpa; fluxo da coluna: 1ml/min; velocidade linear: 38 cm/sec; split ratio: 1/110; fluxo total: 113,7 ml/min; MS Varredura scan de 40 até 450m/z; intervalo: 0,5 sec; Ionização eletrônica: 70eV.

2.5.5 Determinação da viscosidade dos lipídeos totais

Para a determinação da viscosidade absoluta dos lipídeos totais produzidos por *P. spinulosum* foi determinada a partir de 0,5mL da amostra em viscosímetro automático (Brookfield (Middleboro, MA, USA; TC 500) utilizando cilindro (spindle) de nº40. A amostra foi lida a rotação de 100rpm. O viscosímetro foi acoplado a um banho termostático, permitindo mensurar a viscosidade dos óleos a temperatura de 27,4°C e os resultados foram expressos em centipoise (cP).

3. RESULTADOS

3.1 Produção de biomassa por *Penicillium spinulosum*

Estudos iniciais foram realizados avaliando a produção de biomassa por *P. spinulosum* mantido sob as temperaturas de 20°C, 25°C e 30°C, com o objetivo de identificar a temperatura ótima para crescimento do fungo, nos substratos renováveis (óleo de soja pós-fritura e milhocina).

A influência da temperatura no crescimento de *Penicillium spinulosum* foi investigada neste estudo por ser este um fator que exerce grande influência no desenvolvimento de fungos filamentosos [21]. Associado a temperatura de cultivo dos fungos, está à composição do meio de cultivo que deve conter os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Neste contexto, o aproveitamento de resíduos industriais tem sido considerado uma das grandes temáticas do mundo moderno para enfrentar os desafios e reduzir os custos de produção biotecnológica [22,23].

O máximo rendimento de biomassa (19,9g/L) obtido neste trabalho por *Penicillium spinulosum* cultivado em meio constituído pelos resíduos industriais à temperatura de 20°C, foi superior ao rendimento de biomassa (15,8g/L) obtido por Nunes [24] utilizando o mesmo meio de cultivo e micro-organismo, com o diferencial o efeito da temperatura, bem como diferentes metodologias para extrair lipídeos, além de pré-tratamentos. Adicionalmente, rendimentos significativos de biomassa foram obtidos neste estudo após cultivo de *Penicillium spinulosum* à temperatura de 20°C (Tabela 1).

O estudo comparativo entre os dados obtidos neste trabalho em comparação com a literatura demonstra que o rendimento de biomassa de *P. spinulosum* cultivado em meio com resíduos agroindustriais a temperatura de 20°C foi superior aos resultados de rendimento dos estudos recentes com fungos filamentosos cultivados em meio alternativo, com substratos agroindustriais e nas mais diversas faixas de temperaturas, descritos pela literatura (Tabela 1).

Os resultados com a produção de biomassa por diferentes autores da literatura, os valores mais elevado foram obtidos no presente estudo, mesmo tendo sido submetido a diferentes temperaturas e fontes de carbono e nitrogênio.

3.2. Influência do pré-tratamento na biomassa produzida por *Penicillium spinulosum* utilizando fontes renováveis de origem industrial

As biomassas produzidas por *Penicillium spinulosum* nas três temperaturas (20, 25 e 30°C) foi acompanhada até 96h, com o objetivo de

identificar o tempo e temperatura ótima para crescimento máximo do fungo. Em seguida foram realizados os estudos com as metodologias de pré-tratamento da biomassa, comparando os dois processos: ultrassom e solvente e vórtex, agitação com solvente orgânico. Os estudos foram comparativamente avaliados comparativamente por quatro metodologias utilizadas para extrair os lipídeos(16,17,18 e 19).

