



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**APROVEITAMENTO DO GLICEROL RESIDUAL NO
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Mortierella isabellina* NA
PRODUÇÃO E ACUMULAÇÃO DE LIPÍDEOS**

MANUELA CRISTINA MOTA LINS

RECIFE, 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



MANUELA CRISTINA MOTA LINS

**APROVEITAMENTO DO GLICEROL RESIDUAL NO
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Mortierella isabellina* NA
PRODUÇÃO E ACUMULAÇÃO DE LIPÍDEOS**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos - Takaki

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Norma Buarque de Gusmão

RECIFE, 2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Lins, Manuela Cristina Mota

Aproveitamento do glicerol residual no potencial biotecnológico de *Mortierella isabelina* na produção e acumulação de lipídeos / Manuela Cristina Mota Lins. – Recife: O Autor, 2015.

129 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Galba Maria de Campos-Takaki

Coorientadora: Norma Buarque de Gusmão

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2015.

Inclui referências

1. Biodiesel 2. Fungos 3. Ácidos graxos I. Campos-takaki, Galba Maria de (orient.) II. Gusmão, Norma Buarque de III. Título

665.5384

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-312

APROVEITAMENTO DO GLICEROL RESIDUAL NO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Mortierella isabellina* NA PRODUÇÃO E ACUMULAÇÃO DE LIPÍDEOS

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Data de Aprovação: 26/ 02/ 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora/UNICAP)

Prof.a Dr.a Norma Buarque de Gusmão (Co-orientadora/UFPE)

Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta (UFPE)

Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco (UFRPE)

Profa. Dra. Kaoru Okada (UNICAP)

Profa. Dra. Celuta Sales Alviano (UFRJ)

Dedico este trabalho ao meu avô, Edil, (*in memoriam*) que sempre lutou pela educação de seus netos. Aos meus pais, Vania e Aduino, meus irmãos, tias, Glaura e Alice Maria e meu namorado, Henrique.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força em começar, continuar e concluir este Doutorado;

À minha família pelo apoio, nas pessoas de meu pai, Adauto, da minha mãe, Vania, e, meus irmãos Cecília e Edil, pelo incentivo e colaboração nos anos de estudo e, mesmo sem está presente comigo, sinto que estão intercedendo do céu por mim, meus avós Edil e Maria Alice; Ao meu noivo, Henrique Pessoa, pela compreensão nos momentos difíceis e apoio consolador;

A professora Dra. Galba Maria Campos-Takaki, minha orientadora, que finalmente me fez partir para uma nova etapa da minha vida, o tão sonhado Doutorado, pelo apoio, ajuda, paciência e encaminhamento científico;

À minha co-orientadora Profa. Dra. Norma Buarque Gusmão, por me mostrar o caminho das pedras e me conceder a oportunidade de integrar a Equipe de Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco, sob o comando da Profa. Galba Takaki;

Ao diretor do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), André Galembeck, pela autorização na execução de experimentos nos Laboratórios do CETENE;

Aos meus amigos do CETENE, que me acompanharam nesta trajetória de trabalho e de estudo – Isaac Martins, Aldenise Lisandra, Joana Alves, Cláudia Crasto, Maria do Livramento Lima, Francinete Carla, Alexandre Libanio, Roberta Sampaio;

Às minhas novas amigas da Pós-graduação e também pertencentes ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), que se tornaram para mim cúmplices, companheiras, formadoras de opinião, exemplos de vida, o meu muito obrigado a Jaceline Lima e Grayce Kelly Barbosa;

E, não poderia esquecer meus queridos estagiários, Bruno Campelo e Adriana Souza, sempre a postos a ajudar e torcendo pelo meu bom desempenho;

À Pós-graduação de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), nas pessoas de seus funcionários, Adenilda Lima, e professores, Ranilson Bezerra e Tereza Corrêa, por todo acolhimento e disponibilidade nas horas de sufoco;

À Coordenação de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa para realização do doutorado;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Micro-organismos oleaginosos demonstram amplo uso, considerando o potencial biotecnológico inovador, tendo em vista os aspectos: rápido crescimento, fácil adaptação e utilização em substratos alternativos, fontes de “single cell oil” e lipídeos. Os micro-organismos considerados oleaginosos apresentam conteúdo lipídico acima de 20% em sua biomassa de tri-acilglicerol. Considerando o potencial biotecnológico de *Mortierella isabellina* do filo Zygomycota, neste trabalho foi realizado estudos com meios de composição definida e alternativos, suplementados com glicerol residual (excedente da produção de biodiesel) e milhocina (resíduo do beneficiamento do milho), avaliando o perfil de crescimento, bem como a acumulação de lipídeos intracelulares (single cell oil) através de análises citoquímicas. Estudos foram realizados com a produção de lipídeos por crescimento submerso e posterior quantificação dos lipídeos totais e caracterização do perfil de ácidos graxos. Um planejamento experimental foi também realizado, avaliando a relação carbono:nitrogênio na formulação de um meio de cultura para produção de biomassa rica em lipídeos. A cinética de crescimento radial demonstrou que o fungo *Mortierella isabellina* se desenvolveu de forma eficiente nos meios Batata ágar e meio mínimo sintético descrito por Hesseltine & Anderson (SMM), sendo este último selecionado como base e suplementado com a associação de glicerol residual e milhocina na proporção de 1:1 em três concentrações 2, 4 e 8%. Observou-se que a concentração de 4% (glicerol residual e milhocina) permitiu maior velocidade de crescimento, com a presença de “single cell oil”, através da citoquímica. O fungo cultivado de acordo com planejamento fatorial de 2^2 (glicerol residual e milhocina) apresentou uma biomassa variando de 2,3g/L a 35,7g/L, observando-se um melhor resultado no ensaio com a concentração mais elevada de glicerol residual (8%) e menor concentração de milhocina (2%), enquanto na produção de lipídeos o rendimento foi de 75,2%. Os lipídeos produzidos demonstraram a seguinte composição: ácido palmítico (C16:0), linoléico (C18:2), oléico (C18:1), respectivamente, 21,8%, 44,5% e 23,2%. Contudo, ressalta-se que a composição química em ácidos graxos demonstra potencial para ser como matéria prima do biodiesel, tendo vista, a presença de ácidos graxos saturados e insaturados, além de triacilglicerol. Empregando o glicerol residual (8%), como única fonte de carbono no meio, por fermentação submersa o fungo *M. isabellina* apresentou maior produção de biomassa (20g/L), com os ácidos graxos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), oleico (C18:1), γ -linolênico (C18:3), sendo o ácido linoleico (C18:2) com maior porcentagem (60,1%). Os resultados obtidos com os estudos realizados demonstram uma composição estável dos lipídeos saturados e insaturados, semelhante à matéria prima vegetal, sendo considerado uma fonte potencial para produção de biodiesel.

Palavras chave: *Umbelopsis isabellina*. Glicerol residual. Milhocina. Biodiesel. Ácidos graxos insaturados.

ABSTRACT

Oleaginous microorganisms demonstrate widespread use, considering the innovative potential of biotechnology in view of the aspects: rapid growth, easy adaptation and use of alternative substrates, sources of "single cell oil" and lipids. The microorganisms have oleaginous considered lipid content above 20% of their biomass tri-acylglycerol. Considering the biotechnological potential of *Mortierella isabellina* of Zygomycota phylum, this work was carried out studies with defined composition and alternative media, supplemented with residual glycerin (surplus of biodiesel produção) and corn steep liquor (corn processing residue), evaluating the growth profile as well as the accumulation of "single cell oil" Sudan Black. Studies were performed with the production of lipids submerged growth and quantification of total lipids and characterization of fatty acid profile. An experimental design was also performed by assessing the carbon: nitrogen in the formulation of a growing medium for the production of biomass rich in lipids. The radial growth kinetics demonstrated that the fungus *Mortierella isabellina* developed efficiently in the media Agar Potato and Hesseltine and Anderson, the latter being selected as basis and supplemental residual glycerine and corn steep liquor (2, 4 and 8%). It was observed that the concentration of 4% (glycerine and corn steep liquor) allowed faster growth rate in the presence of intracellular lipids (single cell oil) by cytochemistry. The fungus in factorial design of 2² (residual glycerol and corn steep liquor) presented a biomass ranging from 2.3 g \ L to 35.7g \ L, observing a better result in the test with the highest concentration of residual glycerin (8%) and a lower concentration of corn steep liquor (2%). The lipid production yield was 75.2%. Lipids produced showed the following composition: palmitic acid (C16: 0), linoleic (C18: 2), oleic (C18: 1), respectively, 21.8%, 44.5% and 23.2%. However, it is noteworthy that the chemical composition of fatty acids demonstrates potential raw material for biodiesel, taking view, the presence of saturated and unsaturated fatty acids, and triacylglycerol. Employing the residual glycerol (8%) as the sole carbon source in the middle, submerged fermentation fungus *M. isabellina* showed higher biomass production (20g / L), with myristic fatty acids (C14: 0), palmitic (C16 : 0), oleic (C18: 1), γ - linolenic (C18: 3), linoleic acid (C18: 2) with a greater percentage (60.1%). The results of the studies show a stable composition of saturated and unsaturated lipids, like the vegetable raw material, whereas the chemical composition of the fatty acids of biodiesel.

Keywords: *Umbelopsis isabelina*. Residual glycerol. Corn steep liquor. Lipids. Fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Estrutura Molecular Típica dos Triacilgliceróis	12
Figura 2: Biossíntese de Lipídeos, com Limitação de Nitrogênio	24
Figura 3: Produção de Biodiesel a Partir da Transesterificação de Óleo Vegetal.....	28
Figura 4: Estrutura da Molécula de Glicerol.....	36
Figura 5: Esquema da Produção de Lipídeos a Partir do Glicerol	38
Figura 6: Constituintes do Grão de Milho.....	42
Figura 7: Ilustração do Esporangióforo, Esporos e Esporângio da Espécie <i>U. Isabellina</i>	47

CAPÍTULO II

Figura 1. Cinética de crescimento do fungo <i>Mortierella isabellina</i> crescida nos meios de composição definida Ágar Batata e Hesseltine & Anderson ágar durante 264 horas.	73
Figura 2. Cinética de crescimento fungo <i>Mortierella isabellina</i> em meio sólido com base de Hesseltine & Anderson ágar, suplementado com glicerol residual e milhocina em diferentes concentrações.....	74
Figura 3: Observação macroscópica do fungo <i>M. isabellina</i> crescido em meios de cultura (A) Batata Dextrose Ágar (BDA), e meio sintético para Mucorales descrito por Hesseltine e Anderson, (1957) (H&A).....	76
Figura 4: Observação macroscópica do fungo <i>M. isabellina</i> crescido em meios de cultura suplementados com glicerol residual e milhocina nas concentrações (A) (2%), (B) (4%) e (C) (8%).....	76
Figura 5. Observação do fungo <i>Mortierella isabellina</i> em microcultivo nos meios de cultura Ágar Batata (A) e Hesseltine & Anderson ágar (B), (aumento 100x).....	78
Figura 6. Observação do fungo <i>Mortierella isabellina</i> em microcultivo nos meios de cultura alternativo tendo como base o meio sólido de Hesseltine & Anderson ágar adicionado de glicerol residual e milhocina em diferentes concentrações (A) glicerol e milhocina (2%), (B) glicerol e milhocina (4%) e (C) glicerol e milhocina (8%), com aumento de 100x.....	78
Figura 7. Eletromicrografias de <i>M. isabellina</i> cultivada em meio de composição definida para Mucorales (meio de cultura proposto por Hesseltine & Anderson (1957). (A), meios de	

composição definida suplementados com glicerol residual e milhocina, em três concentrações 2% (B), 4% (C), 8% (D)..... 79

Figura 8. Citoquímica do fungo *Mortierella isabellina* cultivada no meio em meio de composição definida para Mucorales (A), suplementados com glicerol residual e milhocina a 2% (B), 4% (C) e 8% (D), com aumento de 100x..81

CAPÍTULO III

Figura 1: Produção de Biomassa e Produtividade de lipídeos pelo fungo *M. isabellina* em meios utilizando glicose\ glicerol residual e milhocina, de acordo com Planejamento Fatorial Completo 2^2 96

Figura 2: Diagramas de Pareto para planejamento fatorial completo 2^2 , tendo como variáveis independentes as concentrações de glicose, glicerol residual e milhocina e como variável resposta a concentração de biomassa (massa seca) e lipídeos totais produzidos por *M. isabellina*. Os diagramas (A) e (B) referem-se a produção de biomassa utilizando como substratos glicose e glicerol residual, respectivamente, enquanto (C) e (D) referem-se a produção de lipídeos totais utilizando glicose e glicerol residual, respectivamente.....99

Figura 3: Eletromicrografias da biomassa do fungo *M. isabellina* cultivada no Ensaio 3 de cada Planejamento estudado, em 8% de glicose\ glicerol residual e 2% de milhocina (A e B) micrografias do cultivo em glicose e milhocina, (C e D) micrografias do cultivo em glicerol residual e milhocina.....104

Figura 4: Eletromicrografias mostrando as diferenças de diâmetro em hifas cultivadas em glicose (A) e em glicerol residual (B).105

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 Composição de ácidos graxos (%) de algumas sementes oleaginosas	14
Tabela 2 Diferentes oleaginosas do brasil com potencial aplicação na produção de biodiesel	15
Tabela 3 Conteúdo de óleos de micro-organismos.....	21
Tabela 5 Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.	41

CAPÍTULO II

Tabela 1. Velocidade do crescimento radial de <i>Mortierella isabellina</i> e equações de Regressão Linear em meios de cultura sintéticos.....	73
Tabela 2. Velocidade do crescimento radial <i>Mortierella isabellina</i> e equações de Regressão Linear nos meio de cultura Hesseltine & Anderson, suplementado com glicerol residual e milhocina, em função do tempo	74

CAPÍTULO III

Tabela 1: Níveis e Valores dos Fatores do Planejamento Fatorial Completo 2 ² utilizando glicose ou glicerol residual como fontes de carbono e milhocina como fonte de Nitrogênio.	93
Tabela 2. Matriz decodificada do Planejamento Fatorial 2 ² e resultados correspondentes a biomassa (massa seca) e produtividade de lipídeos totais produzidos por <i>M. isabellina</i> , cultivada em glicose e milhocina.	97
Tabela 3. Matriz decodificada do Planejamento Fatorial 2 ² e resultados correspondentes a biomassa (massa seca) e produtividade de lipídeos totais produzidos por <i>M. isabellina</i> , cultivada em glicerol residual e milhocina.	97
Tabela 4. Perfil de Ácidos Graxos de <i>M. isabellina</i> (%) em diferentes meios de cultura, de acordo com o Planejamento Fatorial 1, utilizando glicose e milhocina.	102
Tabela 5. Perfil de Ácidos Graxos de <i>M. isabellina</i> (%) em diferentes meios de cultura, de acordo com o Planejamento Fatorial 2, utilizando glicerol residual e milhocina.	102

Tabela 6: Composição de ácidos graxos de plantas oleaginosas utilizados na produção de biodiesel.....	103
Tabela 7: Composição de ácidos graxos do lipídeo de <i>Mortierella isabellina</i> cultivada em meios de combinações diferentes.	103

CAPÍTULO IV

Tabela 1: Produção de biomassa e lipídeos pelo fungo <i>Mortierella isabellina</i> , em diferentes concentrações de substratos.	121
Tabela 2. Composição (%) de ácidos graxos do óleo extraído, proveniente da biomassa do fungo <i>Mortierella isabellina</i> cultivada em diferentes substratos.....	123

ABREVIATURAS

SCO - Single Cell Oil (Lipídeos microbianos)
ARA - Àcido Graxo Arachidônico
EPA - Àcido Graxos Eicosapentaenóico
DHA - Àcido Graxo Docosa-Hexaenóico
ATP - Adenosina Tri-fosfato
TAG – Triglicerídeo\ Triacilglicerol
PUFA - Ácidos Graxos Poliinsaturados
GLA - Àcido γ -linolênico
LB - Corpos Lipídicos
TCA – Ciclo Do Àcido Tricarboxílico
FAS - Complexo Enzimático Àcido Graxo Sintase
G3P - Glicerol-3-Fosfato
DHAP - Fosfato Di-Hidroxiacetona
FA - Àcido Graxo
ANP - Agência Nacional de Petróleo
FAME - Ésteres Metílicos de ácidos graxos
AGL - Ácidos Graxos Livres
SFA - Ácidos Graxos Saturados
MUFA – Ácidos Graxos Monoinsaturados
PUFA – Ácidos Graxos Poli-Insaturados
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Saitária
AMP - Adenosina Monofosfato
FAD - Adenosina Dinucleotídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVO	10
2.1. Específicos	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. Considerações Gerais: Lipídeos	11
3.1.1. Lipídeos vegetais	12
3.1.2. Lipídeos microbianos.....	16
3.1.2.1. Biossíntese	22
3.2 Biodiesel	26
3.2.1. Aplicação de óleos microbianos como matéria-prima para biodiesel	31
3.3. Resíduos agroindustriais	34
3.3.1. Glicerol residual.....	36
3.3.2. Milhocina	40
3.4. Reino Fungi.....	43
3.4.1. Filo Zygomycota.....	43
3.4.1. 1. <i>Mortierella isabellina</i> [<i>Umbelopsis isabellina</i> (Oudem.) Meyer & Gams 2003]..	46
4. REERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ARTIGO 1: Produção de óleo microbiano por <i>Mortierella isabellina</i> utilizando de glicerol residual e milhocina como substrates	66
ARTIGO 2: Produção de lipídeos pelo fungo <i>Mortierella isabellina</i> : matéria prima para biodiesel	87
ARTIGO 3: Produção de lipídeos e ácidos graxos a partir de biomassa do fungo <i>Mortierella isabellina</i> utilizando glicerol residual do biodiesel.....	112
CONSIDERAÇÕES FINAIS	129

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A produção de lipídeos microbianos (single cell oil: SCO) vem se apresentando como uma inovadora alternativa biotecnológica, podendo ser utilizados em indústrias alimentícias, farmacêuticas e energéticas, devido a capacidade que os micro-organismos oleaginosos possuem de sintetizar lipídeos, apresentar rápido crescimento e adaptar-se em diversos meios de cultivo e nos mais diferentes substratos (VICENTE et al., 2010, DONOT et al., 2014, PAPANIKOLAOU, AGGELIS, 2011; JIN et al., 2015).

Diversas variedades, de micro-organismos tais como: microalgas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras são definidos como oleaginosos, por apresentarem um conteúdo lipídico acima de 20% em sua biomassa seca, o gênero *Mortierella sp.* se destaca por apresentar em algumas espécies 86% de lipídeos (CHISTI, 2007; DEMAÏN et al., 2008; DU, 2008; LI et al., 2008; MENG et al., 2009; SILVA et al., 2009; RIVALDI et al., 2008; AMARAL et al., 2009; MOTA et al., 2009).

Os fungos filamentosos da ordem Mucorales, como *Mortierella sp.*, *Cunninghamella echinulata*, *Mucor rouxii*, *M. circinelloides*, *Mucor hiemalis*, são as espécies mais intensamente estudadas para a produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de grande interesse econômico, como os ácidos γ -linolênico (C18:3), arachidônico (ARA) (C20:4), eicosapentaenóico (EPA) (C20:5) e docosa-hexaenóico (DHA) (C22:6) (WYNN et al., 2001; SILVA et al., 2003; AHMED et al., 2006; JEENNOR et al., 2006; CERTIK et al., 2006; DONOT, et al., 2014, JIN et al., 2015).

De acordo com Certik et al., (1999) e Dyal et al., (2005) estudos envolvendo a viabilidade da produção dos ácidos graxos por fungos filamentosos em escala industrial, envolve vários fatores tais como: tempo, quantidade de lipídeo obtido, rendimento do produto final e principalmente baixo custo de produção. Segundo Kennedy et.al., (1993) parâmetros como o balanço entre nitrogênio e carbono em meios de cultivo pré-definidos se fazem necessários pela própria fisiologia do micro-organismo. Porém, este aspecto pode tornar-se um sério problema, pois se o processo não for bem controlado, acarretará em uma maior adição de nutrientes em seu processo de produção, diminuindo a viabilidade para o escalonamento industrial. Assim,

observou-se que em baixas concentrações nitrogênio e alta de carbono os micro-organismos produzem maior quantidade de óleo.

Com base nestes parâmetros, a utilização de resíduos em cultivos de micro-organismos vem cada vez mais sendo empregada, visando a redução dos custos na geração de lipídeos microbianos e redução do descarte no meio ambiente. A aplicação de glicerol residual e a milhocina têm apresentado resultados satisfatórios no cultivo de fungos filamentosos oleaginosos, através da produção de biomassa rica em lipídeos poli-insaturados. Entre os micro-organismos, o fungo *Mortierella isabellina* cultivada em glicerol residual foi considerado uma potencial fonte de óleo como matéria-prima do biodiesel (CHISTI, 2007; DEMAIN et al., 2008; DU, 2008; LI et al., 2008; LI et al., 2008; MENG et al., 2009; SILVA et al., 2009; RIVALDI et al., 2008; AMARAL et al., 2009; MOTA et al., 2009; ECONOMOU et al., 2010; BELLOU et al., 2014).

A busca de espécies com potencial para produção de biodiesel torna-se um grande desafio. Então, a fim de sustentar a crescente demanda e aliviar a competição com a oferta de alimentos, uma vez que os micro-organismos podem assimilar carboidratos e acumular altos níveis de lipídeos microbianos, não precisam de terras cultiváveis, produzem ácidos graxos semelhantes aos vegetais, podem ser manipulados geneticamente e otimizados em laboratório, os lipídeos microbianos têm sido alvo de grande interesse como matéria-prima para biodiesel (KHOT et al., 2012).