Tabela 1. Produção de biomassa por *Penicillium spinulosum* cultivado meio residual contendo diferentes temperaturas comparados com os registros da literatura

Micro-organismos	Substratos	Temp. (°C)	Biomassa (g/L)	Referências
<i>Penicillium spinulosum</i>	Milhocina 5% e óleo de soja pós-fritura 3%	20	19,9	Neste estudo
<i>Penicillium spinulosum</i>	Milhocina 5% e óleo de soja pós-fritura 3%	25	15,8	Neste estudo
<i>Penicillium spinulosum</i>	Milhocina 5% e óleo de soja pós-fritura 3%	30	14,5	Neste estudo
<i>Aspergillus oryzae</i>	Água Residual de Planta de Amido	35	9.5	Souza Filho, Zamani e Taherzadeh (2018) [25]
<i>Rhizopus oryzae</i>	Água Residual de Planta de Amido	35	9,5	Souza Filho, Zamani e Taherzadeh (2018)[25]
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Glicose	28	15	Faka et al.[26]
<i>Rhizopus oryzae</i>	Xilose	35	4.3	Yang et al. (2017)[27]
<i>Mucor indicus</i>	Frutose	30	4.7	Satari et al (2016)[28]
Fungo oleaginoso de mangue	Glicose	30	6.4	Khot et al. (2012)[29]
<i>Penicillium sp</i>	Óleo de oliva			Papanikolaus et al. (2011)[30]

<i>Aspergillus sp</i>	Óleo de oliva	Papanikolaus et al. (2011) [30]
------------------------------	---------------	---------------------------------

3.3 Produção de lipídeos totais por *P. spinulosum*

A Tabela 2 apresenta os diferentes rendimentos de lipídeos totais extraídos da biomassa produzida após cultivo de *P. spinulosum* no meio constituído por milhocina (5%) e óleo de soja pós fritura (3%) nas temperaturas de 20, 25 30°C e por diferentes metodologias. Considerando que [32] afirmam que micro-organismos oleaginosos são os que possuem potencial para acumular mais de 20% de lipídeos em sua biomassa, neste trabalho conclui-se que *P. spinulosum* é um fungo oleaginoso capaz de acumular aproximadamente 68% dos lipídeos à temperatura de 25°C, empregando a metodologia vórtex/agitação e extração com solventes orgânicos.

Tabela 2. Rendimento do teor de lipídeos totais obtido de *P. spinulosum* após cultivo em diferentes temperaturas, pré-tratamentos e métodos de extração.

Métodos	Temperaturas/ Condições Lipídeos (%)					
	20° C		25° C		30° C	
	Sonicação	Vórtex*/ Agitação	Sonicação	Vórtex*/ Agitação	Sonicação	Vórtex*/ Agitação
Manocha et al., 1980	64,50	67,02	64,90	67,80	54,30	57,08
Pedersen (1962)	48,01	55,80	45,80	53,03	50,03	57,10
Bligh & Dyer (1959)	18,20	20,80	22,40	24,80	25,80	29,02
Folch et al., (1959)	50,10	54,90	52,30	55,60	40,90	46,50
Sonicação=	Agitação*= Agitação/vortex.					

A avaliação do método de ruptura celular da biomassa de *P. spinulosum* foi investigada através de pré-tratamento por dois métodos: ultrassom e solvente orgânico e vórtex seguido de agitação com solventes orgânicos. Para a obtenção do referido rendimento de lipídeos totais, o método de rompimento celular (vórtex, agitação associado a solventes orgânicos), com a finalidade de

identificar a condição mais promissora. Neste sentido, os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.

Adicionalmente, existiu um resultado surpreendente de rendimento de lipídeos totais (67,80%) **que** foi obtido após cultivo do fungo a temperatura de 25°C, usando a metodologia de Manocha et al [16]. Contudo, estudos foram realizados comparativamente com as quatro metodologias, avaliando também os pré-tratamentos, em função da biomassa e quantidade de lipídeos acumulados, como apresentado nas Tabelas 3-A e 3-B, respectivamente.

Mais uma vez, observou-se que quando se trata de lipídeos em mg/g de biomassa os resultados promissores indicam que a condição de crescimento na temperatura de 20 °C oferece maior rendimento de lipídeos, em ambos pré-tratamentos utilizados (Tabela 3-A). Contudo, a metodologia que oferece maior rendimento em todas as situações estudadas é a descrita por Manocha et al[16]. Por outro lado, a metodologia de Bligh & Dyer [18] em ambos os pré-tratamentos da biomassa apresentou baixos rendimentos (Tabelas A e B).

Tabela 3-A. Habilidade de *Penicillium spinulosum* na conversão de biomassa (g/L⁻¹), acumulação de lipídeos (mg/g) sob diferentes temperaturas e lipídeos totais (%) com pré-tratamento por vórtex/agitação com solventes usando quatro metodologias

METODOLOGIAS	TEMPERATURA °C/ BIOMASSA (g L ⁻¹)		LIPÍDEOS (mg/g de biomassa)	TOTAL LIPID (%)
	20° C	25° C		
Manocha et al.[16]	19.90	15.80	13.33	67.02
	15.80	14.50	10.71	67.80
	14.50	19.90	8.27	57.00
Pedersen [17]	19.90	15.80	11.10	55.80
	15.80	14.50	8.37	53.03
	14.50	19.90	8.28	57.10
Bligh & Dyer [18]	19.90	15.80	4.13	20.80
	15.80	14.50	3.91	24.80
	14.50	19.90	4.20	29.02
Folch et al., [19]	19.90	15.80	10.9	54.90
	15.80	14.50	8.78	55.60
	14.50	19.90	6.74	46.50

Tabela 3-B. Habilidade de *Penicillium spinulosum* fna conversão de biomassa (g/L⁻¹), acumulação de lipídeos (mg/g) sob diferentes temperaturas e lipídeos totais (%)com pré-tratamento por ultrassom e extração dos lipídeos usando quatro metodologias

METODOLOGIA	TEMPERATURA °C/ BIOMASSA	LIPÍDEOS	LIPÍDEOS TOTAIS
-------------	-----------------------------	----------	--------------------

	(g L ⁻¹)		(mg/g de biomassa)	(%)
Manocha et al.[16]	20° C	19.9	12.83	64.50
	25° C	15.8	10.25	64.90
	30° C	14.5	7,87	54.30
Pedersen [17]	20° C	19.9	9.55	48.01
	25° C	15.8	7.24	45.80
	30° C	14.5	7.25	50.03
Bligh & Dyer [18]	20° C	19.9	3.62	18.20
	25° C	15.8	4.21	22.40
	30° C	14.5	3.74	25,80
Folch et al., [19]	20° C	19.9	9.97	50.10
	25° C	15.8	8.26	52.30
	30° C	14.5	6.05	40.90

3.3 Perfil dos ácidos graxos de *P. spinulosum*

Os resultados demonstraram que perfil lipídico obtido a partir de *P. spinulosum* não variou em função das temperaturas testadas. Além disso, foi observado que os ácidos graxos dominantes foram os ácidos linoleico, oleico e palmítico (Tabela 4). Assim, o lipídeo obtido de *P. spinulosum* possui quantidades significativas de ácido oleico e, portanto, considerado um promissor micro-organismos para a produção de biodiesel [34 26].

Por outro lado, foi identificado que o rendimento de ácido linoleico deste estudo é similar ao teor do ácido oleico presente na composição do óleo de soja (constituição do óleo de soja: ácido linoleico 53,0% e oleico 24.9%) e similar ao do óleo de girassol, (ácido linoleico 52,8% e oleico 20.6%) [27,28] Contudo, o perfil de ácidos graxos obtido neste trabalho com *P. espinulosum* apresenta rendimento superior de ácido oleico, garantindo desta forma elevada estabilidade oxidativa.

Tabela 4. Composição em ácidos graxos dos lipídeos isolados pelo método de Manocha et al. [16] a partir da biomassa produzida por *Penicillium spinulosum* UCP 1347, em diferentes temperaturas

*TR	Nome Comum	Número de Carbono	Temperatura de Crescimento (°C)/ Ácido graxo (%)		
			20°C	25°C	30°C
16.00	Ácido Palmítico	C16:0	9,00	7,42	8,17
20.23	Ácido Estéárico	C18:0	3,40	2,85	3,17

20.36	Ácido Oléico	C18:1	36,58	35,00	36,31
20.80	Ácido Linoléico	C18:2	5,21	53,54	49,82
20.80	α - Ácido linolênico	C18:3	0,78	0,76	1,60