As aplicações de fungos oleaginosos para produção de biodiesel são muito escassas embora tenham várias vantagens em relação as plantas e algas, eles podem ser facilmente cultivados em biorreatores, têm ciclos de vida curtos, exibem rápido crescimento, não são afetados por terras agricultáveis, luz ou variações climáticas, são mais fáceis de escalonar e têm a capacidade para utilizar uma grande variedade de fontes de energia de baixo custo, tais como a biomassa lignocelulósica e resíduos agroindustriais (KHOT et al., 2012; RATLEDGE, WYNN, 2002; PAPANIKOLAOU, AGGELIS, 2011; JIN et al., 2015).

2. OBJETIVO

Aproveitamento do glicerol residual, co-produto oriundo do processo de produção de biodiesel e milhocina, resíduo do beneficiamento do milho, por *Mortierella isabellina* visando a obtenção de biomassa e acumulação de lipídeos, como potencial fonte de matéria-prima para produção de biodiesel.

2.1. Específicos

- Avaliar o crescimento e a morfologia de *M. isabellina* em meios de composição definida e alternativos contendo resíduos agroindustriais;
- Observar através de análise ultra-estrutural o fungo crescido em meios de cultura de composição definida e alternativos;
- Observar a acumulação de lipídeos através de análise citoquímica de *M. isabellina* cultivada em meios de composição definida e contendo glicerol residual e milhocina;
- Otimizar as condições de produção de biomassa e lipídeos, através de planejamento fatorial completo, utilizando resíduos de glicerol e milhocina;
- Caracterizar bioquimicamente os lipídeos produzidos por *M. isabellina* cultivada em meios de cultura de acordo com o planejamento fatorial;
- Investigar a influência das concentrações de C:N, em meios de composição definida e alternativos na produção de biomassa, acumulação e composição de lipídeos;
- Comparar o perfil de ácidos graxos do fungo *M. isabellina*, cultivado em meios alternativos, com as composições das matérias-primas vegetais convencionais do biodiesel.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Considerações Gerais: Lipídeos

Segundo Lehninger et al., (2002) os lipídeos são basicamente constituídos por ácidos graxos que correspondem a uma cadeia carbônica apolar e um grupo carboxila polar, sendo representados pela fórmula geral RCOOH. E podem possuir de 4 a 36 átomos de carbonos e nenhuma ramificação. São atribuídos a eles os ácidos graxos e seus derivados: esteróides, terpenos, carotenóides e ácidos biliares, que apresentam em comum a solubilidade em solventes orgânicos, tais como: hexano, benzeno, clorofórmio e metanol, e insolubilidade em água. São um dos principais componentes de alimentos e estão presentes até mesmo nos chamados alimentos "sem gordura".

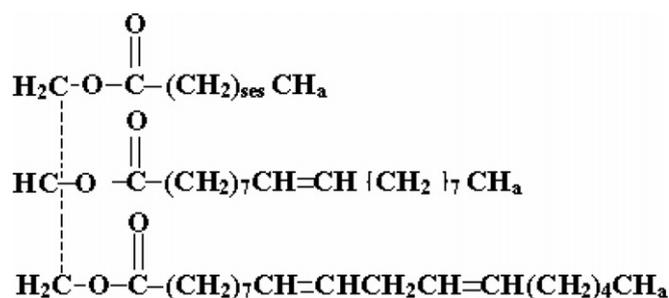
Os lipídeos de reserva são importantes no armazenamento de carbono. Comparando com os carboidratos, os lipídeos apresentam-se como uma forma mais reduzida de armazenamento na forma de carbono, tanto que a oxidação completa de 1g de lipídeo gera cerca de 9,3 Kcal de energia e produz mais ATP do que a oxidação da mesma quantidade de amido (2,8 kcal) (DELALIBERA, 2009).

Ocorrem mais de 20 tipos de ácidos graxos na natureza, e destes os ácidos palmítico, oleico e linoleico constituem aproximadamente 80% de óleos e gorduras (GUNSTONE et al., 2007).

Existem várias classes de lipídeos, todos possuindo características semelhantes e específicas, devido à presença de uma porção principal de hidrocarbonetos nas suas moléculas. Podendo ser classificados em três famílias principais: fosfolipídeos, glicolípidos (estrutura de membrana celulares) e triglicérides (TAGs) (lipídeos de reserva de energia). Mais de 80% a 85% de lipídeos são os triacilgliceróis (TAGs), ou lipídeos neutros, os quais ocorrem em muitos tipos de acordo com a identificação e as posições dos três ácidos graxos envolvidos e são os principais constituintes de óleos vegetais. Os triglicérides são apolares, constituídos de três ácidos graxos ligados através de ligações ésteres a uma molécula de glicerol (Figura 1). Os ácidos graxos podem variar no seu comprimento da cadeia de carbono e o número de ligações duplas. Aqueles com um único tipo de ácido graxo em todas as três ligações são chamados triacilgliceróis simples. Como

um exemplo, trimiristina, isolado a partir de noz-moscada, é composta de ácido mirístico (C14: 0) e glicerol. Quando os ácidos graxos são diferentes, os trigliceróis são complexos. Aqueles com uma ligação dupla entre os átomos de carbono são chamados monoinsaturados, e com mais de uma ligação dupla são chamados polinsaturados (CARIOCA et al, 2009; BALAT, BALAT, 2008; CHRISTIE, 1982; SHAHIDI, 2001; DONOT et al., 2014).

Figura 1: Estrutura molecular típica dos triacilgliceróis



Por outro lado, lipídeos polares são constituídos por fosfolipídeos e glicolipídeos, e sua hidrólise pode gerar três ou mais produtos, por conseguinte, eles são também conhecidos como lipídeos complexos. Os fosfolipídeos são os principais constituintes dos materiais da membrana celular. Um exemplo de um fosfolipídeo é lecitina de planta, que se encontra em muitas fontes de óleo vegetal. Glicolipídeos são constituídos de lipídeos conjugados com carboidratos, onde são encontrados em abundância em sistemas biológicos e alimentos. Lipídeos em alimentos existem em ambas as formas livres e conjugadas (CHRISTIE, 1982; KATES, 1990). O glicerol ou propano-1, 2,3-triol é um composto orgânico pertencente à função álcool. Esse composto está presente em vários lipídeos, e pode ser esterificado a uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos, formando respectivamente, monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos (RATLEDGE, 1986; SHAHIDI, 2001; TKACHENKO et al., 2013).

3.1.1. Lipídeos vegetais

Os triacilgliceróis tendem a ser a classe de lipídeo mais abundante em tecidos de armazenamento, tais como as sementes oleaginosas comercialmente importantes (FAHY et al, 2005).

Muitos tecidos de armazenamento em plantas têm amido como constituinte principal, em vez de lipídeos, em tubérculos e em maçãs glicolipídeos complexos e fosfolipídeos são os únicos

encontrados em níveis baixos. Em adição a esses lipídeos, esteróis, ésteres de esteróis, glicosídeos de esterol acilados, phitoglicolipídeos, ceramida, glucosilceramida, ácido fosfatídico, N-acilphosphatidilethanolamine, e fosfatidilserina, entre outros, podem ser encontrados. As sementes e tubérculos apresentam uma composição distinta (FAHY et al, 2005).

Tal como em tecidos animais, cada uma das membranas e organelas na folha tem uma composição lipídica característica. A membrana plasmática tem um elevado teor de fosfatidilcolina, enquanto que as mitocôndrias contêm cardiolipina. Uma outra região das plantas com uma composição distinta é a epiderme ou cutícula. Os lipídeos aqui tendem a ser ricos em ceras, e podem incluir cutina e suberina, que são poliésteres complexos de hidroxí ácidos graxos. Lipídeos de superfície foliar é formada de cera em grande parte não-polares (FAHY et al, 2005).

As composições de ácidos graxos dos óleos de sementes de importância comercial estão listados na Tabela 1. Óleo de milho, de girassol e de cártamo são de alto valor nutricional, uma vez que contêm quantidades apreciáveis do ácido graxo essencial - ácido linoleico (C18:2). Quantidades excessivas de ácido linolénico, como no óleo de soja, pode diminuir o valor comercial de um óleo, porque é então mais susceptível a problemas provocados por auto-oxidação. Por conseguinte, é uma prática industrial comum submeter o óleo a hidrogenação. Por outro lado, não existem tais problemas com azeite de oliva, um importante componente lipídico da dieta do "Mediterrâneo", com seu alto teor de ácido oleico. O óleo de palma contém uma maior proporção de ácidos graxos saturados, comparado com a maioria dos óleos de sementes. Colza é uma das poucas oleaginosas que podem ser cultivadas em climas setentrionais. Mesmo nativa, mas tende a ter um elevado teor de ácido erúcido (22: 1), o qual pode ter algumas propriedades que podem ser prejudiciais para o consumidor. No entanto, novas cultivares com níveis insignificantes deste componente ("Canola") são agora amplamente cultivadas. Óleo de semente de algodão e óleo de milho assemelham-se na sua composição, mas também contém pequenas quantidades de ácido graxo ciclopropeno, "estercúlico" ou 9,10-metileneoctadecenoico, estabelecendo propriedades tóxicas aos óleos e deve ser removido durante a refinação. Óleo de palmito e de coco são notáveis pelo um alto teor de ácidos graxos saturados de cadeia média. A visão torna-se mais complexa à medida que novos óleos de sementes geneticamente modificadas são introduzidos. Além disso, existem muitos óleos de semente que podem ter valor comercial limitado ou negligenciável, mas contêm ácidos graxos com grupos substituintes incomuns e são de grande interesse para os bioquímicos. As composições de ácidos graxos de tecidos de plantas podem variar com as

condições de cultivo climáticas e outros, e com o estágio de desenvolvimento do tecido, e ocorrer diferenças significativas entre mesmas espécies (HARWOOD, 1980, MOREAU et al., 1998)

Tabela 1 Composição de ácidos graxos (%) de algumas sementes oleaginosas

Ácidos Graxos	Sementes oleaginosas					
	Soja	Milho	Girassol	Cártamo	Oliva	Palma
Acido palmítico (16:0)	11	11	6	3	12	42
Acido esteárico 18:0	4	traço	3	1	2	4
Acido oleico (18:1)	23	25	12	11	72	38
Acido linoleico (18:2)	51	57	73	13	8	9
Acido y-linolênico (18:3)	7	1	1	9	1	
C ₂₀ -C ₂₂ *				55		

Acido araquídico, Acido araquidônico, Acido behênico, Acido erúxico. Fonte: FAHY et al., 2005

O mercado dos óleos vegetais é dominado pelo óleo de soja e palma. A produção de óleo de colza também está se expandindo devido principalmente ao aumento do cultivo na Europa e no Canadá de uma variedade com baixo teor de ácido graxo erúxico (20: 1), se tornando um óleo permitido para a fabricação de alimentos. A produção total de óleos vegetais e animais está aumentando em cerca de 3% ao ano (RATLEDG, 1986).

O índice médio de preços para os principais óleos é de cerca de US \$ 500-550 por t, o óleo de amendoim, por exemplo, é sempre significativamente superior à média de US \$ 800-850 por t. O óleo de mais alto preço, é sempre o azeite de oliva variando de US \$ 1.500-2.000 por t, dependendo da sua qualidade em termos de sabor. O consumo das gorduras animais (sebo e banha) vem caindo e são susceptíveis de cair ainda mais para cerca de 20% do total do mercado (RATLEDG, 1986).

No campo de lipídeos, as chances para produzir triacilgliceróis estão limitadas aos mais valorizados materiais. O óleo a granel de preço mais alto é a manteiga de cacau, cujo preço tem variado entre US \$ 8.000 a US \$ 3.000 por t ao longo da última década. Outros óleos muito valorizados são do mercado de cuidados com a saúde, onde os mais procurados são os que contêm os ácidos graxos poliinsaturados: ácido y-linolênico (18:3), ácido arachidônico (20:4), ácido eico-

sapentaenóico (20:5) e ácido docosa-hexaenóico (22:6). Muitos destes são encontrados em uma série de micro-organismos (RATLEDG, 1986).

Os lipídeos de mais altos preços são provavelmente, os compostos prostanóides incluindo as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Usados principalmente para o tratamento de distúrbios incomuns ou para fins experimentais (HIGASHIYAMA et al., 2002; JIN et al., 2008).

No Brasil, matérias-primas vegetais derivadas de óleos vegetais tais como soja, mamona, canola, palma, girassol e amendoim, entre outros, e as de origem animal, obtidas de sebo bovino, suíno e de aves, além de óleos utilizados em fritura são utilizados para a produção do biodiesel. Cada região no país possui diversas espécies oleaginosas, permitindo a realização de pesquisas relacionadas ao seu potencial para produção de biodiesel. Na tabela 2 estão apresentadas as diferentes fontes de materiais oleaginosos do Brasil com potencial aplicação na produção de biodiesel (ZHANG et al., 2003; LI, 2006; PUTTI et al., 2012).

Tabela 2 Diferentes fontes oleaginosas do Brasil com potencial aplicação na produção de biodiesel

Região	Óleos Vegetais disponíveis
Norte	dendê, babaçu e soja
Nordeste	babaçu, soja, mamona, dendê, algodão e coco
Centro-Oeste	soja, mamona, algodão, girassol, dendê e gordura animal
Sudeste	soja, mamona, algodão, girassol
Sul	soja, milho, canola, girassol e algodão

Assim, o Brasil ganha destaque por ser um país com um potencial produtor e explorador de biomassa para diversos fins como o alimentício, o químico e o energético, minimizando a emissão de gases poluentes nos centros urbanos (YAZDANI, GONZALEZ, 2007; DELATORRE et al., 2011).

3.1.2. Lipídeos microbianos

Os óleos microbianos, nomeadamente, óleos microbianos (SCO), os quais são lipídeos produzidos por micro-organismos oleaginosos, têm sido de interesse potencial para vários pesquisadores nas últimas décadas devido às suas importantes funções e características específicas. Tradicionalmente, os micro-organismos, que incluem bactérias, leveduras, fungos filamentosos e microalgas, que podem acumular mais de 20% de lipídeos do seu peso seco, podendo chegar a capacidade de acumular até 70% durante o período de estresse metabólico, são considerados micro-organismos oleaginosos (LIU, ZHAO, 2007; ZHENG et al., 2012; BELLOU et al., 2012; DONOT et al., 2014, JIN et al., 2015).

Os ácidos graxos constituídos com dezoito ou mais átomos de carbono e com mais de duas ligações duplas são sintetizados por organismos como algas, bactérias e fungos ou por plantas oleaginosas tais como soja, canola, girassol e gergelim (JUNQUEIRA et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2005).

A acumulação intracelular de óleo ocorre principalmente em leveduras, fungos filamentosos e microalgas. Os aspectos qualitativos e quantitativos da sua produção estão ligados à fase da cultura e aos parâmetros de crescimento da linhagem. De fato, a concentração e composição de lipídeo variam dependendo do tipo de micro-organismo e condições de cultura (por exemplo, temperatura, pH, tempo de crescimento, meio de cultura) (DONOT et al, 2014).

Cada família de micro-organismos tende a ter composições e características diferentes, e algumas classes de lipídeos são exclusivas de certos grupos. Além disso, os componentes de ácido graxo são muitas vezes muito diferentes dos de tecidos animais ou vegetais, e há alguns que são ainda encontrados em certas espécies raras de micro-organismos. A natureza e composição de lipídeos microbianos têm provado ser de grande valor taxonómico, e o seu estudo auxilia a compreensão da base molecular da evolução (RATLEDGE, WILKINSON, 1989).

Os triacilgliceróis, como nas plantas, são frequentemente mais abundantes em fungos e bactérias. Os esteróis são encontrados em leveduras, fungos filamentosos e algas, e são ausentes em bactérias. A maioria dos fosfolipídeos comuns em plantas e animais está presentes em micro-organismos. Por exemplo, a fosfatidil-etanolamina é muitas vezes a classe de lipídeo mais abundante em muitas espécies bacterianas e podem ser acompanhados por fosfatidil-serina, fosfatidil-glicerol, fosfatidil-inositol. Por outro lado, fosfatidilcolina não é um constituinte

presente em lipídeos microbianos, sendo raramente encontrados em bactérias, embora seja muitas vezes a principal classe de lipídeos em eucariotos. Em bactérias, especialmente fosfatidil-glicerol é amplamente distribuído e é encontrado na maioria dos gêneros, sendo o único fosfolipídeo nas membranas de certas cianobactérias. Fosfatidil-glicerol é geralmente acompanhada por cardiolipina, que é muitas vezes um grande componente lipídico de bactérias, ainda que só seja encontrado como um constituinte de membranas mitocondriais em eucariotas. Esfingolipídeos raramente são encontrados em bactérias, ceramida fosforil-etanolamina e ceramida fosforil-glicerol foram detectados em algumas bactérias anaeróbias. Ceramidas livres têm sido encontradas em algumas espécies de Bacterioides. Os ácidos graxos poliinsaturados do tipo encontrado em lipídeos vegetais ocorrem também em algas (verde e marrom), fungos e cianobactérias, mas não são muitas vezes presentes em outras bactérias (algumas espécies marinhas são exceções). (LIU, ZHAO, 2007, LU et al, 2011; KOGA, MORII, 2005).

Segundo Moore-Landecker, (1996) a natureza dos lipídeos pode estar agregada a outros compostos, tais como: proteínas, aminoácidos e polissacarídeos. Comumente os triacilgliceróis (TAGs) e seus ácidos graxos compreendem uma grande fração dos lipídeos produzidos por fungos. Os ácidos insaturados tais como: oléico e linoléico imperam os ácidos graxos insaturados (RATLEDG, 1986).

Os ácidos graxos são importantes para o balanço energético, biossíntese de membranas, produção de eicosanóides e outras funções especializadas. Nos tecidos, os ácidos graxos podem ser oxidados a acetil-CoA (β -oxidação) ou esterificados a acilglicerol, onde como triacilglicerol constituem a forma mais eficiente de reserva calórica do organismo. Muitas das propriedades funcionais das membranas são influenciadas por ácidos graxos que compõem os fosfolipídeos. Os ácidos graxos saturados diminuem a fluidez das membranas, enquanto os ácidos graxos polinsaturados promovem maior fluidez (MOREIRA et al., 2002).

Os ácidos graxos linoléico ($\omega 6$) e α -linolênico ($\omega 3$) atuam como precursores para a síntese de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa como os ácidos araquidônico (AA), eicosapentaenóico (EPA) e docosaheptaenóico (DHA), que fazem parte de numerosas funções celulares como a integridade e fluidez das membranas, atividade das enzimas de membrana, interações lipídeo-proteína e síntese de eicosanóides como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (MOREIRA et al., 2002).

Os lipídeos são importantes componentes de fungos, tanto em termos de estrutura e constituição da membrana. Muitos estudos têm demonstrado a importância de lipídeos para o desenvolvimento, esporulação e germinação e seu envolvimento em vários processos fisiológicos. O teor de lipídeos de esporos de fungos diversos varia de 5 a 17% de peso seco, mas esporos de algumas espécies, tais como *ferrugens* contêm até 35% de lipídeos. Os principais fatores que influenciam o grau de produção de lipídeos são a natureza e percentagem de carbono (C) e nitrogênio (N), conforme fontes de nutrientes no meio. Os principais componentes destes lipídeos são geralmente triacilglicerídios e glicerofosfolipídeos (fosfolípidos), que podem ser acompanhadas de esteróis e ésteres, ácidos graxos, esfingolipídeos, hidrocarbonetos, etc. Os ácidos graxos variam de C12 a C24 de comprimento da cadeia. Ácido palmítico C16 normalmente é o ácido graxo saturado e oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) são os principais ácidos graxos insaturados (PUPIN et al., 2000; GAO et al., 2013; BHARTI et al., 2014; BELLOU et al., 2012; DONOT et al., 2014; JIN et al., 2015).

Leveduras oleaginosas, como *Cryptococcus sp*, *Lipomyces sp*, *Rhodospiridium sp*, *Rhodotorula sp*, *Trichosporon sp*, *Yarrowia sp*, acumulam principalmente TAGs, que respondem por 90% dos lipídeos armazenados, desses 44% contêm ácidos graxos insaturados. Alguns outros lipídeos neutros são produzidos em quantidades traços (ácidos graxos livres, monoglicérides, diglicérides, ésteres de estéril-esterol, e as frações polares). Os principais ácidos graxos em leveduras oleaginosas são os ácidos mirístico (C14: 0), palmítico (C16: 0), esteárico (C18: 0), oleico (C18: 1), palmitoleico (C16: 1) e ácido linoleico (C18: 2) (DONOT et al., 2014).

Nos micro-organismos os lipídeos são sintetizados durante a fase de crescimento, como parte do processo metabólico e reserva de carbono. A quantidade e qualidade desse processo está relacionada de acordo com cada espécie, e nutrientes disponíveis no cultivo. Avaliando a composição lipídica do fungo *Mortierella isabellina*, foi verificado que a acumulação de triglicérides foi mais intensa em micélios de meia idade, ou seja, com maior tempo de armazenamento. Em seguida, em tempo subsequente foi constatada uma redução deste acúmulo, possivelmente por degradação, diminuindo para menos que 30%. Concluindo, que esta série de eventos (acumulação e degradação) está de acordo com o papel fisiológico dos triacilgliceróis consistindo no armazenamento e fornecimento de energia em períodos de abundância e de escassez de carbono. Os micélios jovens são ricos em lipídeos polares (glicolipídeos, esfingolipídeos e fosfolipídeos), com aproximadamente 40% de ácidos graxos poli-insaturados

(PUFA). Indicando que a biossíntese de ácidos graxos poli-insaturados é favorecida em micélios jovens (FAKAS et al., 2009a; BELLOU et al., 2012).