*TR = Tempo de Retenção

3.4 Influência da temperatura na viscosidade dos lipídeos totais

Um dos parâmetros mais relevantes para a avaliação das características do biodiesel é a identificação da viscosidade dos óleos e gorduras utilizados como matéria-prima [35 29]. Neste contexto, a viscosidade aparente dos lipídeos totais produzido por *Penicillium spinulosum* em meio constituído por milhocina (5%) e óleo de soja pós- fritura (3%) nas diferentes temperaturas (20 e 25°C) foram similares conforme demonstra a Tabela 5. Contudo, o valor de viscosidade aparente mais elevado foi observado com o lipídeo microbiano (13,2cP) produzido na temperatura de 30°C.

Tabela 5. Viscosidade do lipídeo microbiano produzido por *Penicillium spinulosum* em meio constituído por milhocina (5%) e óleo de soja pós fritura (3%) nas diferentes temperaturas

Temperatura de crescimento do fungo (°C)	Centipoise-cP
20	0,95
25	0,92
30	13,2

5. CONCLUSÕES

O potencial biotecnológico da nova linhagem de *Penicillium spinulosum* UCP1347 foi avaliado demonstrando as condições ideais para a produção máxima de lipídios e biomassa crescida é de 25° C, com de 67,8% de lipídeos totais. Contudo, avaliando a importância do conteúdo lipídico em relação à biomassa produzida a condição na temperatura de 20° C é considerada a temperatura ideal para a produção de biomassa rica em lipídeos. O estudo GC-MS revelou que o ácido graxo oleico é predominante a 20° C, enquanto que, ambos ácidos graxos oleico e linoleico são predominantes a 25° C, como também

ocorre ácido palmítico, esteárico e linolênico na composição do lipídeo obtido da biomassa crescida a 25° C. Portanto, o fungo oleaginoso, *P. spinulosum* UCP1347 demonstrou excelente atividade metabólica na conversão de óleo soja pós-fritura e milhocina (resíduo da indústria de milho) em biomassa rica em lipídeos. A produção de biomassa enriquecida pelo acúmulo de lipídios do *P. spinulosum* UCP1347 apresenta duas alternativas promissoras tanto a 20° C, como a 25° C para na produção de biodiesel. Adicionalmente, o aumento da viscosidade dos lipídeos microbianos obtidos de biomassa crescida a 30°C, demonstra a necessidade de estudos mais aprofundados para o potencial uso como biolubrificantes.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não existir conflito de interesses

Agradecimentos

Os autores são gratos aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FACEPE, pelo apoio financeiro, além da Universidade Católica de Pernambuco, pelo uso dos Laboratórios do Núcleo de Pesquisas Ambientais e Biotecnologia.

Referencias

- [1] Ortenzio, Ygor Tadeu et al. Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171), v. 5, n. 1, 2015.
- [2] Mohamed G.; Ayadi, I.; Belhassen, A.; Gargouri, A.; Belghith, H.. Single cell oil production by *Trichosporon cutaneum* and lignocellulosic residues bioconversion for biodiesel synthesis. Process Safety and Environmental Protection, v 113, p 292-304, 2018.
- [3] Beopoulos, A. et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. Progress in lipid research, v. 48, n. 6, p. 375-387, 2009.
- [4] Al-Hawash, A.; LI, S.; Zhang, X.; Zhang, X.; Fuying, M. A. Productivity of γ -Linoleic acid by oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata* using a pulsed high magnetic field, Food Bioscience, <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.10.007>
- [5] Li, Ning; Zong, Min-Hua. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 66, n. 1, p. 43-54, 2010.

- [6] Samson, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, v. 70, p. 159-183, 2011.
- [7] Lang, X.; Dalai, A.; Bakhshi, N. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource Technology*, 80, 53–62, 2001.
- [8] Dabdoub, Miguel J. et al. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009
- [9] Carvalho, A.K.F. et al. Transesterificação enzimática de Single Cell Oil (SCO) de *Mucor circinelloides* para a produção de biodiesel. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v. 1, n. 2, p. 11987-11992, 2015
- [10] Shimi, I. R.; Singh, J.; Walker, T. K. The component fatty acids of *Penicillium spinulosum* fat. *Biochemical Journal*, v. 72, n. 1, p. 184, 1959.
- [11] Papanikolaou, S. et al. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenergy*, v. 32, n. 1, p. 60-71, 2008.
- [12] Prigione, V.; Trocini, B.; Spina, F.; Poli, A.; Romanisio, D.; Giovando, S.; Varese, G.C. Fungi from industrial tannins: potential application in biotransformation and bioremediation of tannery wastewaters. *Applied Microbiology Biotechnology*, 102, 9, 4203–4216, 2018.
- [13] Pant, D.; Giri, A.; Dhiman, V. Bioremediation Techniques for E-waste Management. *Waste Bioremediation, In: Energy, Environment, and Sustainability*. Springer, 105-125, 2018
- [14] Avendaño-Morales, B.; Hernández-Martínez, R.; Valdez-Vazquez, I. Lipid production by *Penicillium decumbens* from the direct conversion of seaweed bagasse. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 16, n. 3, 2017.
- [15] Banu, B. Sheerin et al. Screening and identification of oleaginous moulds for lipid production. *Journal of Environmental Biology*, v. 38, n. 4, p. 697, 2017.

[16] **Justificativa da Aderência ao Tema Estratégico:**

Para aperfeiçoar o desenvolvimento do complexo industrial da saúde, os inibidores da HMG-CoA redutase são produtos estratégicos que precisam ser produzidos a nível nacional. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é apresentar um bioprocesso eficiente e sustentável para a produção de inibidores da HMG-CoA redutase por *Aspergillus terreus* utilizando substratos agroindustriais como fontes renováveis e de baixo custo, contribuindo com os requisitos essenciais da sustentabilidade.

RESULTADOS ESPERADOS

-Produzir inibidores da HMG-CoA redutase que possam ser utilizados no tratamento de dislipidemias, com potencial de utilização na indústria farmacêutica;

-Estabelecer uma condição ótima de produção considerando variáveis como pH, temperatura, agitação, e concentrações de carbono e nitrogênio para aumento de escala para biorreator;

--Geração de reserva de direitos autorais da inovação dos bioprocessos empregados;

-Viabilizar a produção dessa biomolécula utilizando resíduos agroindustriais como meios econômicos, diminuindo assim os custos na produção e possibilitando gerar estratégias para competir em nível comercial, além de minimizar as contaminações ambientais e valorizar o patrimônio genético;

VIABILIDADE TÉCNICA

As atividades propostas neste projeto serão desenvolvidas no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco., que apresenta infraestrutura física, com laboratórios estruturados e com recursos financeiros, para a execução do projeto. Os equipamentos e reagentes necessários estão todos disponíveis, além disso, apresenta recursos relacionados a biblioteca e informatização.

- [20] Metcalfe, L. D.; Schmitz, A. A.; Pelka, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical chemistry*, v. 38, n. 3, p. 514-515, 1966.
- [21] Maia, F.G. M.; Armesto, C.; Zancan, W.A.; MAIA, J.B.; Abreu, M.S.. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. *Biosci. J.*, v. 27, n. 2, p. 205-210, 2011.
- [22] Van Der Merwe, M.P. R.; Badenhorst, J.; Britz, T. J. Fungal treatment of an edible-oil-containing industrial effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, n. 6-7, p. 947, 2005.
- [23] Souza Filho, P.F., Zamani, A.; Taherzadeh, M.J. Edible protein production by filamentous fungi using starch plant wastewater. *Waste biomass valor.* (2018). p 1-10.
- [24] Santos, Patrícia Nunes dos et al. Produção simultânea de biossurfactante e lipídeos por *penicillium spinulosum* (UCP1347) utilizando resíduos agroindustriais. 2016.
- [25] Souza Filho, M.; Nair, R.B.; Andersson, D.; Lennartsson, P.R.; Taherzadeh, J. Vegan-mycoprotein concentrate from pea-processing industry byproduct using edible filamentous fungi. *Fungal Biology Biotechnology*, 2,5, 5- ,2018.
- [26] Fakas, S.; Milan, M C.; Papanikolaou, S.; Aggelis, G.; Komaitis, M.; Galiotou-Panayotou, M. c-Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources, *Bioresource Technology*, 99, 5986–5990, 2008.
- [27] Yang, I.; Li, X.; Lai, C.; Yimin Fan, Y.; Jia Ouyang, J.; Yong , Q. Fungal chitosan production using xylose rich of corn stover prehydrolysate by *Rhizopus oryzae*, *Journal Biotechnology & Agriculture and Environmental Biotechnology*, 31, 6, 2017.
- [28] Satari, B.; Karimi, K.; Taherzadeh, M.J.; Zamani, A. Co-Production of Fungal Biomass Derived Constituents and Ethanol from Citrus Wastes Free Sugars without Auxiliary Nutrients in Airlift Bioreactor. *Int J Mol Sci.* 17, 3, : 302- ,2016.
- [29] Khot, M.; Kamat, S.; Zinjarde, S.; Pant, A.; Chopade, B.; Ravikumar, A.

- Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. *Microbiology Cell Factories*, 11, 71, 1–13, 2012.
- [30] Papanikolaou, S.; Dimou, A.; S. Fakas, S.; P. Diamantopoulou, P.; Philippoussis, A.; Galiotou-Panayotou, M.; Aggelis, G. Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1138–1150, 2011.
- [31] Wynn, J. P. et al. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*, v. 147, n. 10, p. 2857-2864, 2001.
- [32] Knothe, G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy & Environmental Science*, v. 2, n. 7, p. 759-766, 2009.
- [33] Ramos, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource technology*, v. 100, n. 1, p. 261-268, 2009.
- [34] Vicente, G.; Bautista, A. L.; Rodríguez, A. R.; Gutiérrez, J.; Sádabaa, I.; Ruízváquez, M.; Torres-Martínez, S.; Garreb. V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 22–27, 2009.
- [35] Muhammad A. Islam, Marie Magnusson, Richard J. Brown, Godwin A. Ayoko, Md. Nurun Nabi And Kirsten Heimann. Microalgal Species Selection for Biodiesel Production Based on Fuel Properties Derived from Fatty Acid Profiles. *Energies* 2013, 6, p. 5676-5702; doi:10.3390/en6115676.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- O *Penicillium spinulosum* UCP 1347, isolado de solo da Caatinga de Pernambuco (Brasil) demonstrou potencial biotecnológico na conversão dos resíduos agroindustriais milhocina e óleo de soja pós-fritura como substratos na acumulação de óleo microbiano;
- A maior conversão dos substratos para produção de biomassa por *P. spinulosum* ocorre quando a fermentação é mantida à temperatura de 20°C;
- No entanto, o estudo comparativo de métodos de pré-tratamento da biomassa sugere a biomassa produzida temperatura de 25°C com maior acumulação de lipídeos totais;
- O estudo com métodos de pré-tratamento da biomassa indicou que vórtex, seguido de agitação com solventes orgânicos possibilita maior quantidade de lipídeos totais;
- As avaliações entre quatro diferentes métodos de extração de lipídeos por solventes orgânicos indica maior solubilização dos lipídeos pelo método de Manocha et al. (1980);
- O estudo por GC-MS revela predominância do ácido graxo linoleico, seguido dos ácidos palmítico, oléico, esteárico e linolênico na composição do lipídeo obtido da biomassa crescida a 25° C;
- *P. spinulosum* UCP1347 uma linhagem promissora para a produção de biodiesel, e
- Adicionalmente, o aumento da viscosidade dos lipídeos microbianos obtidos de biomassa crescida a 30° C, demonstra potencial para uso como biolubrificantes.

ANEXOS

Journal Title

Concise and Informative Article Title

Firstname M. I. Lastname,¹ Firstname A. Lastname,² and Firstname B. Lastname^{1,2}

¹ Department, Institute, City ZIP/Post code, Country.

² Department, Institute, City ZIP/Post code, Country.

Correspondence should be addressed to Firstname B. Lastname;
lastname@institution.edu

Abstract

The abstract should be a single, self-contained paragraph which summarises the manuscript. Ideally it will provide a brief context for the study, before describing the scientific approach and some key results in a qualitative manner. It should finish with a sentence to describe the implications for the field. The abstract must not include references, figures or tables.