Os ácidos graxos encontrados na membrana celular são responsáveis pelo controle da entrada e saída de nutrientes e metabólitos. A fluidez da membrana plasmática é controlada pela presença de ácidos graxos saturados e insaturados, que a torna mais rígida ou flexível devido à curvatura formada pelas insaturações. A temperatura é o principal fator de regulação do grau de insaturações dos ácidos graxos nos organismos. As temperaturas altas tendem a aumentar a presença de ácidos graxos saturados e temperaturas baixas proporcionam maior número de insaturações (BELLOU et al, 2012).

O primeiro interesse nas leveduras e fungos filamentosos oleaginosos como fontes de lipídeos é centrado principalmente na capacidade dos micro-organismos sintetizar estes lipídeos raramente encontrados no reino vegetal ou animal. Leveduras oleaginosas podem produzir lipídeos ricos em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de interesse médico e dietético como γ – linolênico, ácido di-homo- γ -linolênico, ácido araquidônico, docosa- hexaenoic, ácido eicosapentanóico (DONOT et al., 2014; JIN et al., 2015).

Alguns produtos originados de lipídeos microbianos já são produzidos comercialmente e outros estão sendo desenvolvidos para serem lançados em pouco tempo, como por exemplo o poli- β -hidroxibutirato a partir de lipídeos bacterianos. O ácido γ -linolênico, um ácido graxo essencial, possui várias funções importantes, dentre elas, a formação de prostaglandina. Seu uso é recomendado no tratamento de: tensão pré-menstrual, osteoporose, processos inflamatórios e pressão sangüínea alta. Este ácido vem sendo extraído de plantas, porém, determinados fungos filamentosos de ordem Mucorales, como o gênero *Mortierella* são bons produtores. E a espécie *M. isabellina* é considerada produtora potencial do ácido γ -linolênico (GLA) (KENNEDY, 1993; FAKAS et al., 2009b; BELLOU et al., 2012; RATLEDG, 1986).

À medida que mais evidências são acumuladas sobre a importância médica das SCO, especialmente em ácidos graxos poliinsaturados essenciais, tais como o ácido γ -linolênico (GLA) e ácido araquidônico (ARA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA) o interesse na produção de lipídeos microbianos (SCO) aumenta continuamente, cuja composição é semelhante aos óleos vegetais tradicionais para a produção de biodiesel. Ao mesmo tempo, porque

o custo da matéria-prima lipídica tradicional ainda é alto para a produção de biodiesel (KHOT et al. 2012; ZHENG, et al., 2012; JIN, et al., 2015).

De acordo com Hansson e Dostálek (1988) os fungos filamentosos apresentam produções de lipídeos satisfatórias, por acumularem altos teores lipídicos contendo ácidos graxos de cadeias curtas e longas.

Pesquisas sobre SCO tem uma longa história. Antes da década de 1980, muitos cientistas revelaram a bioquímica e metabolismo de acúmulo de lipídeos por micro-organismos oleaginosos. Nos subsequentes 20 anos, tais processos bioquímicos e produção de SCO são de interesse para mais pessoas, porque estes óleos podem desempenhar um papel crítico na manutenção da saúde humana, substituindo alguns caros materiais, tais como manteiga de cacau e podem ser usados como fontes de energia. Durante aqueles anos, o processo de acumulação de lipídeo foi mais completamente elucidada, e os estudos variaram (ZHENG et al., 2012).

Segundo, Economou et al., (2010), o micro-organismo *Mortierella isabellina* está sendo introduzido em estudos para produção de biodiesel a partir de sorgo doce, quando foi utilizada em processos de fermentação semi-sólida verificando a acumulação de lipídeos gerando uma biomassa e lipídeos considerados de alta qualidade.

A Tabela 3 mostra alguns micro-organismos considerados oleaginosos e seus respectivos teores de lipídeos (MENG et al., 2009; VICENTE et al., 2010).

Tabela 3 Conteúdo de óleos de micro-organismos.

Microrganismos	Conteúdo em óleo (% peso seco)	Microrganismos	Conteúdo em óleo (% peso seco)
Microalgas:		Leveduras:	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Chlorella vulgaris</i>	40-60	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Bactérias:		Fungos filamentosos:	
<i>Arthrobacter sp</i>	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38	<i>Mortierella isabellina</i>	60-86
<i>Rhodococcus opacus</i>	96	<i>Cunninghamella echinulata</i>	40-57
<i>Gordonia sp.</i>	93	<i>Mortierella vinacea</i>	66

Fonte: MENG et al., 2009; VICENTE et al., 2010

Além disso, os investigadores continuam estudando os mecanismos bioquímicos visando explicar como um micro-organismo acumula lipídeos em suas células. O estudo nesse campo envolveu as enzimas-chave desses processos e sua regulação de acúmulo de lipídeos e intermediários chave para a biossíntese de lipídeos (ZHENG et al., 2012).

3.1.2.1. Biossíntese

Micro-organismos oleaginosos, podem acumular lipídeos através de duas vias diferentes: (i) a síntese “de novo”, que é a síntese a partir de acetil-CoA e malonil-CoA redutase e (ii) o “ex novo” de acumulação lipídica via envolvendo a absorção de ácidos graxos, óleos e TAG do meio de cultura e sua acumulação de forma inalterada ou modificada dentro da célula. Este último exige hidrólise do substrato hidrofóbico e incorporação dos ácidos graxos liberados. A fim de iniciar a acumulação “ex novo”, as leveduras elaboraram estratégias sofisticadas: por exemplo, a *Yarrowia lipolytica*, uma levedura oleaginosa, libera um agente emulsionante para o meio para reduzir o tamanho das gotículas hidrofóbicas e também secretam as lipases para a hidrólise externa de TAG; em seguida, liga-se pela sua superfície celular as gotículas hidrofóbicas pela formação de saliências e incorpora o substrato hidrofóbico através de vários mecanismos de transporte. Uma vez dentro da célula, o substrato hidrofóbico pode ser submetido a várias reações de modificação e, em seguida, é distribuído para as várias vias metabólicas da célula (BELLOU et al, 2012, PAPANIKOLAOU, AGGELIS, 2011).

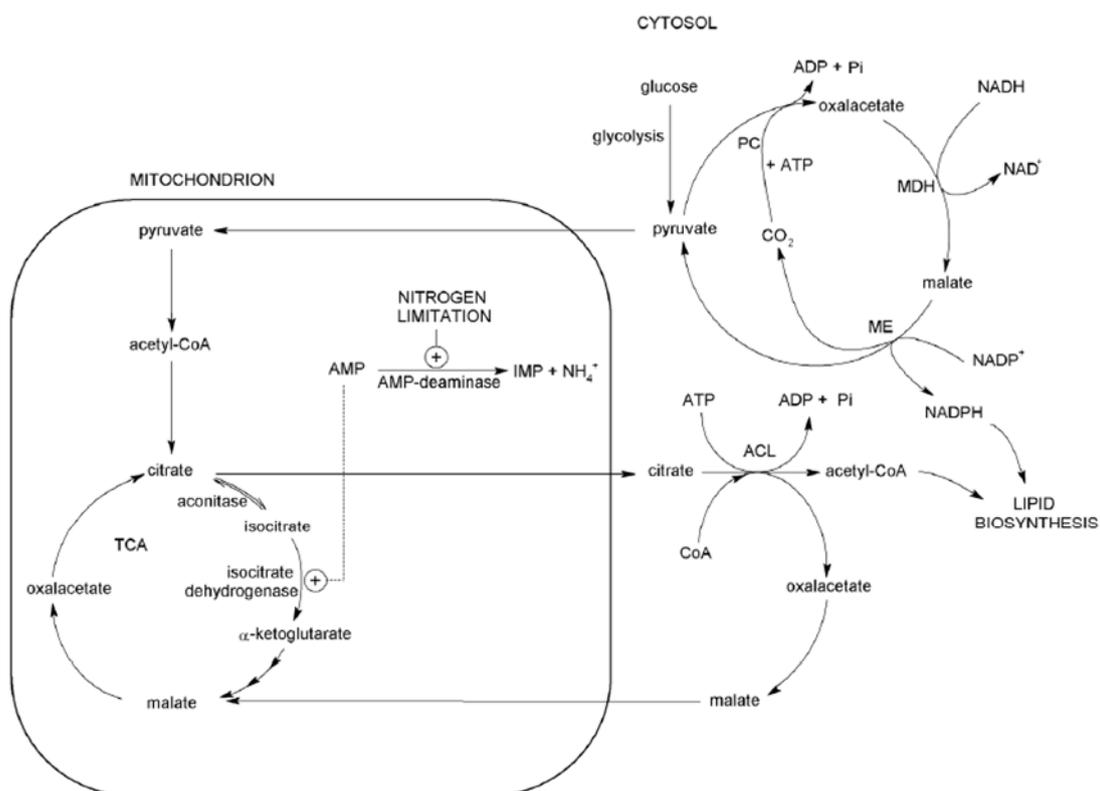
Existem algumas diferenças fundamentais entre estas vias, a síntese de lipídeos “de novo” ocorre a partir de substratos hidrofílicos e o acúmulo de lipídeos “ex novo” a partir de substratos hidrofóbicos. Em contraste, produção de lipídeos “de novo” é um processo associado ao crescimento celular, ocorrendo simultaneamente, enquanto a síntese de lipídeos “ex novo” é a bio-modificação de gorduras e óleos por micro-organismos oleaginosos e é completamente independente do esgotamento do nitrogênio do meio de cultura (DONOT et al., 2014, BEOPOULOS et al., 2008).

Independentemente da via de acumulação, estas moléculas de armazenamento não são aptas a integrar bicamadas de fosfolipídeos e são, portanto, acumuladas em um compartimento especializado da célula, os corpos lipídicos. Esta organela consiste do núcleo lipídico envolto numa camada de mono-fosfolipídeo dentro do qual várias proteínas com diversas funções são incorporadas. Estudos de proteômica recentes revelaram o papel importante destas proteínas no metabolismo lipídico (síntese, armazenamento, o tráfico e de degradação de lipídeos) que atestam que o LB não deve ser considerado como um compartimento de armazenamento simples (BEOPOULOS, NICAUD, 2012, ROSSI et al., 2010).

Em micro-organismos oleaginosos, durante a síntese “de novo” de lipídeos a iniciação da acumulação é induzida pelo esgotamento ou limitação de um nutriente principal do meio de

cultura, como nitrogênio, fósforo, enxofre ou zinco. Geralmente o nitrogênio, é utilizado para este fim, como o seu fornecimento é o mais fácil de controlar. De facto, a acumulação de lipídeos “de novo” em micro-organismos oleaginosos pode ser influenciada pela fonte de nitrogênio, pH e temperatura do meio de cultura, sendo fatores importantes para a síntese e acúmulo de SCOs. A temperatura de crescimento de micro-organismos oleaginosos influencia na composição de gordura e grau de saturação dos TAG acumulados (DONOT et al., 2014; BEOPOULOS, NICAUD, 2012, DONOT et al., 2014. HUANG et al., 2013).

Quando o nitrogênio está limitado, a proliferação de células diminui, uma vez que é um nutriente essencial para a síntese de proteínas e de ácido nucléico. No entanto, o organismo continua assimilando a fonte de carbono (açúcares ou glicerol) a partir do meio, que é agora canalizado para a síntese de lipídeos. Os produtos do metabolismo do nitrogênio desempenham um papel importante na regulação do fluxo de carbono a precursores de biossíntese de lipídeos ou formação de proteínas. Provocando a desregulamentação do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), resultando em uma superprodução de citrato, o precursor imediato do acetil-CoA e malonil, precursores da síntese de lipídeos. Isto vem como uma consequência da decomposição do AMP desaminase, um cofactor essencial do metabolismo de citrato, de inosina 5'-monofosfato e do íon amônio para ser usado como uma fonte de nitrogênio intracelular (Figura 2). Além disso, o nível do inóculo de esporos de fungos filamentosos tem efeitos na morfologia micelial e atividade metabólica, a qual está correlacionada com produtividade específica. Em contrapartida, durante a síntese “ex novo”, acúmulo de lipídeos é independente da concentração de nitrogênio no meio de cultura. Estes mecanismos são exclusivos para espécies oleaginosas, quando os não oleaginosos são colocados nas mesmas condições nutritivas o carbono assimilado é desviado em vários polissacarídeos, incluindo glicogênio, glucanos e mananos (RATLEDGE, 2002; GAO et al., 2013; ECONOMOU et al., 2010; TKACHENKO et al., 2013; BELLOU et al., 2014; RAIMONDI et al., 2014; BEOPOULOS, NICAUD, 2012; DONOT et al, 2014; ROSSI et al., 2010; JIN et al., 2015; VENKATA SUBHASH, VENKATA MOHAN, 2014; KAVADIA, et al., 2001).

Figura 2: Biossíntese de lipídeos, com limitação de nitrogênio

Fonte: ROSSI et al., 2010.

O acetil-CoA e malonil-CoA produzidos durante a síntese “de novo” de lipídeo são então adicionados na cadeia em formação de ácidos graxo pela enzima ácido graxo sintase complexo enzimático. Normalmente, são sintetizados ácidos graxos de cadeia contendo 14 e 16 carbonos. Em seguida, dependendo do arsenal enzimático de dessaturação de cada organismo mais alongamento reações podem ter lugar. Os ácidos graxos produzidos, ou assimilados do meio, são então dirigidos para a via de lipídeos de armazenamento, onde as enzimas acil transferases os esterifica junto ao glicerol a TAG. No entanto, o glicerol, a fim de estar disponível para a síntese de TAG tem de estar na forma de glicerol-3-fosfato (G3P). Então, esta molécula é facilmente

convertida em fosfato di-hidroxiacetona (DHAP), resultando na variação da concentração de G3P. A não disponibilidade de G3P é um dos obstáculos para síntese de lipídeos neutros em microorganismos oleaginosos. Em paralelo, uma pequena fração dos ácidos graxos é esterificado em um esterol para produzir os ésteres de esteróis e TAGs. Esta fração de lipídeo neutro, armazenado no interior do LB pode, então, ser mobilizados e degradados, dependendo da necessidade de energia da célula (CHRISTOPHE et al., 2012, BELLOU et al., 2014, BEOPOULOS, NICAUD, 2012, ROSSI et al., 2010; JIN et al., 2015).

Havendo esta demanda, o primeiro passo para as reações catabólicas, as enzimas triacilglicerol lipases hidrolisarão os TAG a ácidos graxos ou a ésteres de esterol. Os ácidos graxos seriam lançados ou dirigidos para a biossíntese de fosfolipídeos para a formação da membrana, ou para a degradação dos peroxissomos através da β -oxidação. Este conjunto de reações, lembra as atividades pelo complexo ácido graxo sintase complexo enzimático durante a síntese de ácidos graxos, quebra ácidos graxos em um espiral, removendo 2 carbonos da cadeia (a molécula de acetil-CoA) os encurtando em cada ciclo. O processo é supostamente fechado, o que significa que o ciclo seria repetido até o colapso total dos ácidos graxos (RATLEDGE & WYNN, 2002; BELLOU, et al, 2012, BEOPOULOS & NICAUD, 2012, KAVADIA, et al., 2001).

Quando o nitrogênio está em excesso, a proporção de ácidos graxos poli-insaturados aumenta, em relação aos saturados. Por outro lado, quando a relação C/N é alta, a concentração de ácido graxo depende da concentração inicial da fonte de carbono. Quando o carbono está em excesso, a proporção de ácidos gordos insaturados diminuiu. Quando a relação C / N é elevada a velocidade da reação torna-se baixa e os ácidos graxos saturados acumulados não são convertidos em poli-insaturados. Com estes resultados, ficou claro que as concentrações da fonte de carbono e azoto deve ser equilibrado (KOIKE et al., 2001).

Uma grande variedade de fontes de carbono foram testados visando a otimização da acumulação lipídica “de novo” utilizando diferentes meios de cultura. Apesar da glicose ser a fonte de carbono mais comumente empregada para o cultivo de leveduras oleaginosas e fungos, outros substratos foram utilizados para os experimentos: pectina, amido, lactose, xilose, frutose, sacarose, hidrolisados de lignocelulose, hidrolisados sorgo sacaríneo, amido de mandioca, acetato de glicose enriquecido com ácido orgânico, glucose enriquecido com lamas de depuração, glucose enriquecida com resíduos de tomate hidrolisado, glucose enriquecida com nutrientes auxiliares, hemicelulose, palha de trigo, farelo de arroz, glucose enriquecida com águas residuais, milhocina,

hidrolisado de amido de mandioca, a inulina ou hidrolisados de alcachofra, hidrolisado de cascas de arroz, bagaço de cana hidrolisado e glicerol residual. Além da natureza da fonte de carbono, a influência de suas concentrações no crescimento da biomassa e as características qualitativas e quantitativas dos lipídeos acumulados também foram investigados (DONOT et al, 2014; CHATZIFRAGKOU et al., 2010; KUMAR et al., 2011; MAKRI 2010; YANG et al., 2015).

Muitas fontes de carbono hidrofóbicos, tais como ácidos graxos de óleos animais ou vegetais, ácidos graxos puros, subprodutos ou resíduos, óleos essenciais, n-alcenos ou ácidos graxos voláteis, também têm sido estudados como substratos para acúmulo de lipídeos “ex novo”. Este tipo de acumulação geralmente é obtido com uma mistura de substratos hidrofílicos e diversos materiais gordurosos (DONOT et al, 2014; FONTANILLE et al., 2012; MITRA et al., 2012).

Para lidar com a demanda e aumento do preço dos óleos comestíveis (óleo de colza, óleo de soja, entre outros) em dívida com a produção de biocombustíveis de 1ª geração, muitos estudos têm considerado a síntese “de novo” de lipídeos, por leveduras oleaginosas e fungos filamentosos, como um processo potencialmente viável. Em contraste, uma aplicação importante para síntese de lipídeos “ex novo” é a produção de lipídeos de alto valor agregado (como a manteiga de cacau ou outras gorduras exóticas) utilizados nas indústrias alimentícia ou médica (DONOT et al., 2014).

3.2 Biodiesel

A procura por novas fontes de combustíveis renováveis cresceu com as crises internacionais de petróleo dos anos 70 e 90, bem como a preocupação de esgotamento no mundo de energias não-renováveis e a consciência ambiental (POUSA et al., 2007).

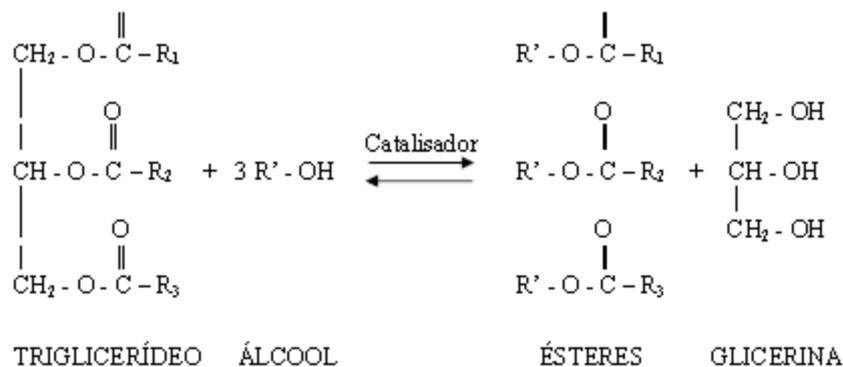
Desta maneira, deu-se início às pesquisas visando à busca de combustíveis renováveis e alternativos, que apresentassem principalmente um caráter competitivo com o petróleo para em seguida serem impulsionados de forma comercial e industrial (DELATORRE et al., 2011; APOLINÁRIO et al., 2012).

Assim, o Biodiesel surge como uma alternativa aos combustíveis fósseis. A Agência Nacional do Petróleo (ANP), que considera a Medida Provisória nº 214, de 13 de setembro de 2004 define o biodiesel como um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores de combustão interna com ignição por compressão ou por geração de outro tipo de

energia, que podem substituir parcialmente ou totalmente os combustíveis fósseis. De acordo com esta definição, não há nenhuma restrição no que diz respeito à via tecnológica de escolha para a produção de biodiesel, sendo possível utilizar como biodiesel os produtos obtidos pela transesterificação, esterificação e processos de pirólise. No entanto, a ANP, na resolução ANP 42 de 24 de novembro de 2004, regula apenas o uso de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, que podem ser preparados por transesterificação ou esterificação (ANP, 2004). Por esta resolução, 26 parâmetros foram especificada para o biodiesel puro (B100): aspecto, densidade, cinemática água, viscosidade e sedimentos, ponto de fulgor éster, conteúdo, destilação resíduo de carbono, cinzas sulfatada, total de sódio, enxofre, mais de potássio, de cálcio mais magnésio, fosforoso, a corrosão de cobre, o índice de cetano, filtro frio ponto de ligar, índice de acidez, glicerol livre e total, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, metanol ou etanol, índice de iodo, e a estabilidade à oxidação (POUSA et al., 2007).

O biodiesel é uma mistura de ésteres de ácidos graxos alquil (metil ou etil) de cadeia linear, longa obtida da transesterificação (alcoólise) dos triglicerídeos de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta, esta reação tem como coproduto o glicerol. Um catalisador (ácidos, básicos ou enzimáticos) é geralmente utilizado para melhorar a velocidade da reação e rendimento. O álcool é adicionado em excesso para deslocar o equilíbrio para o produto devido natureza reversível da reação (SINGH, SINGH, 2010; CARRERO et al., 2011; KITCHAA, CHEIRSILPB, 2011, BALAT, BALAT, 2008; HUSSAIN et al., 2014; POUSA et al., 2007; CHRISTOPHE et al., 2012).

No processo reacional chamada de transesterificação, as ligações das moléculas dos lipídeos são quebradas liberando três ácidos graxos livres que por sua vez reagem com o álcool formando ésteres de ácido graxo. A mistura separa-se em duas fases, o glicerol na parte inferior e o biodiesel, na superior (Figura 3) (SINGH, SINGH, 2010; LÔBO, FERREIRA, 2009; LIU, ZHAO, 2007; BOURNAY et al., 2005).

Figura 3: Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo vegetal.