Introduction

The introduction should be succinct, with no subheadings. Limited figures may be included only if they are truly introductory and contain no new results.

Materials and Methods

The materials and methods section should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It may be divided into headed subsections if several methods are described.

Results and Discussion

Subheadings

The results and discussion may be presented separately, or in one combined section, and may optionally be divided into headed subsections.

Advice on Equations

Equations should be provided in a text format, rather than as an image. Microsoft Word's equation tool is acceptable. Equations should be numbered consecutively, in round brackets, on the right-hand side of the page. They should be referred to as Equation 1, etc. in the main text.

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (1)$$

Advice on Figures

At the point of submission, authors may provide all figures embedded within the manuscript at a convenient break near to where they are first referenced or, alternatively, they may be provided as separate files. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Where possible, figures should be displayed on a white background. When preparing figures, consider that they can occupy either a single column (half page width) or two columns (full page width), and should be sized accordingly. All figures must have an accompanying caption which includes a title and, preferably, a brief description (see Figure 1).

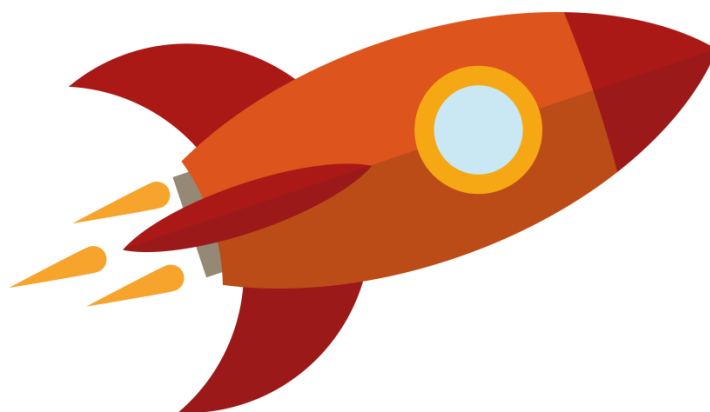


Figure 1: Basic rocket ship design. The rocket ship is propelled with three thrusters and features a single viewing window. The nose cone is detachable upon impact.

The caption can also be used to explain any acronyms used in the figure, as well as providing information on scale bar sizes or other information that cannot be included in the figure itself. Plots that show error bars should include in the caption a description of how the error was calculated and the sample size (see Figure 2).

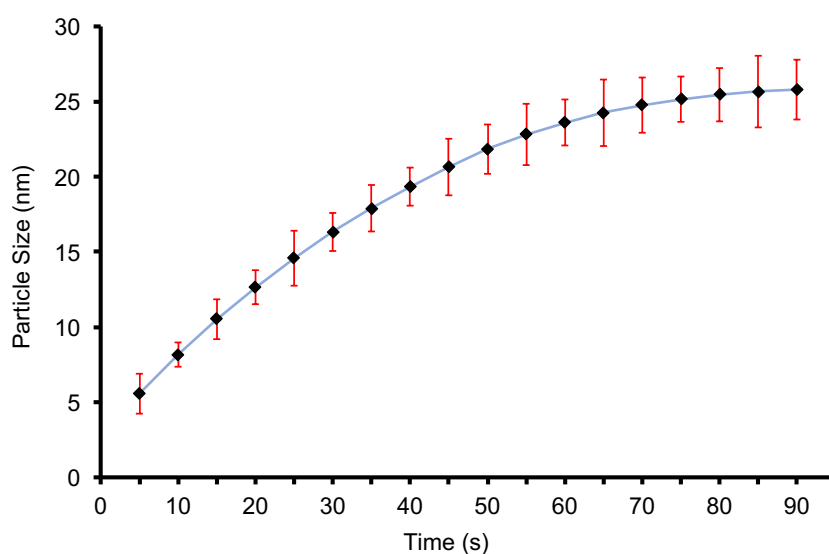


Figure 2: Plot of nanoparticle size with respect to time, recorded over a 90 s period. The error bars represent the standard deviation of measurements for 20 particles in five separate sample runs ($n = 100$).