Fonte: BOURNAY et al., 2005

Desta forma, a composição mais comum do biodiesel é de FAMES, principalmente devido ao fato que o metanol é mais barato que o etanol na maioria dos países, o que não é o caso do Brasil, onde os ésteres etílicos são usados como combustível. A transesterificação metílica apresenta maior rendimento que a etílica uma vez que o metanol é mais reativo que o etanol. Além disso, os ésteres metílicos são mais facilmente separados do glicerol por serem menos miscíveis nesta que os ésteres metílicos (DELATORRE et al., 2011).

Com o uso comercial na Europa, o biodiesel já provou seu valor como combustível para motores a diesel. Quando usado como combustível em motores a diesel e sistemas de aquecimento, o biodiesel apresenta muitos méritos, tais como a alta densidade de energia, mais favorável perfil de emissão de combustão, propriedades melhoradas de lubrificação, entre outros. É também ambientalmente correto em relação ao combustível diesel derivado do petróleo, pois é renovável, biodegradável, não-tóxico, e essencialmente natural. Além de reduzir as emissões de dióxido de carbono em quase 70% em comparação com o combustível diesel convencional (LIU, ZHAO, 2007; BOURNAY et al., 2005).

Além disso, o biodiesel é ambientalmente correto, pois na forma pura reduz de forma significativa as emissões de poluentes. É praticamente isento de enxofre. Testes realizados pelo grupo PSA Peugeot Citroën e Ladetel, em parceria com a Universidade de São Paulo, mostraram que chegou a 16% a redução de gases poluentes de uma mistura de 30% de biodiesel e 70% de diesel de petróleo, em carros que rodaram em Curitiba e Ribeirão Preto (KITCHAA, CHEIRSILPB, 2011; KUMAR et al., 2011).

A demanda por biodiesel aumentou com a significativa alta dos preços do petróleo e o desenvolvimento de medidas governamentais em muitos países que estabelecem uma proporção mínima de biocombustível para toda a gasolina e diesel utilizados nos transportes. A União Europeia, por exemplo, estabeleceu um teor mínimo de 5,75% de biocombustíveis até 2010 e os Estados Unidos pretendem aumentar a quantidade de bioetanol e biodiesel para 12,95 e 36 bilhões de litros em 2010 a 2022, respectivamente (VICENTE et al, 2009).

O mercado de biodiesel deve crescer rapidamente para atender a nova medida diretiva europeia de 5,75% de volume de biocombustíveis no setor dos transportes. Significando a otimização dos processos que permitem alta capacidade de produção, operações simplificadas, altos rendimentos e a ausência de requisitos químicos especiais e fluxos de resíduos (BOURNAY et al., 2005).

Esforços consideráveis têm sido feitos para o desenvolvimento de óleos vegetais que se aproximam das propriedades e desempenho de hidrocarbonetos à base de diesel. O problema com a utilização de triglicerídeos para o combustível diesel é geralmente associada com alta viscosidade, baixa volatilidade e personagens poli-insaturados (SINGH, SINGH, 2010).

Além disso, a disponibilização de matérias primas é, reconhecidamente, o principal gargalo para atender a demanda por biodiesel. A busca de micro-organismos com potencial para produção de biodiesel torna-se um grande desafio. Embora a utilização de óleos usados possa reduzir os custos de matérias primas, o processo real requer despesa adicional para o refinamento da matéria-prima. Pois com a utilização de matéria prima mais rentável, como por exemplo, resíduos de óleo de cozinha, que contêm geralmente um elevado teor de ácidos graxos livres (AGLs) e água, através de catálise alcalina ocorre a neutralização dos AGLs e saponificação de triacilgliceról acarretando a produção de sabão. As formações de sabão são reações colaterais, levando ao consumo parcial do catalisador, redução de produção de biodiesel, e significativamente a complicação de processos de purificação subsequentes. Assim, a sensibilidade a AGLs e umidade representa um grave problema para a grande escala de produção de biodiesel utilizando matérias-primas de baixo custo, além disso, são necessárias grandes percentagens de terras aráveis disponíveis (LIU, ZHAO, 2007; SINGH, SINGH, 2010).

Simultaneamente, óleos produzidos por micro-organismos oleaginosos estão sendo estudados para serem usados como matérias-primas para a produção de biodiesel, a fim de

sustentar a crescente demanda e aliviar a competição com a oferta de alimentos, uma vez que estes micro-organismos podem assimilar carboidratos e acumular altos níveis de lipídeos microbianos (> 20%), não precisam de terras para serem cultivados de modo que não entram em competição com a produção de alimentos, podem acumular diferentes tipos de lipídeos, dependendo das suas condições de cultura (pH, temperatura, intensidade luminosa, etc), e podem ser manipulados geneticamente e otimizados em laboratório (LIU, ZHAO, 2007; SINGH, 2010; KUMAR et al., 2011; SINGH, SINGH, 2010; CARRERO et al., 2011; CHRISTOPHE et al., 2012; JIN et al., 2015).

Tem sido relatado que as proporções de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFAs), juntamente com o comprimento da cadeia de carbono do ácido graxo causam impactos na qualidade do biodiesel. Os ácidos graxos com cadeias de carbono mais curtas e com ligações duplas proporciona ao biodiesel resultante uma boa propriedade de viscosidade em temperaturas frias. Enquanto, que ácidos graxos de longas cadeias de carbono e ligações saturadas, tendem a gerar biodiesel com boa qualidade de ignição, mas com mau desempenho em lugares de temperaturas mais baixas. Portanto, é evidente que uma composição de ácidos graxos equilibrada melhorar a qualidade do biodiesel (HUSSAIN et al., 2014).

Com base nestes dados, Hussain et al., 2014, constatou que os lipídeos produzidos pelo fungo *M. isabellina* é uma apropriada fonte para produção de biodiesel apresentando boa estabilidade de oxidação. Além disso, satisfaz as exigências dos padrões europeus, onde o conteúdo de ésteres de ácidos linoléico e poli-insaturados (contendo mais de 4 ligações duplas) têm que estar em concentração menor que 12% mol/mol e 1% mol/mol, respectivamente, para geração de biodiesel. Apesar destas vantagens, o único inconveniente para produção do biocombustível é a presença de alta concentração de ácidos graxos de cadeia longa, mas que pode ser resolvido com a mistura de lipídeos originados de outros fungos, valorizando as propriedades de lipídeos de outras espécies de micro-organismos. Portanto, o estudo concluiu que a *M. isabellina* é uma potencial fonte lipídica microbiana para a produção de biodiesel de alta qualidade.

3.2.1. Aplicação de óleos microbianos como matéria-prima para biodiesel

A biotecnologia lipídica possui grande interesse em lipídeos microbianos (SCOs), devido à capacidade de vários micro-organismos (principalmente leveduras, fungos filamentosos e algas e, em menor grau, as bactérias) em sintetizar lipídeos com estrutura e/ou composição específica, e alguns raramente encontrados no reino vegetal ou animal (PAPANIKOLAOU, AGGELIS, 2011; JIN et al., 2015).

A crescente demanda do biodiesel de 1ª geração (FAMEs decorrentes da transesterificação principalmente de óleos vegetais) aumentou o custo de vários gêneros de óleos alimentícios, levando à necessidade de descoberta de fontes não convencionais de óleos, que pode ser subsequentemente convertido. Os micro-organismos oleaginosos são considerados candidatos potenciais para a produção destes lipídeos, resultando na “segunda geração” do biodiesel decorrente de micro-organismos oleaginosos cultivados em resíduos agroindustriais como hemicelulose hidrolisada, glicerol residual, soro de leite ou queijo, etc., ou o biodiesel de 3ª geração decorrente de lipídeos produzidos por microalgas oleaginosas, utilizando o seqüestro de CO₂ atmosférico. Em geral, os lipídeos produzidos por micro-organismos oleaginosos contêm ácidos graxos insaturados semelhantes aos encontrados em óleos vegetais comuns (PAPANIKOLAOU, AGGELIS, 2010; ZHU et al., 2008; AZAD et al., 2015).

Muitos artigos descrevem a aplicação de organismos com acúmulo de óleo em células para a produção de biocombustível, como algumas espécies de leveduras, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Trichosporon fermentans* e *Lipomyces starkeyi*, e de microalgas, como *Nannochloropsis oculata*, *Neochloris oleoabundans*, *Cladophora fracta*, *Chlorella protothecoides* e *Chlorella vulgaris*. Dentre os fungos utilizados para produção de biodiesel, está a espécie de *Cunninghamella japonica*, *Mortierella isabellina* (PAPANIKOLAOU, 2002; HUANG et al., 2012; HUSSAIN et al., 2014; DONOT et al., 2014).

Embora o custo de produção dos lipídeos microbianos seja mais elevado do que a dos óleos vegetais convencionais, a produção destes lipídeos foi considerada como um processo economicamente viável, especialmente se forem utilizados substratos de custo baixo, por exemplo, soro de leite, glicerol residual, xilose, etc. Além disso, devido à última crise na produção e aumento dos preços de vários produtos comestíveis, o custo dos vários óleos vegetais (por

exemplo, óleo de colza, óleo de soja, etc.) tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, resultando em um aumento do custo da produção de biodiesel. No entanto, a aplicação de biocombustíveis em grande escala comercial é fortemente recomendada por diversas autoridades. Assim, a descoberta de novas fontes para uma produção em massa de lipídeos apresenta uma importância significativa, com os micro-organismos oleaginosos sendo considerados como candidatos potenciais para este fim (CHISTI, 2007; LUQUE et al., 2008; MENG et al., 2009; PAPANIKOLAOU, AGGELIS, 2011).

O conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de células microbianas variam em resposta a fatores ambientais tais como o tipo de fonte de carbono, o pH, temperatura e de acordo com a natureza do micro-organismo ou seja, espécie e estirpe específica. Isto foi evidenciado a partir de estudos sobre a levedura oleaginosa psicrófila *Rhodotorula glacialis* em que tanto a concentração de glicose e temperatura influenciaram a composição e o grau de insaturação dos ácidos graxos. Em espécies do gênero *Mortierella*, *M. alpina* foi capaz de produzir 40% (w/w) de óleo enquanto a *M. isabellina* ATHUM 2935 chegou a um valor de 50,4% (w/w) de óleo quando cultivadas em glicose (KHOT et al., 2012; BELLOU et al., 2012; DONOT et al., 2014)

Conseqüentemente, uma vez que a acumulação de lipídeos por fungos oleaginosos varia, nem todos os micro-organismos oleaginosos podem ser usados como matéria-prima para a produção de biodiesel. Portanto, seleções cuidadosas de espécies fúngicas oleaginosas e caracterização da composição de lipídeos devem ser realizados para verificar a respectiva aptidão para a produção de biodiesel (KHOT et al., 2012; HUSSAIN et al., 2014).

Como a qualidade do biodiesel é dependente da composição de ácidos graxos presentes na matéria-prima do óleo, o conteúdo de lipídeos totais (> 20%) e o tipo de ácidos graxos são critérios importantes. A espécie *M. isabellina* é composta principalmente por lipídeos não polares, perfazendo mais de 90% dos lipídeos totais. (KHOT et al., 2012; HUSSAIN et al., 2014).

Entre os diferentes micro-organismos oleaginosos, o aumento das atenções tem sido dado aos fungos filamentosos devido a múltiplas vantagens: (1) Acúmulo até 80% de lipídeos e produção de alguns ácidos graxos de valor agregado. Por exemplo, o fungo *Cunningamella echinulata* cultivada para atingir 46,6% de lipídeo celular com o conteúdo de 14,1% de ácido γ -linolénico (GLA). Além disso, foi demonstrado o conteúdo de ácido araquidônico (AA) em *Mortierella alpina* equivalente a mais de 16% do seu peso seco e os lipídeos totais chegam a 36%.

(2) Mostram bom perfil lipídico para a produção de biodiesel de alta qualidade. Pesquisadores sugeriram que nem todos os lipídeos extraídos a partir de micro-organismos são adequados para produção de biodiesel. Os resultados mostraram que 98,0% dos lipídeos totais extraídos de *Mucor circinelloides* foram de ácidos graxos livres capazes de saponificação, (3) Usam uma variedade de fontes de carbono para a produção de lipídeos, tais como melaço, glicerol, ácido acético, cereais, caroço de milho, sorgo doce, palha de trigo, casca de laranja, bagaço de maçã e óleo, (4) Produzem óleos através de fermentação em estado sólido com baixo custo e baixo gasto de energia; (5) Tendem a formar pellets, que não só reduzem a viscosidade do caldo das fermentações para melhorar a transferência de mistura e desempenho de massa, mas também são muito mais fáceis de serem colhidas a partir da filtração do caldo de células, em comparação com métodos tradicionais de centrifugação de alto custo (ZHENG et al., 2012; KHOT et al., 2012; DONOT et al., 2014).

Embora os lipídeos microbianos a partir de fungos filamentosos mostrem a promessa para a produção de biodiesel, o obstáculo é o alto custo de produção. Tem sido relatado que 75% dos custos totais vem das matérias-primas ou de fontes carbono necessárias para a produção. No entanto, o custo poderá ser reduzido potencialmente se forem utilizados materiais residuais, tornando urgente a investigação de outras fontes renováveis de matérias-primas para produção de lipídeos microbianos, podendo só assim concorrer com os óleos vegetais, e evitar possíveis contaminações ambientais (RATLEDGE, 1986; ZHENG et al., 2012; VICENTE et al., 2009).

Vários estudos relataram o acúmulo de lipídeos por leveduras e fungos filamentosos oleaginosos em diferentes substratos tais como o glicerol, a água de esgoto, soro de leite, melaço, amido solúvel, cereais, palha e farelo de trigo. Como a utilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*, e dos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* cultivados em hidrolisados lignocelulósicos para produção de biomassa lipídica como matéria-prima para várias fermentações industriais (ECONOMOU et al., 2010; KHOT et al., 2012).

Portanto, pesquisadores estão se concentrando em reduzir os custos e melhorar a produtividade da produção de SCO. Já que a produção de SCOs são caros, é necessário encontrar matérias-primas de baixo custo como alternativa para a produção deste óleo (HUANG et al., 2012; PAPANIKOLAOU et al., 2008).

O custo do biodiesel a partir de SCO é decidido pelo gasto na fermentação para a produção do óleo microbiano a ser transesterificado. Portanto, as despesas de tais substratos devem ser baixas o suficiente para fazer um produto competitivo no mercado, além de não poder influenciar na qualidade do óleo microbiano, especialmente na concentração de ácidos graxos valiosos ou sua composição o que é adequado para produção de biodiesel (RATLEDGE, 1986; HUANG et al., 2012; LI et al., 2010; BHARTI et al., 2014).

Papanikolaou et al., (2002) provaram a capacidade da levedura *Yarrowia lipolytica* em acumular lipídeos que podem ser utilizados como substitutos para a manteiga de cacau através da redução dos custos de fermentação usando glicerol residual. Em outro estudo desenvolvido, Economou et al, (2010) verificaram a capacidade do fungo *M. isabellina* em acumular lipídeos em cultivos em estado semi-sólido contendo sorgo-sacarino, e concluíram que o óleo produzido era de alta qualidade e adequado para ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel.

Assim, materiais de baixo custo, contendo vários açúcares, podem ser utilizados para a produção de óleo microbiano. Outro substrato que poderia ser utilizado é o glicerol, resíduo gerado pela indústria de biodiesel, sendo uma importante fonte de carbono para microbiologia industrial (HUANG et al., 2012).

Segundo Papanikolaou et al., 2008, o glicerol residual pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de óleo, ácido 1,3-propanodiol e ácido cítrico pelo fungo *M. isabellina*.

3.3. Resíduos agroindustriais

Resíduo define-se como sendo os materiais não aproveitados em atividades humanas, provenientes das indústrias, comércios e residências, podendo este ser sólido, líquido ou gasoso (TIMOFIECSYK, PAWLOWSKY, 2000).

Os impactos ambientais causados por resíduos vêm aumentando a preocupação de órgãos governamentais e indústrias, mobilizando vários setores do mercado, devido a isto, buscam políticas que visem diminuir os impactos causados na natureza. Várias revisões têm ocorrido em resoluções ligadas a resíduos, tais como a RDC 306/04, resolução da ANVISA (BRASIL, 2004) e a Resolução 388/05 do CONAMA (BRASIL, 2005) que classificam os resíduos e propõem tratamentos, manipulação e descarte dos resíduos de serviço da saúde. É bastante discutido sobre a

Gestão Ambiental e certificação da ISO 14000, um conjunto de normas que tem como objetivo o desenvolvimento de atividades vários segmentos, sem transgredir as leis ambientais, Enfim, o século 21 está preocupado principalmente como o meio ambiente e a sustentabilidade do planeta (PELIZER et al., 2007).

Estima-se que metade da produção de vegetais destinados aos processos agrícolas e industriais não são bem aproveitados pelo homem, gerando grandes quantidades de resíduos como palhas, folhas, madeiras, polpas e cascas (CHANDA, CHAKRABATI, 1996). Segundo Laufenberg et al., (2003) Os resíduos podem apresentar substâncias de alto valor. Se o resíduo for empregado numa tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. De acordo com os mesmos autores, a indústria de alimentos por exemplo gera grandes volumes de resíduos, tanto sólidos como líquidos, resultantes da produção, preparo e consumo de alimentos. Todos esses resíduos são normalmente dispensados no solo, originando grandes problemas de poluição e representando uma perda significativa de biomassa e nutrientes.

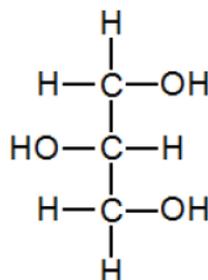
Os avanços na área da biotecnologia, principalmente relacionadas à tecnologia das fermentações, criaram uma oportunidade para o aproveitamento desses resíduos, como subprodutos, pois os mesmos fornecem uma ampla gama de substratos alternativos para o desenvolvimento de micro-organismos em diferentes processos biotecnológicos, conseqüentemente favorecendo o meio ambiente, uma vez que se podem evitar possíveis impactos ambientais e implantação de indústrias secundárias (PANDEY et al., 2000). Segundo Meneghetti, Domingues, (2008) subprodutos são aqueles provenientes de um processamento industrial, onde se pode produzir um novo produto a partir deste. Uma maior utilização é limitada pela falta de conhecimento da composição química, viabilidade econômica e garantia de segurança alimentar e ambiental dos subprodutos industriais.

De acordo com Santos et al., (2005) para a síntese de produtos desejáveis, é importante a escolha adequada da fonte de carbono, sendo os resíduos agroindustriais os mais pesquisados. São geralmente mais baratos, abundantes e apresentam composição rica em material orgânico.

3.3.1. Glicerol residual

O glicerol (1,2,3-propanotriol) é um triálcool (Figura 4), descoberto por Carl W. Scheele, em 1779, durante a separação de uma mistura aquecida de óxido de chumbo (PbO) preparada com óleo de oliva. Trata-se de um líquido higroscópico e viscoso a temperatura ambiente. Seus sinônimos são: glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano (RYWIŃSKA et al., 2010). Pasteur (1958), também observou a formação de glicerol como subproduto da fermentação alcoólica, em concentrações de 2,5 - 3,6% do conteúdo de etanol (FERREIRA, 2009).

Figura 4: Estrutura da molécula de glicerol



Na natureza, o glicerol está presente em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê e pinhão manso) e animais em formas combinadas de glicerol com ácidos graxos. É um composto fundamental para o metabolismo de micro-organismos, atuando como precursor de numerosos compostos e regulador de mecanismos bioquímicos intracelulares (SILVA et al., 2009). Apesar de ser encontrado em diferentes espécies, é extremamente incomum encontrar-se glicerol em sua forma “livre” (ARRUDA et al., 2007; RIVALDI et al., 2008; MOTA et al., 2009).

Glicerol é um resíduo que pode ser produzido por fermentação microbiana ou sintetizado quimicamente a partir de matéria-prima petroquímica, enquanto que também pode ser recuperado como um subproduto das unidades de produção de sabão. Além disso, a aplicação industrial obrigatória de biodiesel já resultou na acumulação no mercado de grandes quantidades de concentrado de glicerol residual, como principal sub-produto do processo de transesterificação (CHATZIFRAGKOU et al., 2011; ROSSI et al., 2012; NWACHUKWU et al., 2013).

Glicerol puro pode apresentar numerosas aplicações em cosmética, pintura, automotivo, alimentício, farmacêutico, indústrias de papel e celulose, couro e têxtil. O residual proveniente de produção de biodiesel pode ser facilmente concentrado até 60% (p/p) no entanto, a purificação destes resíduos é industrialmente quase inviável devido ao alto custo do processo, enquanto que a sua eliminação constitui em desvantagem nos aspectos econômico e ecológico. Portanto, a utilização de glicerol bruto como uma matéria-prima para o estabelecimento de bio-refinarias pode representar um estratégia alternativa e "amigo do ambiente", com o objetivo de melhorar a economia da indústria de biodiesel, bem como a confrontar com o incremento contínuo dos fluxos de resíduos de glicerol (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

De acordo com Silva et al., (2009) o biodiesel surge como uma alternativa de combustível renovável e ambientalmente segura, neste contexto o Brasil pode ser tornar o maior produtor e consumidor mundial de biodiesel, uma vez que possui grande disponibilidade de matéria-prima oleaginosa e um crescimento contínuo na indústria de óleos vegetais e do etanol. Conforme dados da ANP, no ano de 2010 a quantidade de biodiesel produzida em todo território brasileiro foi de 2.397.272 m³, enquanto que somente no estado do Rio Grande do Sul foram produzidos cerca de 605,998 m³. Considerando que cerca de 10% do biodiesel produzido corresponde a glicerol, quantidades apreciáveis de glicerol residual são geradas (ANP, 2005; CASA CIVIL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2005; PAULO et al., 2009).

Tendo em vista o número elevado de glicerol, o Brasil passou a se preocupar não só com a produção de combustíveis, mais em destinar corretamente o resíduo da produção de biodiesel (UFF, 2011).

O glicerol residual bruto constitui uma fonte de carbono versátil com muitas aplicações possíveis em fermentações industriais para a obtenção de uma ampla gama de produtos orgânicos de valor agregado. Devido ao seu baixo custo e sua ampla disponibilidade, estudos crescentes são apresentados na literatura relacionada com a valorização da matéria-glicerol utilizando processos de fermentação microbiana, tal como revisto por Papanikolaou, (2008); Posada e Cardona, (2010); Papanikolaou e Aggelis, (2009); Wen et al., (2009); Zeng e Biebl, (2002).

Sendo assim, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de descobrir novas aplicações para o glicerol, visto que o mercado tradicional desse subproduto (indústria de medicamentos, cosméticos e alimentícios) encontra dificuldade em absorver todo o excedente

oriundo da síntese do biodiesel. Uma solução está no uso de estratégias biotecnológicas para o reaproveitamento do glicerol residual com objetivo de gerar produtos de maior valor agregado (RIVALDI et al., 2008).

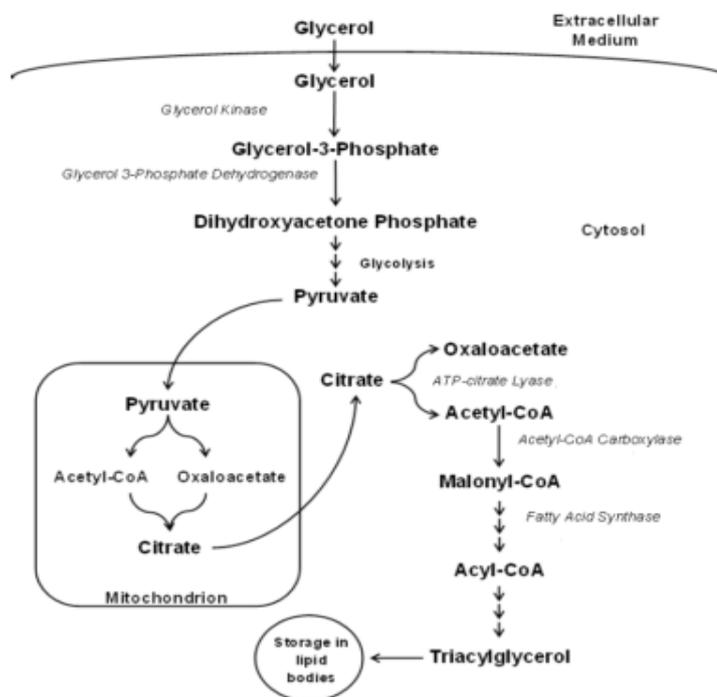
O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula. Vários estudos foram desenvolvidos visando à utilização de glicerol residual como fonte de carbono por micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Muitos deles apontam principalmente a mecanismos de assimilação de glicerol por estes micro-organismos para a produção de compostos intermediários, tais como ácidos orgânicos, polióis, lipídeos microbianos (SCO) e biomassa microbiana. Dessa forma, a bioconversão do glicerol residual adiciona um valor significativo a produtividade da indústria do biodiesel (PAPANIKOLAOU et al., 2002; ITO et al., 2005; PAPANIKOLAOU et al., 2008; LIU et al., 2010; EASTERLING et al., 2009; SILVA et al., 2009; RIVALDI et al., 2008; AMARAL et al., 2009; MOTA et al., 2009).

O glicerol pode ser assimilado pela glicólise, através de glicerol-3-fosfato ou dihidroxiacetona por levedura. Em *Saccharomyces cerevisiae*, glicerol é assimilado pela glicerol quinase e adenina dinucleotídeo (FAD)-dependente e desidrogenase glicerol-3-fosfato (WANG et al., 2001; RIVALDI et al., 2008; AMARAL et al., 2009; MOTA et al., 2009).

O produto formado por glicerol quinase, o glicerol-3-fosfato, pode ser usado como um precursor da biossíntese de lipídeos ou na conversão para dihidroxiacetona fosfato, como intermediário, podendo ser transformado em gliceraldeído-3-fosfato pela triose fosfato isomerase, servindo de substrato para a síntese de outros metabólitos (GRAUSLUND et al., 1999). Desta forma esta rota de utilização do glicerol tem sido observada em várias leveduras produzindo metabólitos secundários de alto valor agregado, como biossurfactantes (PAPANIKOLAOU et al., 2008, SILVA et al., 2009; MAKRI et al., 2010; CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

A Figura 5 apresenta a via de utilização de glicerol como única fonte de carbono no meio de cultivo influencia a regulação das vias lipogênicas dos micro-organismos podendo promover a acumulação de lipídeos (FONTES et al., 2008).

Figura 5: Esquema da produção de lipídeos a partir do glicerol



Fonte: RATLEDGE, WYNN, 2002

De tal modo, os óleos microbianos podem tornar-se uma das potenciais matérias-primas para a produção de óleo para biodiesel. Pois pesquisadores relatam alguns usos alternativos para o glicerol, como substrato para o processo de fermentação no crescimento para culturas oleaginosas. O glicerol bruto produzido durante a fabricação de biodiesel contém elementos macro, tais como cálcio, potássio, magnésio, enxofre e sódio. Assim daria um bônus adicional aos custos de compensação da produção de biodiesel, a utilização do glicerol para produzir óleos microbianos como matéria-prima (KITCHAA, CHEIRSILPB, 2011).

Com a produção de 10 kg de éster de combustível a partir de vários óleos, 1 kg de glicerol é gerado. Portanto a valorização do glicerol deve ter muito a oferecer para a redução custo global do processo da produção de biodiesel. A principal forma de valorização do glicerol, é por meio de tecnologia de fermentação onde a sua referida biotransformação se dá em 1,3-propanodiol, utilizando estirpes bacterianas pertencendo ao gênero *Clostridium* e *Klebsiella*. Entre outras alternativas de uso, como sua transformação a ácido cítrico ou óleo microbiano com o auxílio da

levedura *Yarrowia lipolytica* (FAKAS et al, 2009b; ANDRÉ et al., 2010; AMARAL et al., 2009; SILVA et al., 2009).

Uma particular atenção tem sido dedicada a várias espécies de fungos zigomicetos oleaginosos, como *Mortierella isabellina* e *Cunninghamella echinulata*, que podem acumular até 86 e 57%, respectivamente, de lipídeos em biomassa seca. Além disso, estes fungos são capazes de crescer e acumular grandes quantidades de lipídeos em fermentações contendo glicerol como uma fonte de carbono (VICENTE et al, 2010; XING et al., 2012).

A conversão de glicerol em lipídeos por fungos filamentosos, algas ou leveduras oleaginosas tem sido investigado intensamente para seu aproveitamento como substrato por estirpes microbianas eucariontes para a produção de biomassa. (PAPANIKOLAOU et al., 2008; ANDRÉ et al., 2010).

3.3.2. Milhocina

A milhocina é um resíduo, subproduto do beneficiamento de milho, também chamado de *corn steep liquor* contém grande quantidade de nitrogênio, aminoácidos entre outros nutrientes, sendo utilizado principalmente como alimento complementar na fabricação de ração para aves e ruminantes. Tem sido utilizado como um suplemento nutricional e funcional no processo de fermentação porque é rico em nutrientes importantes, incluindo as vitaminas, minerais, aminoácidos e estimulantes de crescimento. Por este motivo, está sendo muito utilizado como um nutriente essencial de baixo custo para a produção de ácidos orgânicos e solventes, incluindo etanol e ácido succínico (WANG et al., 2014; AMARTEY, LEUNG, 2000).

A milhocina é viscosa, de cor marrom escura e apresenta pH ácido. E pode apresentar as seguintes características físico-químicas: valor de pH pode variar de 3,5 a 4,1, concentração de nitrogênio está entre 3,8 % a 4,5 %, teores de açúcares (glicose) e ácido lático são bastante variados, normalmente os teores de açúcares não ultrapassam de 5 % e os de ácido lático estão entre 5 – 15 %, devido a já estarem em processo de fermentação nessa faixa de pH. A tabela 4 mostra os teores de aminoácidos, vitaminas e minerais presentes neste resíduo. A quantidade de matéria orgânica presente pode ser elevada, tornando-se um dos grandes problemas de tratamento para as indústrias (LIGGETT & KOFFLER, 1998).

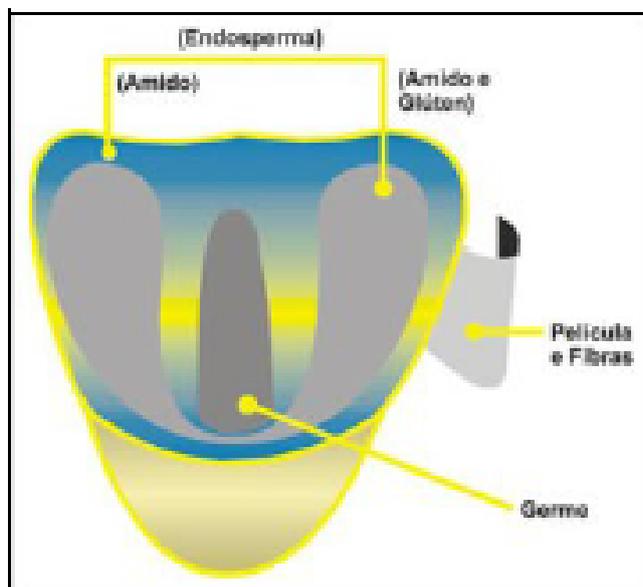
Tabela 4 Composição de aminoácidos, vitaminas e minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.

Aminoácidos (g de aminoácido/100g de proteína)			
Alanina	9,83	Glicina	5,27
Arginina	3,68	Histidina	3,72
Ácido aspártico	5,82	Isoleucina	3,07
Cistina	2,20	Leucina	8,28
Ácido glutâmico	18,07	Lisina	4,75
Triptofano	-	Tirocina	3,09
Metionina	1,98	Fenilalanina	2,85
Prolina	9,64	Serina	5,18
Treonina	4,08	Valina	5,16
Vitaminas (mg/kg)			
Biotina	0,3	Ácido pantotênico	15,0
Cholina	3.500,0	Piridoxina	9,0
Inositol	6.000,0	Riblovavina	6,0
Niacina	80,0	Tiamina	3,0
Minerais			
Cálcio (%)	0,14	Magnésio (%)	0,6
Cobre (mg/kg)	15,0	Potássio (%)	2,8
Manganês (mg/kg)	20,0	Sódio (%)	0,1
Ferro (mg/kg)	100,0	Fósforo (%)	1,8
Selênio (mg/kg)	0,3	Zinco (mg/kg)	60,0
Enxofre (%)	0,6		

Fonte : MENEGASSI, 2007

Uma desvantagem da milhocina é sua variável composição, que pode depender da condição e qualidade do grão de milho e do processamento. Dentre os compostos variados encontram-se íons metálicos, vitaminas e outros compostos em pequenas quantidades. Na análise de sua composição química pode-se observar que há uma alta concentração de matéria orgânica que se não tratada corretamente causa a morte de animais no ecossistema aquático. Além disso, uma concentração mais elevada pode resultar em negativos efeitos sobre a produção de metabólitos microbianos devido à presença de componentes inibidores (LIGGETT, KOFFLER, 1998; FILIPOVIC et.al., 2001; WANG et al., 2014).

Quando cortado na vertical, o grão de milho revela alguns componentes básicos, como endosperma: correspondente à maior parte do grão compõe-se basicamente de amido (61 %), glúten (7 %), água 16 % película: parte que recobre o grão pode ser utilizada para rações de animais, gérmen (11 %): parte vegetativa do grão e fonte de óleo de milho importante para indústrias de alimentos, outras substancias como vitaminas e fibras (5 %). A figura 6 representa os componentes do milho (ABIMILHO, 2015).

Figura 6: Constituintes do grão de milho

Fonte: ABIMILHO, 2015

Existem dois processos para industrialização de milho a seco e a úmido: No processo a seco, o milho, após limpeza e secagem é degerminado e separado em endosperma e gérmen, onde o primeiro é moído e classificado para a obtenção de produtos finais, e o segundo passa por um processo de extração para produção de óleo e farelo. No processamento via úmida, o milho, após limpeza e secagem, é macerado e separado em gérmen, fibras e endosperma, e estes ainda podem ser separados em amido e glúten. Do amido obtêm-se xaropes e outros tipos de amidos especiais. O glúten pode ser incorporado às fibras (ABIMILHO, 2015). A empresa fornecedora do efluente realiza o processamento do milho por via úmida, para obtenção de farinha de milho, canjica, farinha de biju e flocos de milho.

Segundo Wang et al., (2014) a mihocina é um nutriente eficiente para a melhoria da produção de lacase por *T. versicolor*, devido sua composição rica em nitrogênio e indutores de lacases.

O cultivo de milho no Brasil, em 2010, segundo o IBGE foi de 40 milhões de toneladas, resultados bastante positivos estão sendo apresentados por agricultores do centro-sul do país. Com

a ajuda de avançadas técnicas, eles vêm registrando um rendimento recorde a cada ano, comprovando grande disponibilidade deste no mercado. O estado do Paraná é um dos maiores produtores de milho com uma safra anual de cerca de 12 milhões de toneladas (ABIMILHO, 2015).

3.4. Reino Fungi

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos, apresentam características próprias que os diferenciam dos demais grupos de seres vivos, possuem estruturas somáticas que são representadas por hifas, cujo conjunto constitui o micélio, e a nutrição é do tipo absorptiva, possuem parede celular constituída por quitina e β -glucano, apresentam material de reserva energética na forma de glicogênio ou lipídeos, podem ser unicelulares e/ou multicelulares, microscópicos e/ou macroscópicos, com reprodução assexuada e/ou sexuada, resultando na formação de esporos (ALEXOPOULOS et al., 1996; SIDRIM et al., 2004; KIRK et al. 2008).

Em 1969 através de um estudo morfológico, citológico e bioquímico Whittaker propôs à classificação dos fungos em um reino a parte, o reino Fungi (BONONI, TRUFEM, 1998).

Em 2008, Kirk et al, publicou uma nova classificação aos fungos, compreendendo em oito filos: Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia, Neocalismastigomycota e Zygomycota e o Grupo dos Fungos Anamorfos.

3.4.1. Filo Zygomycota

São fungos que se reproduzem sexuadamente por estruturas chamadas Zigosporângios, formando os zigósporos, que quando maduro, revela, em seu interior, conspícua gota de óleo. Apresentam micélio desenvolvido com hifas cenocíticas ou septados irregularmente (ALEXOPOULOS et al. 1996). Recentemente o grupo não é aceito como formal categoria taxonômica, pois seus integrantes não são monofiléticos, conclusão baseada em análises dos genes do RNA ribossomal 18s, 5.8s e 28s. constituem grupo de fungos sapróbios por excelência em matéria orgânica em decomposição, bem como fezes de herbívoros, sendo conhecidas espécies coprófilas obrigatórias e facultativas. O micélio geralmente é bem desenvolvido, cenocítico, com

septos ocorrendo de modo esparso, principalmente com o envelhecimento da colônia. A reprodução é caracteristicamente realizada por meio de esporos assexuados. As hifas reprodutoras crescem para fora do substrato e formam no ápice estruturas assexuadas denominadas esporângios que quando amadurecem liberam esporos para o ar. (KIRK et al, 2008; HESSELTINE, ELLIS 1973; SCHIPPER et al., 1975).

Os zigomicetos estão distribuídos em sete ordens (Endogonales, Kickxellales, Zoopagales, Dimargaritales, Entomophthorales, Harpellales e Mucorales (Benjamin, 1979), trinta e duas famílias e cento e trinta gêneros, com aproximadamente novecentas espécies. No início de 2001, o grupo dos Zygomycetes possuía dez ordens (KIRK et al., 2001). Mas através de observações moleculares foi revelado que duas ordens (Basidiobolales e Mortierellales, Cavalier-Smith (1998) apresentavam características diferenciadas, e foram classificadas no filo Glomeromycota (KWASNA et al., 2006).

Mucorales é a ordem com maior número de espécies cerca de trezentas. Seus representantes também são conhecidos como fungos do açúcar, uma vez que sua capacidade de degradação limita-se às moléculas de estrutura mais simples, como glicose e sacarose. Assim, são os primeiros fungos a colonizarem um substrato crescendo exuberantemente, com micélio denso e conspícuo, chegando a atingir de dois a três centímetros de altura. A principal classe: Zygomycetes apresenta hábitos: parasita, simbiote com artrópodes ou saprófita. Na sua maior ordem, Mucorales, a reprodução assexual ocorre por meio de esporos chamados esporangiosporos produzidos em esporângios ou em esporangíolos (poucas espécies), multiesporados (merósporos, esporangiosporos, artrósporos e clamidiosporos), reprodução sexuada por zigósporos e pelos hábitos sapróbios cosmopolitas (raramente micoparasitas), parasitas facultativos de plantas, animais e do homem. Esses esporângios são, geralmente, globosos, inflados, apresentando uma columela central. Entre os gêneros importantes cita-se: *Choaneophora*, *Mycotipha*, *Cunningamella*, *Mortierella*, *Syncephalastrum*, *Radiomyces*, *Rizhopus*, *Absidia*, *Mucor*, *Pilobolus* (KIRK et al, 2008; HESSELTINE, ELLIS 1973; HAWKSWORTH et al., 1995; KWASNA et al., 2006).

A ordem Mucorales inclui espécies muito usadas na indústria de fermentação, são responsáveis por muitos prejuízos econômicos importantes, como podridão no armazenamento pós-colheita e uma série de infecções oportunistas em humanos e animais imunocomprometidos. Devido à importância destes fungos, a identificação e classificação taxonômica mais apurada é muitas vezes necessária. A identificação com base na morfologia é mais propícia a erros, além de

ser mais difícil por causa da perda da capacidade de esporulação após cultivos sucessivos ou a destruição de características morfológicas taxonomicamente importantes. As técnicas moleculares fornecem ferramentas alternativas mais confiáveis, e através das quais foi proposta a nova família *Umbelopsidaceae* para a ordem Mucorales (HESSELTINE, ELLIS, 1973; RINALDI, 1989; HOOG, GUARRO, 1995; MEYER, GAMS 2003).

Segundo os conceitos taxonômicos vigentes, baseados principalmente em estudos morfológicos, a ordem Mucorales está inserida na classe Zygomycetes, do filo ou divisão Zygomycota e do reino Fungi (ALEXOPOULOS et al., 1996).

A ordem Mucorales compreende exemplares de gêneros de grande interesse econômico: *Chonephora*, *Mycotipha*, *Cunningamella*, *Mortierella*, *Syncephalastrum* e *Radiomyces*, esses fungos são utilizados pelas indústrias por sintetizarem produtos industriais importantes como ácidos etanol e enzimas (PUTZKE et al., 2004).

Algumas espécies de zigomicetos são consideradas como potenciais produtores de óleo intracelular contendo ácido γ -linolênico (GLA), um ácido graxo poliinsaturado (PUFA) de fundamental importância alimentar e farmacêutica. O ácido γ -linolênico é, principalmente, produzido a partir do óleo de semente de plantas e está incluído nas preparações farmacêuticas com efeitos benéficos contra condições patológicas tais como a artrite reumatóide, esclerose múltipla, doenças da pele e, principalmente, contra vários tipos de câncer. Pesquisas indicam que o cultivo de diversas espécies de Zygomycetos oleaginosos, como *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabellina*, em diferentes fontes de carbono (por exemplo, glicose e amido) pode levar a diferenças em processo de acumulação de lipídeos, conseqüentemente a composição de ácidos graxos dos lipídeos (CHATZIFRAGKOU et al., 2010).

Em estudo realizado por Bellou et al, (2014), confirmou a bioconversão pelos Zigomicetos, *T. elegans* e *Z. moelleri*, de águas residuárias de óleo de oliva em lipídeos rico em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), adequados para a produção de biodiesel. Similar o que foi provado com a utilização das cepas de *C. echinulata*, *M. isabellina*, *M. ramanniana*, *Mucor sp*, cultivadas em diferentes resíduos agroindustriais (FAKAS et al., 2009; PAPANIKOLAOU et al., 2010; CHATZIFRAGKOU et al., 2011; ECONOMOU et al., 2011; BELLOU et al., 2012).

3.4.1. 1. *Mortierella isabellina* [*Umbelopsis isabellina* (Oudem.) Meyer & Gams 2003]

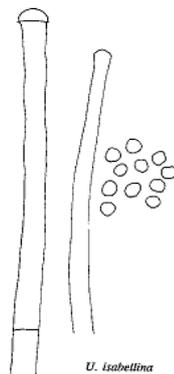
Os membros do grupo *Mortierella isabellina*, são hoje em dia classificados como *Umbelopsis* (*U. isabellina*, *U. ramanniana*) (Meyer & Gams 2003). Os autores através de uma análise filogenética molecular, utilizando o marcador RFPL (Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição) incluindo também as regiões ITS1, 5.8S, ITS2 do DNA ribossomal, todas as espécies conhecidas do grupo *Mortierella isabellina* e outras espécies de Mucorales e *Mortierella*. Concluindo que o grupo *Mortierella isabellina* (monofilético) é distante de espécies de *Mortierella*, subsumindo os táxons em um gênero, *Umbelopsis*, *Umbelopsidaceae* como nova família e as novas combinações *U. isabellina*, *U. ramanniana* e *U. autotrophica* foram propostas.