If a figure consists of multiple panels, they should be ordered logically and labelled with lower case roman letters (i.e., a, b, c, etc.). If it is necessary to mark individual features within a panel (e.g., in Figure 3a), this may be done with lowercase Roman numerals, i, ii, iii, iv, etc. All labels should be explained in the caption. Panels should not be contained within boxes unless strictly necessary.

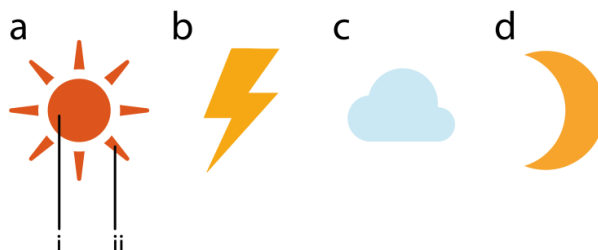


Figure 3: Representations of some common weather symbols. (a) The sun with (i) core, and (ii) rays. (b) Thunder bolt. (c) Cloud. (d) Moon.

Upon acceptance, authors will be asked to provide the figures as separate electronic files. At that stage, figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of at least 300 dpi resolution, unless due to the limited resolution of a scientific instrument. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Advice on Tables

Every table must have a descriptive title and, if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used (see Table 1). Tables should be cited consecutively in the text.

Table 1: Temperature and wildlife count in the three areas covered by the study.

Location	T [° C]	Turtles	Sharks	Octopuses	Starfish
Blue Lagoon	21.2	5	3	4	543
Regent's Canal	5.2	8	0	24	312
Shark Bay	12.8	4	7	9	122

Conclusions

The Conclusions section should clearly explain the main findings and implications of the work, highlighting its importance and relevance.

Data Availability

A data availability statement is compulsory for research articles and clinical trials. Here, authors must describe how readers can access the data underlying the findings of the study, giving links to online repositories and providing deposition codes where applicable. For more information on how to compose a data availability statement, including template examples, please visit:

<https://www.hindawi.com/research.data/#statement>.

Conflicts of Interest

This section is compulsory. A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts. If there is no conflict of interest, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.”

Some of the information you choose to provide here may constitute your “sensitive personal data”. Please read our [Privacy Policy](#) for further information on how we handle your personal data.

Funding Statement

Authors should state how the research and publication of their article was funded, by naming financially supporting bodies followed by any associated grant numbers in square brackets.

Acknowledgments

An Acknowledgements section is optional and may recognise those individuals who provided help during the research and preparation of the manuscript.

Supplementary Materials

If Supplementary Materials are provided (e.g., audio files, video clips or datasets) they should be described here. Note that authors are responsible for providing the final Supplementary Materials files that will be published along with the article, which are not modified by our production team. You should remember to reference the Supplementary Materials’ contents at appropriate points within the manuscript. We recommend citing specific items, rather than referring to the Supplementary Materials in general, for example: “See Figures S1-S10 in the Supplementary Material for comprehensive image analysis.”

References

References will be reformatted in house, there is no need to adhere to a specific style at the point of submission. Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All citations in the text must be numbered consecutively in square brackets, before any punctuation, for example, “as discussed by Smith [1],” and “as discussed elsewhere [2,3].” All uncited references will be automatically removed. The references should not contain footnotes. For your information, our citation style is:

[x] Author initials and surname, “Title in sentence style,” Journal title, vol. (volume number), no. (issue number), pp. (page numbers separated by an en-dash), Year.

For example:

- [1] J. D. Watson and F. H. C. Crick, “A structure for deoxyribose nucleic acid,” *Nature*, vol. 171, no. 4356, pp. 737–738, 1953.

For articles with six or more authors, the first three authors are listed followed by ‘et al.’. When journals use only article numbers, no page numbers are necessary. For example:

- [2] B. P. Abbott, R. Abbott, T. D. Abbott et al., “Observation of Gravitational Waves from a Binary Black Hole Merger,” *Physical Review Letters*, vol. 116, no. 6, Article ID 061102, 2016.