Portanto a espécie *Mortierella isabellina*, está na seguinte posição de classificação: Reino Fungi, Filo Zygomycota (polifilético – Hibbet et al., 2007), Subfilo Mucoromycotina, Ordem Mucorales, Família *Umbelopsidaceae* (VOIGT & WÖSTEMEYER, 2001)

Crítérios morfológicos distingue o grupo *Mortierella isabellina* (*U. isabellina*, *U. ramanniana* e *U. autotrophica*) com a família *Mortierellaceae*. A família *Mortierellaceae* apresentarem micélio vegetativo dicotomicamente ramificado, colônias muitas vezes exibem odor semelhante ao alho e sua significativa esporulação em meios oligotróficos; quando presente, os zigósporos são hialinos e de parede lisa e apoiados por suspensores desiguais. Espécies de *Umbelopsis* não são conhecidas para formar estruturas sexuais, assumindo uma posição basal entre espécies de Mucorales (MEYER, GAMS, 2003).

A espécie *U. isabellina* apresenta micélio principalmente superficial, ramificado, septação irregular, hialina; esporângios globosos, 7 - 10 µm em diâmetro; Esporangioforos ereto, hialina, ramificado, principalmente no grupo de 2, um pouco inchado na base, afinando na ponta, deixando uma columela menos distinta; esporangiósporos hialina, globosa ou subglobosa, liso, 2,5-3 µm de diâmetro (Figura 7). Clamidósporos globosos, subglobosa, 30 - 40 µm em diâmetro (KWASNA et al., 2006).

Figura 7: Ilustração do esporangióforo, esporos da espécie *U. isabellina*.



Fonte: Meyer, Gams, 2003

Muitas espécies da subdivisão *Mucoromycotina*, são oleaginosos, como *U. isabellina* e *Cunninghamella echinulata* são bastante promissoras na produção de lipídeos, atingindo mais de 40% da sua biomassa (KWASNA et al., 2006).

Espécies de *Umbelopsis* [anteriormente Grupo *M. isabellina* – Meyer e Gams, 2003], são fungos facilmente encontrados em solo. Carvalho 2012, com o objetivo de avaliar a diversidade de fungos da Mata Atlântica, obteve resultados significativos no isolamento deste gênero, como um dos gêneros mais frequentes do filo *Zigomycota*, incluindo a espécie *U. isabellina*,

Ruegger, (2001) cita a espécie que *U. isabellina* vem se destacando em meio a outros micro-organismos de mesma ordem por apresentar em algumas espécies 86% de lipídeos poliinsaturados em sua biomassa total, correspondendo principalmente aos seguintes ácidos graxos: ácido palmítico, ácidos oléicos e linolênicos. Além disso, foi demonstrado que a *U. isabellina* teve melhor desempenho na produção de lipídeos entre 5 fungos oleaginosos que crescem em palha de trigo pré-tratado em ácido sulfúrico diluído, portanto é tolerante a inibidores, sugerindo que este fungo pode ser um bom candidato para produção de lipídeos em matérias-primas renováveis de baixo custo (GAO et al, 2013).

Os fungos do gênero *Mortierella* e *Umbelopsis*, durante anos vêm sendo estudados como produtores de ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido araquidônico, usado na medicina, farmacologia e indústria alimentar (JAREONKITMONGKOL et. al., 1992; EROSHIN et al., 1996; BOTHA et al., 1999; DYAL, NARINE, 2005).

Além do potencial na produção de lipídeos, a espécie *U. isabellina* vêm apresentado resultados promissores na degradação de poluentes, demonstrando capacidade de descolorir corantes, através da produção de manganês-dependente- peroxidase. (YANG et al., 2003).

A espécie *Umbelopsis isabellina* filogeneticamente está relacionada como uma espécie promissora para converter resíduos de biomassa em precursores de biodiesel (ROSSI et al, 2010).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO. Associação Brasileira das Indústrias de Milho. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acessado em 12 de fevereiro de 2015.

AGENCIA NACIONAL DE PETROLEO, GAS NATURAL E BIOCOMBUSTIVEIS (ANP). Dados Estatísticos, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Biodiesel: estratégias para produção e uso no Brasil. Unicorp, 26-27, abr. **Anais**. v. 1, p. 1-23, 2005.

AHMED, S.U.; SINGH, S.K.; PANDEY, A.; KANJILAL, S.; PRASAD, R.B.N. Effects of various process parameters on the production of γ -linolenic acid in submerged fermentation. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, 44 (2), 283-287, 2006.

ALEXOPOULOS, C.J. MIMS; C. W. BLACKWELL M. **Intoductory Mycology**. p.127-144. 1996.

AMARAL, P. F. F., FERREIRA, T. F., FONTES, G. C., COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p.179-186, 2009.

AMARTEY A. LEUNG J. Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *bacillus stearothermophilus* t-13. **Bulletin of the Chemists and Technologists**. Vol. 19. Londres, 2000.

ANDRE, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A.; SARRIS, D.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. **Industrial Crops and Products**, 31, 407–416, 2010.

APOLINÁRIO, F. D. B.; PEREIRA, G. F.; FERREIRA, J. P. Biodiesel e alternativas para utilização da glicerina resultante do processo de produção de biodiesel. **Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e Fluminense**. v. 2, n. 1, p.141-146, 2012.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**. v. 26, p. 56-62, 2007.

AZAD, A.K., RASUL, M.G., KHAN, M.M.K., SHARMA, S. C., HAZRAT, M.A. Prospect of biofuels as an alternative transport fuel in Australia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 43, 331–351, 2015.

BALAT, M. & BALAT, H. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. **Energy Conversion and Management**, 49, p.2727–2741, 2008.

BALAT, M.; BALAT, H. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. **Energy Conversion and Management**. v. 49, p. 2727–2741, 2008.

BELLOU, S., MAKRI, A., SARRIS, D., MICHOS, K., RENTOUMI, P., CELIK, A., PAPANIKOLAOU, S., AGGELIS, G. The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by Zygomycetes. **Journal of Biotechnology**. 170, 50-59, 2014.

BELLOU, S., MOUSTOGIANNI, A., MAKRI, A. AGGELIS, G. Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by zygomycetes grown on glycerol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 166, 146-158, 2012.

BENJAMIN, R. K. **Zygomycetes and their spores**. In *The Whole Fungus* (B. Kendrick, ed.) 2: 573–621. National Museum of Natural Sciences, Ottawa, 1979.

BEOPOULOS, A., MROZOVA, Z., THEVENIEAU, F., LE DALL, M-T., HAPALA, I., PAPANIKOLAOU, S., CHARDOT, T., NICAUD, J-M. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Appl. Environ. Microbiol.** 74: 7779-7789, 2008.

BEOPOULOS, A., NICAUD, J.-M. Yeast : A new oil producer ? **OCL** 19(1): 22-28. 2012; doi : 10.1684/ocl.2012.0426 2012.

BHARTI, R. K., SRIVASTAVA, S., THAKUR, I. S. Production and characterization of biodiesel from carbon dioxide concentrating chemolithotrophic bacteria, *Serratia* sp. ISTD04. **Bioresource Technology**, 153, 189–197, 2014.

BONONI, V. L. R.; TRUFEM, S. F. B. (Org.) **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: Noções básicas de taxonomia e aplicação biotecnológicas**. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p184. 1998.

BOTHA A., PAUL I., ROUX C., KOCK J.L.F., COETZEE D.J., STRAUSS T., MAREE C. An isolation procedure for arachidonic acid producing *Mortierella* species. A. **Van Leeuw. J. Microbiol.** 75: 253–256, 1999.

BOURNAY, L.; CASANAVE, D.; DELFORT, B.; HILLION, G.; CHODORGE, J.A. New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. **Catalysis Today**, 106, p.190–192, 2005.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - ANVISA. RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004. **Diário Oficial da União**. Brasília, 10 de dezembro de 2004.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 358 de 29 de abril de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2005. **Diário Oficial da União**. Brasília, 04 de maio de 2005.

CARIOCA J.O.B.; HILUY FILHO, J.J.; LEAL, M.R.L.V.; MACAMBIRA, F.S. The hard choice for alternative biofuels to diesel in Brazil. **Biotechnology Advances**, 27, p.1043–1050, 2009.

CARLILE, M.;J.; WTKINSON, S.C. **The fungi**. London: Academic Press, 460p. 1997.

CARRERO, A.; VICENTE, G.; RODRIGUEZ, R.; LINARES, M.; DEL PESO, G.L. Hierarchical zeolites as catalysts for biodiesel production from *Nannochloropsis* microalga oil. **Catalysis Today**, 167, 148–153, 2011.

CARVALHO, V.G. Diversidade de Fungos do solo da Mata Atlântica. **Tese (Doutorado)**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 203p.,2012.

CASA CÍVIL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Biodiesel: estratégias para produção e uso no Brasil. In: **ANAIS BIODIESEL: ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO E USO NO BRASIL**, v.1, p. 24-33. 2005.

CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biological Reviews** 73: 203–266, 1998.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal Bioscience Bioengineering**, 87 (1), 1-14, 1999.

CERTIK, M.; SLAVIKOVA, L.; MASRNOVA, S.; SAJBIDOR, J. Enhancement of nutritional value of cereals with γ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, 44 (1), 75-82, 2006.

CHANDA S, CHAKRABATI S Plant origin liquid waste: a resource for single-cell protein production by yeast. **Bioresource Technol.** 57(1):51-54, 1996.

CHATZIFRAGKOU, A., MAKRI, A., BELLOU, S., MAVROU, M., MASTORIDOU, M. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**. 36,2, 1097-1108, 2011.

CHATZIFRAGKOU, A.; FAKAS, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 112, 1048–1057, 2010

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advanced**, v. 25, p. 294.306. 2007.

CHRISTIE, W.W. **Lipid analysis: isolation, seeparation, identification, and structural analysis of lipids**. 2.ed New York: Pergamon Press, p.207, 1982.

CHRISTOPHE, G., KUMAR, V., NOUAILLE, R., GAUDET, G., FONTANILLE, P., PANDEY, A., SOCCOL, C.R. LARROCHE, C. Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 29–46, 2012.

DELALIBERA, H.C. Utilização do óleo de girassol como combustível em unidade de potência monocilindro ciclo diesel. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2009.

DELATORRE, A. B.; RODRIGUES, M. P.; AGUIAR, C. J.; ANDRADE, V. V. V.; ARÊDES, A.; PEREZ, V. H. Produção de biodiesel: considerações sobre as diferentes matérias-primas e rotas tecnológicas de processos. **Academic Journal Database**. p. 21- 47, 2011.

DEMAIN, A. L., ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, p. 41.455. 2008.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; STRUB, C.; SCHORR-GALINDO, S. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. **Biomass and bioenergy**, 68, 135-150, 2014.

DU, W. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology** 79, 331.337, 2008.

DYAL, S. D., NARINE, S. S., Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food Res. Int.**, 38, 445–467, 2005.

EASTERLING, E. R., TODD FRENCH, W. HERNANDEZ, R., LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 356.361, 2009.

ECONOMOU, CH N., AGGELIS, G., PAVLOU, S., VAYENAS, D. V. Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. **Bioresource technology**, v. 102, n. 20, p. 9737–42, out. 2011.

ECONOMOU, CH N., MAKRI, A., AGGELIS, G., PAVLOU, S., VAYENAS, D. V. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. **Bioresource Technology** 101 1385–1388, 2010.

EROSHIN, V.K., DEDYUKHINA, E.G., CHISTYAKOVA, T.I., ZHELIFONOVA, V.P., BOTAST, R.J. Studies on arachidonic acid production by *Mortierella* fungi — a microbiological method for selecting arachidonic acid producers. **Microbiology** 65, 26–31, 1996.

FAHY, E., SUBRAMANIAM, S., BROWN, H. A., GLASS, C. K., MERRILL, A. H. JR., MURPHY, R. C., RAETZ, C. R. H., RUSSELL, D. W., SEYAMA, Y., SHAW, W., SHIMIZU, T., SPENER, F., MEER, G. V., VANNIEUWENHZE, M. S., WHITE, S. H., WITZTUM, J. L.,

DENNIS, E. A. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research** 46, 839-1618, 2005.

FAKAS, S., MAKRI, A., MAVROMATI, M., TSELEPI, M., AGGELIS, G. Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. **Bioresource technology**, 100, 23, 6118-20, 2009a.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BATSOS, A.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass and bioenergy**, 33, 573 – 580, 2009b.

FERREIRA, M. O. Purificação da Glicerina Bruta Obtida A Partir da Transesterificação do Óleo de Algodão. **Dissertação de Mestrado**, Natal, RN., 106 f, 2009

FILIPOVIC S. S.; RISTIC, M. D.; SAKAC M. B. Technology of Corn Steep Application in Animal Mash and their Quality. **Roumanian Biotechnol Letts**, v. 7, p. 705-710, 2001.

FONTANILLE, P., KUMAR, V., CHRISTOPHE, G., NOUAILLE, R., LARROCHE, C. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, 2012.

FONTES G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 8, 2091-2099, Rio de Janeiro, 2008.

GAO, D.; ZENG, J.; ZHENG, Y.; YU, X.; CHEN, S. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. **Bioresource Technology**, 133, 315–321, 2013.

GUNSTONE, F. D. ; HARWOOD, J. L. ; DIJKSTRA, A. J. **The Lipid Handbook**. 3 ed., CRC Press, 2007.

HANSSON, L.; DOSTÁLEK, M. Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.28, n.3, p.240-6, 1988.

HARWOOD, J.L. Plant acyl lipids: structure, distribution and analysis. In: **The Biochemistry of Plants**. Vol. 4. Lipids: Structure and Function, pp. 1-55 (ed. P.K. Stumpf, Academic Press, New York), 1980.

HAWKSWORTH D.L., KIRK P.M., SUTTON BC, PEGLER D.N. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**, 8th edn. CABI International, Wallingford, 1995.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimensiono of biodiversity; magnitude, significance, and conservation. **Mycol. Res.**, v95, p. 641-55, 1995.

HESELTIME, C. W.; ELLIS, J. J. **The Fungi: an advanced treatises**. In: AINSWORTH. SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A. S. (Eds.). New York: Academic Press. v. 4B. p. 187-217. 1973.

HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O.E., HUHDORF, S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. Pt 5, p. 509–47, 2007.

HIGASHIYAMA, K., FUJIKAWA, S., PARK, E. Y., SHIMIZU, S. Production of Arachidonic Acid by *Mortierella* Fungi. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, 7: 252-262, 2002.

HOOG GS DE, GUARRO J., **Atlas of Clinical Fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn. 1995.

HUANG, C., CHEN, X. F., XIONG, L., CHEN, X.D., MA, L. L., CHEN, Y. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 129–139, 2013.

HUANG, C., CHEN, X.-F., XIONG, L., YANG, X.-Y., CHEN, X.-D., MA, L.-L., CHEN, Y.. Microbial oil production from corncob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. **Biomass and Bioenergy**, v. 49, n. 2, p. 273–278, fev. 2013.

HUANG, C.; CHEN, X.; XIONG, L.; CHEN, X.; M. L.; CHEN, Y. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. **Biotechnology Advances** 31, 2, 129–139, 2012.

HUSSAIN, J., RUAN, Z., NASCIMENTO, I. A., LIU, Y. LIAO, W. Lipid profiling and corresponding biodiesel quality of *Mortierella isabellina* using different drying and extraction methods. **Bioresource technology**, v. 169, p. 768–72, out. 2014.

ITO, T., NAKASHIMADA, Y., SENBA, K., MATSUI, T., NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 260-265. 2005.

JAREONKITMONGKOL S, SHIMIZU S, YAMADA H Fatty acid desaturation defective mutants of an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. **J Gen Microbiol** 138:997–1002, 1992.

JEENNOR, S.; LAOTENG, K.; TANTICHAROEN, M.; CHEEVADHANARAK, S. Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, 259, 60-66, 2006.

JIN, M., SLININGER, P. J., DIEN, B. S., WAGHMODE, S., MOSER, B. R., ORJUELA, A., SOUSA, C., BALAN, V. Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery : feasibility and challenges. **Trends in Biotechnology**. 33, 1, 43-54, 2015

JIN, M.-J., HUANG, H., XIAO, AI-H., ZHANG, K., LIU, X., LI, S., PENG, C. A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. **Biotechnol Lett**, 30:1087–1091, 2008.

JUNQUEIRA, O.M.; ANDREOTTI, M.O.; ARAÚJO, L.F.; DUARTE, K.F.; CANCHERINI, L.C.; RODRIGUES, E.A. Valor energético de algumas fontes lipídicas determinado com frangos de corte. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, 34 (6), 2335-2339, 2005.

KATES, M. **Glycolipids, phosphoglycolipids, and sulfoglycolipids**. New York : Plenum Press, p.520, 1990.

KAVADIA A, KOMAITIS M, CHEVALOT I, BLANCHARD F, MARC I, AGGELIS G Lipid and gamma linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. **J Am Oil Chem Soc** 78:341–346, 2001.

KENNEDY, M. J., READER, S. L., DAVIES, R. J. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linoleic acid production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.42, p 625-34, 1993.

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. **Microbial Cell Factories**, 11:71, 2012.

KIRK, P.M. ; CANNON, P.F. ; DAVID, J.C. ; STALPERS, J.A. (editors). **Ainsworth & Bisbys Dictionary of Fungi**. 10 edition. Wallingford. CABI Publishing. 2008.

KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C., STALPERS, J.A. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**, 9th edn. CABI Publishing, Wallingford, 2001.

KITCHAA, S. & CHEIRSILPB, B. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. **Energy Procedia**, 9, p. 274 – 282, 2011.

KOGA, Y.; MORII, H. Recent advances in structural research on ether lipids from Archaea including comparative and physiological aspects. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 69, 2019-2034, 2005.

KOIKE, Y.; CAI, H. J.; HIGASHIYAMA, K.; FUJIKAWA, S.; PARK, E. Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpine*, **Journal Bioscience Bioengineering**, New York, 91 (4), 382-389, 2001.

KUMAR, I., RAMALAKSHMI, M. A., SIVAKUMAR, U., SANTHANAKRISHNAN, P., ZHAN, X. Production of microbial oils from *Mortierella* sp for generation of biodiesel livestock. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 24, p. 4105–4111, 2011.

KWASNA, H., WARD, E., BATEMAN, G.L., Phylogenetic relationships among zygomycetes from soil based on ITS1/2 rDNA sequences. **Mycological Research** 110: 501–510, 2006.

LAUFENBERG G, KUNZ B, NYSTROEM M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technol.** 87(2): 167-198, 2003.

LEHNINGER, A.L. In **Bioquímica**. 4ª Ed. São Paulo: Sarvier, Cap. 10. p.342-367, 2006.

LI, L.. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 43, p. 58–62, 2006.

LI, M.; LIU, G.; CHI, Z., CHI, Z. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and bioenergy**, 34, 101 – 107, 2010.

LIGGETT W. R. KOFFLER H. **Corn steep liquor in microbiology**. Universidade Lafayet. Vol. 12. U.S.A. 1998.

LIU, B., ZHAO, Z. K. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 82:775–780, 2007.

LIU, G.-Q., LIN, Q.-L., JIN, X.-C., WANG, X.-L., ZHAO, Y. Screening and fermentation optimization of microbial lipid-producing molds from forest soils. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 4(14), pp. 1462-1468, 18 July, 2010.

LÔBO, I.P.& FERREIRA, S.L.C. Biodiesel: Parâmetros de Qualidade e Métodos Analíticos. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 6, 1596-1608, 2009

LU, J., PENG, C., JI, X.-J., YOU, J., CONG, L., OUYANG, P. Fermentation characteristics of *Mortierella alpina* in response to different nitrogen sources. **Applied biochemistry and biotechnology**. 164, 7, 979-990, 2011.

LUQUE, R., HERRERO-DAVILA, L., CAMPELO, J. M., CLARK, J. H., et al., Biofuels: A technological perspective. **Energy Environ. Sci.** 2008, 1, 542–564.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Bioresource Technology Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2351–2358, 2010.

- MENEGASSI, B. Extrusão de farinha de mandioca-salsa: efeito da temperatura, rotação e umidade nas características físicas dos extrusados. **Braz J Food Technol.**, v.10, n.4, p. 252-258, 2007
- MENEGUETTI C. C, DOMINGUES J. L. Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos. **Revista eletrônica Nutritime**, Vol. 5, No 2, p. 512-536, março/abril 2008.
- MENG, X., YANG, J., XU, X., ZHANG, L., NIE, Q., XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1–5, jan. 2009.
- MEYER W, GAMS W. Delimitation of *Umbelopsis* (Mucorales, *Umbelopsidaceae* fam. nov.) based on ITS sequence and RFLP data. **Mycological Research** 107: 339–350, 2003.
- MITRA, D., RASMUSSEN, M. L., CHAND, P., CHINTAREDDY, V. R., YAO, L., GREWELL, D. Value-added oil and animal feed production from corn-ethanol stillage using the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Bioresour. Technol.**, v. 107, p. 368–75, mar. 2012.
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the Fungi**. 4.d. New Jersey: Prentice Hall, p.574, 1996.
- MOREAU, P., BESSOULE, J.J., MONGRAND, S., TESTET, E., VINCENT, P. AND CASSAGNE, C. Lipid trafficking in plant cells. **Prog. Lipid Res.**, 37, 371-391, 1998.
- MOREIRA, N.X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutr.J. Brazilian Soc. Food.**, São Paulo, SP. , v.24, p.105-123, dez., 2002.
- MOTA, C. J. A, SILVA, C. X. , GONCALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v.32, p 36-57. 2009.
- NWACHUKWU, R. E. S., SHAHBAZI, A., WANG, L., WORKU, M., IBRAHIM, S., SCHIMMEL, K. Optimization of cultural conditions for conversion of glycerol to ethanol by *Enterobacter aerogenes* S012. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 12, jan. 2013.
- PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.** 74 (1), 69–80, 2000.

PAPANIKOLAOU S., MUNIGLIA L., CHEVALOT I., AGGELIS G., MARC I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol, **Journal of Applied Microbiology**, 92, 737-744, 2002.

PAPANIKOLAOU S.; GALIOTOU-PANAYOTOU M.; FAKAS S.; KOMAITIS M.; AGGELIS, G. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. **Bioresource Technology**, Athens Greece, v.99, n.7, p.2419-2428, 2008.

PAPANIKOLAOU, S, AGGELIS, G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. **Lipid Technol**; 21:83-7, 2009.

PAPANIKOLAOU, S. MUNIGLIA, S., CHEVALOT, L. AGGELIS, I., MARC, G. I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 737.744. 2002.

PAPANIKOLAOU, S., AGGELIS, G., *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lip- ids. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 112, 639–654, 2010.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 1052–1073, 2011.

PAULO, G.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol : A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30–39, 2009.

PELIZER, H.L; PONTIERI, M. MORAES,I. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Tecnology Management e Inovation**, Vol. 2 São Paulo, SP, 2007.

POSADA, J.A., CARDONA, C.A. Design and analysis of fuel ethanol production from raw glycerol. **Energy**; 35(12):5286-93, 2010.

POUSA, G. P.A.G.; Santos, A.L.F., Suarez, P. A.Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**,35,p. 5393–5398, 2007.

PUPIN, A. M.; MESSIAS, C.L.; PIEDRABUENA, A. E.; ROBERTS, D. W. Total Lipids And Fatty Acids of Strains of *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31:121-128, 2000.

PUTTI, F. F.; LUDWIG, R.; MACINI, N. Análise da viabilidade da produção de biodiesel a partir do uso do algodão. **VIII Fórum Ambiental da Alta Paulista**. v. 8, n. 7, p. 127-142, 2012.

PUTZKE, J. ; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**, 2a edicao Edunisc, Santa Cruz do Sul. p168, 2004.

RAIMONDI, S., ROSSI, M., LEONARDI, A., BIANCHI, M. M., RINALDI, T., AMARETTI, A. Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. **Microbial cell factories**. 13, 1, 83, 2014.

RATLEDGE, C. In: **Microbial Lipids**, RATLEDGE, C. e WILKINSON, S. G., (eds), vol. I, 2ed., pp, 552-687, Academic Press, London, 1986.

RATLEDGE, C., WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Adv. Appl. Microbiol.**, 51, 1–51, 2002.

RATLEDGE, C.; S. G. WILKINSON. In: **An overview of microbial lipids. Microbial lipids**; C. Ratledge, S. G. Wilkinson. Ed., Academic Press: London 1988; pp. 3-22, 1989.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILO, R. E SILVA, S.S. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasil, .n.37, p. 44-51, 2008.

ROSSI M, AMARETTI A, RAIMONDI S, LEONARDI A.: **Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi**. In Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies. Edited by Stoytcheva M, Montero G. Rijeka, Croatia: InTech - Open Access Publisher; 71–92, 2010.

ROSSI, D.M., COSTA, J.B., SOUZA, E.A., PERALBA, M.R., AYUB, M.A.Z. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from the environmental consortia. **Renew Energy** 39:223–227, 2012.

RUEGGER, M. J. S. Atividade enzimática e produção de ácido gama linolênico (AGL) por fungos filamentosos isolados do solo, da Estação Ecológica de Jureia-Itatins, SP. Rio Claro. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, p. 82, 2001.

RYWIŃSKA, A.; RYMOWICZ, W.; MARCINKIEWICZ, M. Valorization of raw glycerol for citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 1–10, 15 jun. 2010.

SANTOS, S.F.M.; NOBREGA, J.E.; PINTO, G.A.S.; MACEDO, G.R.; SILVA, F.L.H. Caracterização do resíduo seco do pedúnculo do caju para obtenção de pectinase por fermentação semi-sólida. In: **Simpósio Nacional de Bioprocessos**. 15, Recife –PE, 2005.

SCHIPPER et al., 1975

SHAHIDI, F. Extraction and Measurement of Total Lipids. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2001.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia medica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 171-190, 2004.

SILVA, G. P., MACK, M., CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances Volume**, v. 27, p. 30-39. 2009.

SILVA, T.L.; PINHEIRO, H.M.; ROSEIRO, J.C. Stress-induced morphological and physiological changes in γ -linolenic acid production by *Mucor fragilis* in batch and continuous cultures. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, 32 (7), 880- 888, 2003.

SINGH, S.P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14, p.200–216, 2010.

TIMOFIECSYK, F. R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de Resíduos na Indústria de Alimentos: **Revisão. B. CEPPA**, 18 (2), pp. 221-236, 2000.

TKACHENKO, A. F., TIGUNOVA, O. A., SHULGA, S. M. Microbial Lipids as a Source of Biofuel. **Cytology and Genetics**, Vol. 47, No. 6, pp. 343–348. 2013.

UFF, Universidade Federal de Fluminense, **Boletim informativo da Fundação Euclides da Cunha**, Pagina <http://www.uff.br>. Nov/dez-2011

VENKATA SUBHASH, G.; VENKATA MOHAN, S. Lipid accumulation for biodiesel production by oleaginous fungus *Aspergillus awamori*: Influence of critical factors. **Fuel**, v. 116, p. 509–515, jan. 2014.

VICENTE, G.; BAUTISTA. F. L.; RODRIGUEZ, R.; F. GUTIERREZ. J.; SADABA, I.; VAZQUEZ, R. M. R.; TORRES-MARTINEZ, S.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, 48, p.22–27, 2009.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; RODR.

□ LGU

RUIZ- V_AZQUEZ, R. M.; TORRES-MART.

□ LNE

Transformation of Fungal Biomass from Submerged Cultures into Biodiesel. **Energy Fuels** 24, 3173–3178, 2010.

VOIGT K, WÖSTEMEYER J. Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1alpha genes. **Gene**. 30;270(1-2):113-20, 2001.

WANG, F., HU, J.-H., GUO, C., LIU, C., -Z. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. **Bioresource technology**, v. 166, p. 602–5, ago. 2014.

WANG, X. Z., ZHUGE, J., FANG, H., PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: a review, **Biotechnology Advanced**, v. 19, p. 201–223. 2001.

WEN. Z, PYLE, D.J., ATHALYE, S.K. Glycerol waste from biodiesel manufacturing. In: Aggelis G, editor. Microbial conversions of raw glycerol. New York: **Nova Science Publishers Inc.**; p. 1-7, 2009.

WYNN, J.P.; HAMID, A.A.; LI, Y.; RATLEDGE, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. **Microbiology**, New York, 147, 2857-2864, 2001.

XING, D.; WANG, H.; PAN, A., WANG, J., XUE, D. Assimilation of corn fiber hydrolysates and lipid accumulation by *Mortierella isabellina*. **Biomass and bioenergy** 39, p. 494-501, 2012.

YAMAMOTO, S.M.; MACEDO, F.A.F.; ZUNDT, M.; MEXIA, A.A.; SAKAGUTI, E.S.; ROCHA, G.B.L.; REGAÇONI, K.C.T.; MACEDO, R.M.G. Fontes de óleo vegetal na dieta de cordeiros em confinamento. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, 34 (2), 703-710, 2005.

YANG, Q.; YANG, M.; PRITSCH, K.; YEDILER, A.; HAGN, A.; SCHLOTTER, M.; KETTRUP, A. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. **Biotechnology Letters** v. 25, p. 709-713. 2003.

YANG, X., JIN, G., GONG, Z., SHEN, H., BAI, F., ZHAO, Z. K. Recycling microbial lipid production wastes to cultivate oleaginous yeasts. **Bioresource Technology**, 175, 91-96, 2015.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 18, p. 213-219, 2007.

ZENG, A.P., BIEBL, H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 74:239-59, 2002.

ZHANG, Y.; DUBE, M.A.; MCLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**. v. 89, p. 1-16, 2003.

ZHENG, Y.; YU, X.; ZENG, J.; CHEN, S. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels** 5:50, 2012.

ZHU, L. Y., ZONG, M. H., WU, H., Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. **Bioresour. Technol.**, 99, 7881-7885, 2008.

CAPÍTULO II

Artigo submetido a Revista: **Journal of Fungi**

ISSN 2309-608X



Journal of
Fungi

doi:10.3390/jof10x000x

J. Fungi **2015**, *1*, 1-x manuscripts; doi:10.3390/jof10x000x

OPEN ACCESS

Journal of Fungi

ISSN 2309-608X

www.mdpi.com/journal/jof

Produção de óleo microbiano por *Mortierella isabellina* utilizando de glicerol residual e milhocina como substrates

Manuela Cristina Mota Lins^{1*}; Adriana Ferreira de Souza²; Bruno Guedes Campelo, Norma Buarque Gusmão³, Patrícia Mendes de Souza⁴, Galba Maria Campos Takaki^{4*}

¹ Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, 50670-901, Recife – PE, Brazil. (M.C.M.L.) E-Mail: motalinsmr@gmail.com

² Mestrado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, 50670-901, Recife – PE, Brazil. (A.F.S.) E-Mail: adrife.souza@gmail.com,

³ Dept. Antibióticos, Universidade Federal Pernambuco-UFPE, 50670-901, Recife – PE, Brazil. (N.B.G) E-Mail: normagusmao@gmail.com

⁴ Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology-NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, Recife – PE, Brazil. (P.M.S.) E-Mail:

tyttams@hotmail.com;

(G.M.C.T.) E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

* Corresponding Author: Profa.Dra.Galba Maria de Campos Takaki, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife, PE, Brasil
Phone: +55 81 21194017; Fax: +55 81 21194043. E.mail : galba_takaki@yahoo.com.br

Received: / Accepted: / Published:

Abstract:

O estudo dos fungos compreende uma vasta área de pesquisa. Os fungos filamentosos oleaginosos vêm se apresentando como alternativa de inovação biotecnológica, tendo em vista o rápido crescimento e adaptação dos mesmos em diversos meios de cultivo e nos mais diferentes substratos, entre eles a espécie *Mortierella isabellina* que é considerada oleaginosa por apresentar mais de 86% de sua biomassa seca de lipídios. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento

radial do fungo *Mortierella isabellina*, em meios composição definidas e suplementados com resíduos agroindustriais- glicerol residual (residual da produção de biodiesel) e milhocina (resíduo do beneficiamento do milho), e analisar morfológicamente suas estruturas e presença de lipídeos intracelulares. Os resultados de crescimento mostraram que o fungo obteve uma velocidade de crescimento maior no meio proposto para Mucorales, comparando os meios suplementados com os resíduos, o micro-organismo se desenvolveu mais rapidamente na concentração de 4%, onde também foi observada uma alta produção de esporos de reprodução. Em relação às análises microscópicas foi verificado presença de corpos lipídicos, produção de esporos e crescimento de hifas mau distribuídas nos meios contendo resíduos agroindustriais. As análises citoquímicas confirmaram através da técnica de coloração por sudan black, a presença de lipídeos armazenados nas estruturas celulares do fungo cultivado nos meios estudados e principalmente no meio suplementado com glicerol residual e milhocina a 8%. Portanto, os estudos demonstraram que a espécie *Mortierella isabellina* possui uma capacidade de se adaptar e se desenvolver em resíduos de glicerol residual e milhocina e capacidade de produzir lipídeos intracelulares.

Keywords: *Mortierella isabellina*, resíduos, glicerol residual do biodiesel, milhocina, crescimento

1. Introdução

A busca por novas fontes de lipídios para objetivos tecnológicos vem se apresentando como alternativa. Lipídeos microbianos podem tornarem-se adequados para serem utilizados em diersas áreas industriais, o que permitiria a liberação de uma significativa quantidade de óleos de origem animal e vegetal, tendo em vista o rápido crescimento e adaptação dos micro-organismos em diversos meios de cultivo e nos mais diferentes substratos [1,2].

Os óleos microbianos, também chamados “single cell oil” (SCO), são produzido por micro-organismos oleaginosos, têm sido de potencial interesse para vários pesquisadores nas últimas décadas devido às suas importantes funções e características específicas. Os micro-organismos, que incluem bactérias, leveduras, fungos e microalgas, que podem acumular mais de 20% de lipídios do seu peso seco, podendo chegar a capacidade de acumular até 70% durante o período de estresse metabólico, são considerados micro-organismos oleaginosos [3,4].

Os lipídeos microbianos apresentam um potencial industrial e interesse econômico, devido suas características próprias e amplo campo de aplicação. São sintetizados durante a fase de crescimento, fazendo parte do processo metabólico e como reserva de carbono. A quantidade e

qualidade desse processo esta relacionada de acordo com cada espécie, e os nutrientes disponíveis no cultivo. [1].

Os lipídeos são importantes componentes de fungos, tanto em termos de estrutura e constituição da membrana. Muitos estudos têm demonstrado a importância de lipídeos para o desenvolvimento, esporulação e germinação e seu envolvimento em vários processos fisiológicos. O teor de lipídeos de esporos de fungos diversos varia de 5 a 17% de peso seco, mas esporos de algumas espécies podem conter até 35% de lipídeos. Os principais fatores que influenciam o grau de produção de lipídeos são a natureza e percentagem de carbono (C) e nitrogênio (N), como fontes de nutrientes no meio de cultivo [5-8]

Os principais componentes dos constituintes lipídicos em micro-organismos são os triglicerídeos que correspondem em aproximadamente 75% enquanto que 2% são de ésteres, 3% de fosfolipídeos, 4% de esteróis, 5% de mono-e diacilglicerídeos e 10% de ácidos graxos livres [1]. Os ácidos graxos podem variar o comprimento das cadeias de doze a vinte e quatro carbonos, entre os principais encontrados estão o ácido saturado palmítico (C16:0), e os insaturados oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) [8,9].

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) recentemente têm atraído muitas pesquisas pelo resultado de suas atividades biológicas e efeitos clínicos. O ácido aracdônico (ARA) representante dos ω -6 PUFA, é considerado um importante constituinte biológico natural de membranas e um precursor para numerosos eicosanoides como prostaglandinas, tromboxanes e leucotrienos [5].

Os fungos filamentosos da ordem *Mucorales*, como *Mortierella sp.*, *Cunninghamella echinulata*, *Mucor rouxii*, *M. circinelloides*, *Mucor hiemalis*, são os mais intensamente estudados para a produção de ácidos graxos poliinsaturados. Os fungos filamentosos *Mortierella sp.* e *Cunninghamella echinulata*, são conhecidos por acumularem naturalmente elevadas concentrações do ácido gama linolênico um ácido graxo essencial, possuindo várias funções importantes, dentre elas, a formação de prostaglandina. Seu uso é recomendado no tratamento de: tensão pré-menstrual, osteoporose, processos inflamatórios e na pressão sangüínea alta. Este ácido vem sendo extraído principalmente de plantas, mas determinados microrganismos podem ser bons produtores, o que acarretaria algumas facilidades, como o não uso de grandes áreas de plantios. A espécie *Mortierella isabellina* se destaca com até 86% de lipídeos poliinsaturados em sua biomassa total [10-19].

Vários estudos relatam o acúmulo de lipídios por leveduras e fungos filamentosos oleaginosos sobre diferentes substratos tais como glicerol residual, água de esgoto, soro de leite, melão e milhocina [5, 20-22].

A utilização de resíduos agroindustrias destaca-se como uma alternativa inovadora, pela redução no custo de produção como também no descarte no meio ambiente. O aproveitamento do glicerol residual excedente da produção de biodiesel vem apresentando resultados satisfatórios com a produção de biomassa rica em lipídeos no cultivo de fungos filamentosos, sendo uma importante fonte de carbono para microbiologia industrial [7, 8, 23,24].

Em microrganismos oleaginosos, a acumulação de lipídeos é diferenciada em cultivos contendo substratos hidrofóbicos e hidrofílicos. O processo de acumulação chamado “de novo” é realizado por micro-organismos cultivados em substratos hidrofílicos com limitação de nitrogênio e a composição química dos lipídeos produzidos não se altera significativamente durante o processo de fermentação. Em contraste, durante o processo de acumulação “ex novo” novas

composição de ácidos graxos (em níveis extra e intracelulares) que não existiam anteriormente na gordura do substrato ode ser produzido, e portanto, é feita uma bio-modificação da gordura do substrato, melhorando a produção de lipídeos com alto valor agregado, o que torna os substratos hidrofóbicos um foco para estudos futuros. [21,24].

Um outro resíduo agroindustrial gerado é a milhocina, que é obtida através do beneficiamento do milho, apresenta um teor em 25% proteína devendo ser considerado como fonte de nitrogênio orgânica, essencial para o crescimento celular [25]

Neste trabalho foi investigado o perfil do crescimento do fungo *Mortierella isabellina*, utilizando meios de composição definida (Dextrose Ágar e Hesseltine Anderson sólidos), como também meios contendo resíduos agroindustriais (glicerol residual e milhocina), através de estudos morfológicos, ultraestruturais e citoquímica para avaliar a presença de lipídeos intracelulares.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismo: neste trabalho foi utilizado a *Mortierella isabellina* URM 3534, gentilmente cedida pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, a qual foi isolada da rizosfera de *Vernoniae herbácea* e, sendo mantida na Coleção de Culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco) - registrada no World Federation for Culture Collection-WFCC.

2.2. Resíduos Agroindustriais

Glicerina Residual: O resíduo agroindustrial foi oriundo do processo de produção de biodiesel a partir de óleo de algodão pela Usina de Experimental de Produção de Biodiesel, gentilmente cedida pelo Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste.

Milhocina - Resíduo agroindustrial procedente do processo de refinação do milho, gentilmente cedido pela indústria Corn Products Ltda, localizada em Vitória de Santo Antão-PE.

2.3. Cinética de crescimento em meio sólido:

Este estudo foi realizado utilizando os seguintes meios de cultura: Batata Dextrose Ágar (BDA), meio sintético para Mucorales descrito por Hesseltine e Anderson, [26] (H&A) e meio suplementado com glicerol residual e milhocina (GM), em três concentrações diferentes - 2%, 4% e 8% - no meio basal constituído de 0,4g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,0g de KH_2PO_4 ; 0,003g de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,0001g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, para 1000ml de água destilada. Todos os meios foram padronizados para pH=6,0. Para realização dos experimentos foi utilizada a metodologia adaptada de Laszlo e Silman [27] onde a partir do pré-inóculo da cultura de *Mortierella isabellina*, plaqueada em meio sintético numa concentração de 10^7 células/mL crescida por 72h a temperatura de 28°C, foram retirados discos de 90 mm de diâmetro, com o auxílio de um vazador. Estes inoculados no centro de cada placa contendo os respectivos meios a serem estudados, e posteriormente foram incubadas a temperatura de 28°C, durante um período de 264hs. O crescimento radial foi obtido a partir da medida do diâmetro médio do micélio do fungo a cada 24 horas com um paquímetro digital. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os cálculos de medidas de crescimento para os tratamentos foram avaliados segundo a seguinte equação: $D = 2r - d$, onde D = Diâmetro de Crescimento; r= raio da área recoberta pelo crescimento do fungo e d= Diâmetro do inoculo. A avaliação da velocidade de crescimento radial nos meios utilizados foi

determinada pela declividade da reta obtida pela regressão linear, segundo Meinicke, [28] conforme a Equação 1:

$$[r(t) = a + V_{cr} \cdot t] \quad (1)$$

Em que:

$r(t)$ é o raio da colônia (mm);

a é a constante da regressão linear,

V_{cr} é a velocidade de crescimento radial (mm/h);

t é o tempo de cultivo (h).

2.4. Avaliação morfológica de *Mortierella isabellina* por microscopia de luz:

Para a melhor visualização da morfologia microscópicas da *M. isabellina* de acordo com cada meio estudado, foi realizado a técnica do microcultivo em lâmina. Segundo Riddell [29], esta técnica preserva as estruturas em boas condições para o estudo morfológico detalhado, como estruturas formadoras de esporos. Para preparação das análises de microcultivo, foram preparadas lâminas armazenadas em placas de Petri previamente estéreis arranjadas sobre um suporte, onde nestas foram adicionadas alíquotas dos respectivos meios, inoculado o fungo e coberto por lamínula. O microcultivo foi incubado a temperatura ambiente e acompanhado diariamente o desenvolvimento da cultura. Após crescimento da amostra, retirou-se a lamínula cuidadosamente, colocando-a sobre uma lâmina com uma gota de azul de lactofenol-algodão evitando a formação de bolhas de ar. As bordas das lamínulas foram fechadas com esmalte e examinadas ao microscópio óptico, no aumento de 100x.

2.5 Microscopia de Varredura:

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para obter imagens de alta qualidade para as amostras cultivadas nos meios de Heseltine e Anderson, e nos meios que utilizaram glicerol residual e milhocina nas três concentrações (2,4 e 8%). Do cultivo do micro-organismo crescido por um período de 168 horas retirou-se amostras que foram lavadas em solução tampão salina-fosfato (PBS), pH 7,2 por duas vezes, durante 10 minutos. Em seguida, fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato, 0,1 M, pH 7,4, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Após a etapa de fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato, duas vezes, durante 10 minutos. Na pós-fixação foi utilizado o verde malaquita 0,05% em tampão cacodilato, durante 1 hora a temperatura ambiente, em condições de escuridão. Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M e após submetidas ao processo de desidratação com álcool etílico em proporções de 50%, 70%, 90% e 100% e serão submetidas ao ponto crítico. As amostras serão montadas em suportes de alumínio para posterior visualização [30].

2.6. Análise citoquímica:

Para análise citoquímica de lipídios as biomassas após de 7 dias de crescimento foram processadas para visualização em microscópio de fluorescência. As amostras foram fixadas em paraformaldeído (PFA) e solução de tampão fosfato (PBS), pH 7,2. Após a etapa de fixação as

amostras foram lavadas em tampão fosfato (PBS). Em seguida foram imersas no corante Sudan Black B por 10 minutos, em condições de escuridão. Após foram lavadas em álcool a 70% para retirar o excesso do corante e em seguida submetidas a 37°C por 1 hora. Em seguida as amostras foram lavadas com água destilada e contra-coradas com safranina por 30 segundos e novamente lavar com PBS. As lâminas foram montadas utilizando uma gota de glicerol residual tamponada e visualizadas ao microscópio óptico, as gotículas de óleo neste método são coradas em negro [31].

20

3. Resultados e Discussões

3.1. Perfil de Crescimento

Segundo Bononi et al., [32] a Família *Mucoraceae* é uma das maiores família da Ordem Mucorales, representada por dois gêneros, sendo a *Mortierella* o maior dele com cerca 90 espécies. As espécies de *Mortierella* apresentam micélio fino delicado e ralo de crescimento lento, sendo comum a formação de colônias em meio sintéticos. Quanto ao crescimento em placa de Petri é zonado, com formação de pequenas colônias em vários pontos. Apresentam esporângios como estruturas reprodutivas, que podem ser multi-esporados, porém com poucos esporos.

O gênero *Mortierella* é caracterizado pela ausência de columela, produção de esporângio, presença de esporangiósporos unicelulares, globosos e elipsoidal. São microrganismos oleaginosos, apresentam acúmulo de lipídeos em sua biomassa [33].

Nesta etapa foi estudada a cinética e velocidade de crescimento micelial da *M. isabellina* em substratos de glicerol residual do biodiesel e milhocina proveniente do beneficiamento do milho comparados aos meios sintéticos BDA e em meio sintético para Mucorales (meio de cultura proposto por Hesseltine & Anderson, [26] - H&A. As Tabelas 1 e 2 apresentam equações de regressão com as respectivas velocidades de crescimento do fungo estudado.

Analisando as Figuras 1 e 2 foi observado que o fungo *Mortierella isabellina* apresentou um crescimento mais rápido para o meio de composição definida proposto por Hesseltine e Anderson [26] no qual obteve uma velocidade de crescimento maior em relação aos outros meios estudados (Tabela 1), fato que era esperado, pois este é um meio padrão, contendo os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. De acordo com os resultados obtidos para os meios suplementados com resíduos, o fungo se adaptou melhor na formulação da base Hesseltine e Anderson suplementada a uma concentração de 4% glicerol residual e milhocina, sobressaindo o crescimento da menor concentração e obtendo uma velocidade de crescimento proporcional (Tabela 2). Complementando o estudo de Papanikolaou et al., [34] que relatou que o fungo *Mortierella sp.*, apresentou crescimento significativo em concentrações de glicose, observando que o micro-organismo não obteve crescimento significativo em relação às outras fontes de carbono.

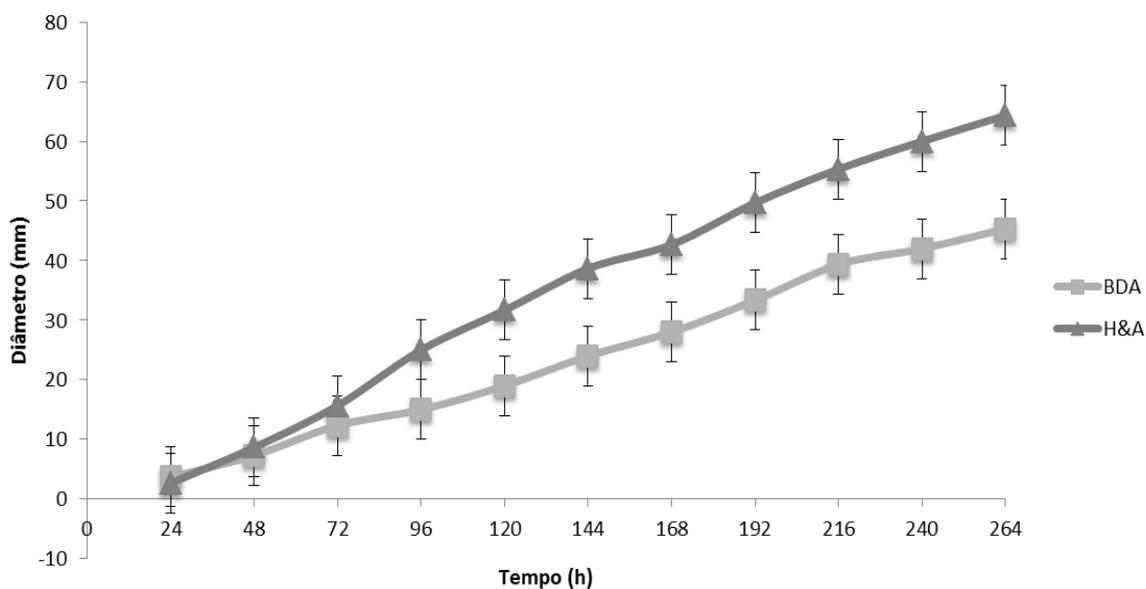


Figura 1. Cinética de crescimento do fungo *Mortierella isabellina* crescida nos meios de composição definida Ágar Batata e Hesseltine & Anderson ágar durante 264 horas.

Tabela 1. Velocidade do crescimento radial de *Mortierella isabellina* e equações de Regressão Linear em meios de cultura sintéticos

Tratamento	V_{cr} (mm h ⁻¹)	Equação *	R^2 **
H&A	0,25	$r = 0,25t$	$R^2 = 0,9897$
BDA	0,17	$r = 0,17t$	$R^2 = 0,9937$

* equação do raio e **coeficiente de regressão linear

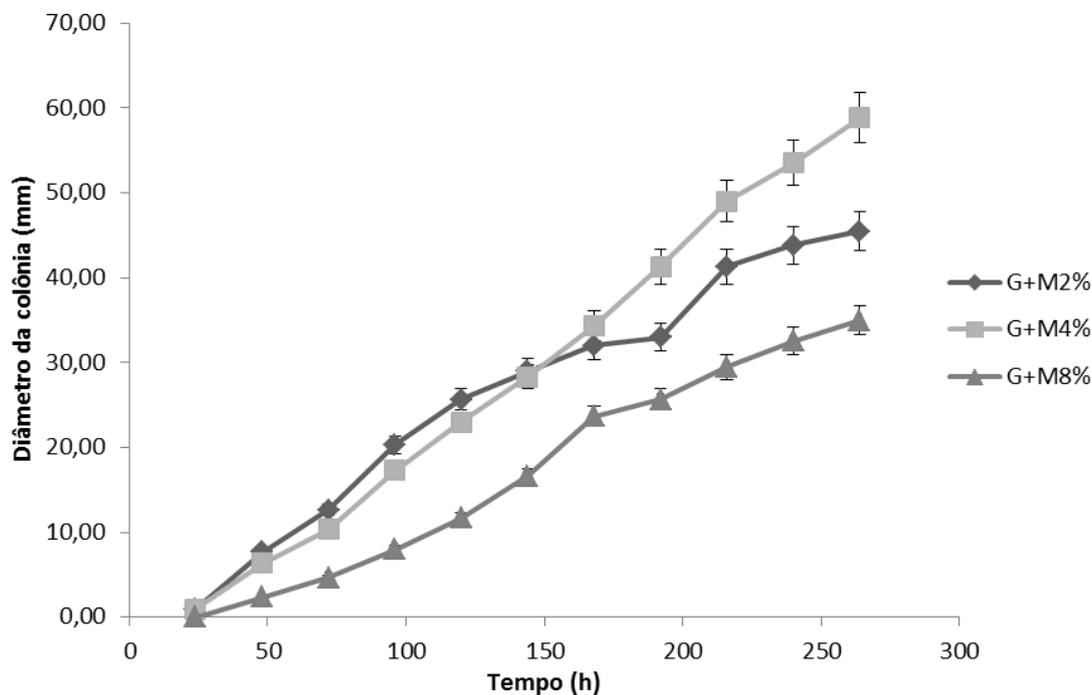


Figura 2. Cinética de crescimento fungo *Mortierella isabellina* em meio sólido com base de Hesseltine & Anderson ágar, suplementado com glicerol residual e milhocina em diferentes concentrações

Tabela 2. Velocidade do crescimento radial *Mortierella isabellina* e equações de Regressão Linear nos meio de cultura Hesseltine & Anderson, suplementado com glicerol residual e milhocina, em função do tempo

Tratamento	V_{cr} (mm h ⁻¹)	Equação*	R ² **
GM2	0,18	$r = 0,18t$	R ² = 0,9734
GM4	0,21	$r = 0,21t$	R ² = 0,9737
GM8	0,12	$r = 0,12t$	R ² = 0,9416

* equação do raio e **coeficiente de regressão linear

O cultivo do fungo no meio de cultura suplementado com glicerol residual, não foi observado crescimento, talvez pela escassez de nitrogênio no meio de cultivo. Segundo, Xing et al., [35], o crescimento do fungo *Mortierella isabellina* em glicerol residual do biodiesel proporcionou uma boa produção de biomassa e lipídios em relação a mesma condição de cultivo com o fungo *C. echinulata*.

O glicerol residual é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula. Vários estudos estão sendo desenvolvidos visando à utilização de glicerol residual como fonte de carbono por microrganismos. Muitos deles apontam principalmente a mecanismos de

assimilação de glicerol por estes microrganismos para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis. Dessa forma, a bioconversão da glicerol adiciona um valor significativo a produtividade da indústria do biodiesel [36].

Segundo Kennedy et.al, [14] parâmetros como o balanço entre nitrogênio e carbono em meios de cultivo pré-definidos se fazem necessários, pela própria fisiologia do microrganismo. Assim observou-se que em baixas concentrações nitrogênio e alta de carbono os microrganismos produzem maior quantidade de óleo.

Segundo Turner, [37] em meios ricos de nutrientes com uma elevada relação C / N, por exemplo, espécies do gênero *Mortierella* formam colônias lisas, firmes, densas e aveludadas com aproximadamente 2-3mm de profundidade, sendo geralmente desenvolvidas em zonas regulares. Em media relativamente pobres as colônias são mais finas, se espalham e o zoneamento pode ser mais visível. A espécie isabelina consiste principalmente de esporangióforos com escassos micélios aéreos. A zonação é devido à estimulação da produção de esporangióforos por pequenas variações de temperatura. A colônia pode permanecer branca, mas mais frequentemente se tornam em tons de cinza, marrom ou cor de rosa, de acordo com o esporângio. Nesta espécie estas estruturas quase sempre aparecem isoladamente de hifas submersas e se assemelham a outros ramos submersos até que eles emergem da forma e tornam-se ereto. Eles afinam, mas ligeiramente, variam em comprimento, e podem ser simples ou ramificados, vários ramos, muitas vezes decorrente a partir de um nó mais ou menos inchado. Septos transversais são formados próximos dos pontos de origem dos ramos e em outros lugares, e muitas vezes há um septo a uma curta distância abaixo do esporângio. Em contraste, os esporangióforos de outras espécies de *Mortierella* geralmente surgem, isoladamente ou em grupos, de hifas aéreas ou estolhos, raramente de hifas submersas.

Os esporângios do gênero *Mortierella* variam muito em tamanho e, sendo muito facilmente escondidos, são difíceis de medir. Nas espécies coloridas eles aparecem marrom escuro, preto ou cor de cobre sob o microscópio. A parede dos esporângios é bastante firme, de modo que alguns esporângios maduros. O septo transversal pode ser plano ou ligeiramente convexo, como na maioria das espécies de *Mortierella*, mas pode ser fortemente convexo, formando uma pequena columela. Podem conter geralmente de 20 ou mais esporângios pequenos, redondos, ovais ou irregulares. Clamidosporos são geralmente formados, mas a sua produção é variável, mesmo nas mesmas espécies [37].

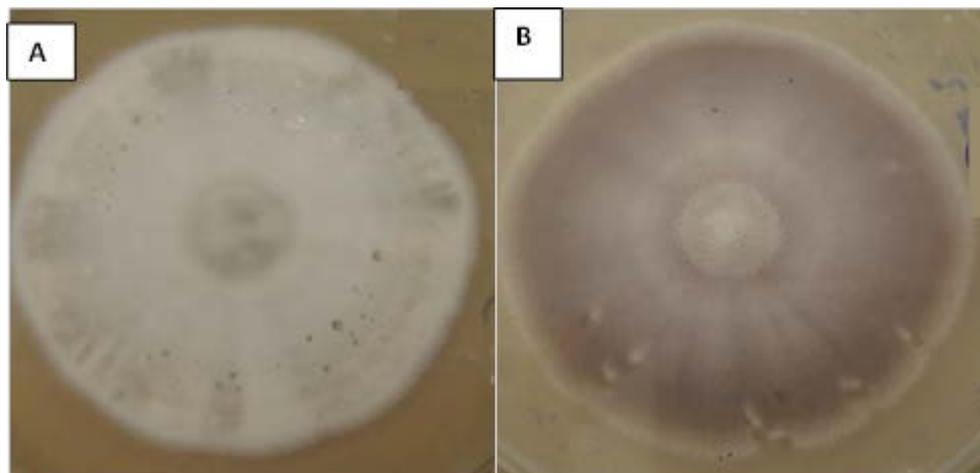


Figura 3: Observação macroscópica do fungo *M. isabellina* crescido em meios de cultura (A) Batata Dextrose Ágar (BDA), e meio sintético para Mucorales descrito por Heseltine e Anderson, (1957) (H&A).

De acordo com as observações macroscópicas nos substratos utilizados, este fungo não apresentou micélio aéreo e sua coloração variou de branco a acinzentado\amarronzado de acordo com as zonas de maior predominância de esporos (Figura 3). A produção de esporos foi verificada a partir de 72 horas após a inoculação nos referidos meios de cultivo. Onde o meio H&A se mostrou mais favorável, enquanto a esporulação foi significativamente inferior no GM8. No meio GM2 pode ser observado o zoneamento central da colônia acinzentada determinando a presença de esporos (Figura 4).



Figura 4: Observação macroscópica do fungo *M. isabellina* crescido em meios de cultura suplementados com glicerol residual e melatonina nas concentrações (A) (2%), (B) (4%) e (C) (8%).

Influências de fontes de nitrogênio sobre microrganismos oleaginosos têm sido amplamente investigada. O nitrato de sódio é considerado como um estimulante para o crescimento celular e acumulação de lipídeos pela levedura *Neochloris oleoabundans*. Também

tem sido relatado que algumas leveduras oleaginosas acumulam mais lipídeos quando cultivadas em fontes de nitrogênio orgânicas em vez de fontes de nitrogênio inorgânicas [5].

3.2. Análises em microscopia de luz

As Figuras 5 e 6 mostram observações em microscopia óptica do fungo *Mortierella isabellina* em microcultivo nos meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e meio sintético para Mucorales descrito por Hesseltine e Anderson [26] (H&A) e alternativos tendo como base o meio sólido de Hesseltine & Anderson ágar adicionado de glicerol residual e milhocina em diferentes concentrações (A) glicerol residual e milhocina (2%), (B) glicerol e milhocina (4%) e (C) glicerol e milhocina (8%), com aumento de 100x.

Os microcultivos de *M. isabellina* demonstraram retenção de óleo nas hifas, presença de esporângios maduros e conseqüentemente elevada produção de esporos, e de clamidosporos nas hifas cultivadas nos meios de cultura H&A, GM4 e GM8. Nos meios BDA, e GM2 contendo resíduos agroindustriais (glicerol residual e milhocina), demonstraram alta presença de esporângios imaturos e presença de clamidosporos. No meio GM4, baixo conteúdo de óleo, diferentemente do meio contendo 8% (glicerol e milhocina), onde foi observada elevada produção de óleo (Figuras 4 e 5). Também pôde ser verificado crescimento irregular das hifas no fungo cultivado em meios utilizando resíduos agroindustriais.

Estudos realizados por Lu, et al., [5], constataram que o fungo *Mortierella alpina* cresceu e produziu maiores concentrações de lipídeos cultivado em fontes de nitrogênio orgânicas, como extrato de levedura, uréia e milhocina e, proporções bem menores em cultivos contendo sais de amônia.

É conhecido que fontes de nitrogênio orgânicas aumentam o efeito de estimulação da síntese de lipídeos em algumas leveduras oleaginosas em relação a fontes de nitrogênio inorgânica. E substratos de fontes de nitrogênio orgânicas de estrutura química complexa influenciam uma intensa acumulação de lípidos, e a natureza da fonte de nitrogênio influencia na quantidade e na composição lipídica produzido por *M. Alpina* [5].

Em organismos eucariotos oleaginosos, os lipídeos são armazenados em compartimentos especializados conhecidos como corpos lipídicos. Eles são formados em um subdomínio especializado do retículo endoplasmático, onde a maioria das enzimas biossintéticas e proteínas estruturais são localizados. Os lipídeos não se encaixam entre os fosfolipídios e são, portanto, depositados entre os dois folhetos da bicamada da membrana. No entanto, quantidades substanciais de lipídeos não podem ser incorporados na bicamada da membrana do retículo endoplasmático e, a síntese contínua de lipídeos leva a formação de um broto fora do retículo endoplasmático como um corpo lipídico maduro depois de atingir um tamanho crítico [38,39].

Segundo Papanikolaou et al., [7], o glicerol residual é um substrato adequado para ser utilizado como matéria-prima para a produção de óleo, ácido 1,3-propanodiol e ácido cítrico pelo fungo *Mortierella isabellina*.

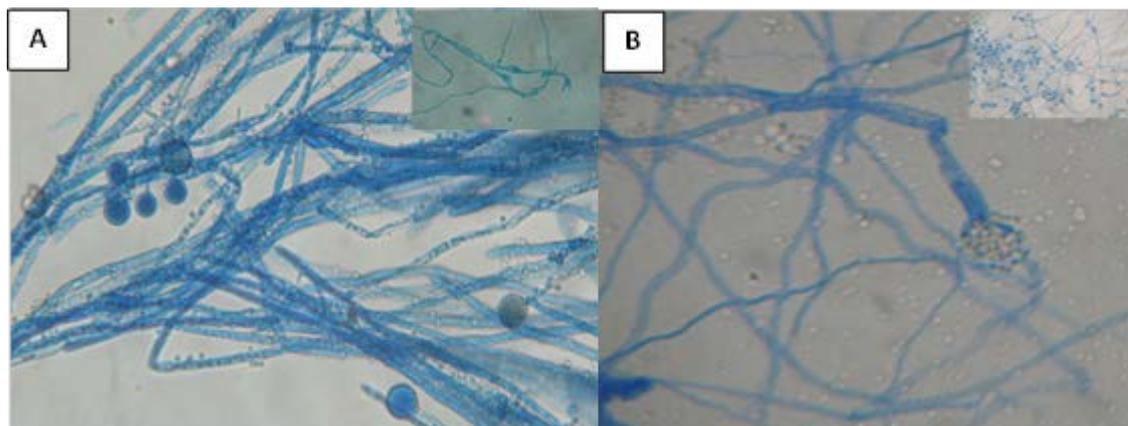


Figura 5. Observação do fungo *Mortierella isabellina* em microcultivo nos meios de cultura Ágar Batata (A) e Hesseltine & Anderson ágar (B), (aumento 100x).

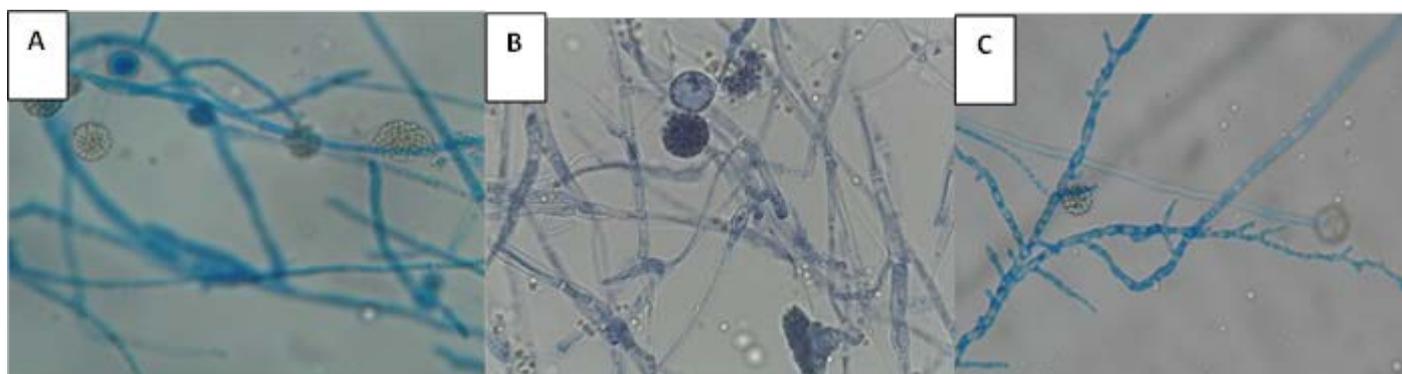


Figura 6. Observação do fungo *Mortierella isabellina* em microcultivo nos meios de cultura alternativo tendo como base o meio sólido de Hesseltine & Anderson ágar adicionado de glicerol residual e melatonina em diferentes concentrações (A) glicerol e melatonina (2%), (B) glicerol e melatonina (4%) e (C) glicerol e melatonina (8%), com aumento de 100x.

A estrutura fina do fungo *M. isabellina*, cultivada em meio sintético para Mucorales (meio de cultura proposto por Hesseltine & Anderson, [26] e em concentrações crescentes de glicerol residual e melatonina a 2%, 4% e 8%, coletada no intervalo de 168 horas está apresentado na Figura 7.

A análise das micrografias do crescimento do fungo no meio de cultura proposto por Hesseltine & Anderson (1957), permitiu observar a ocorrência de hifas com textura lisa, homogêneas, frouxas e transparentes, apresentando esporos hexagonais e ausência de clamidósporos, não apresentando sinais de estresse (Figura 7, A). Por outro lado, nas concentrações crescentes dos resíduos agroindustriais ocorreu uma diminuição de esporos e de hifas contorcidas, com maior adensamento.

A micrografia do cultivo em meio GM2, permitiu visualizar corpos lipídico no interior das hifas (Fig.7 B). Em contraste, a figura 7 C, mostra grânulos externamente às hifas.

Estes grânulos podem ser justificados pelos estudos de Ml'ickova, et al., [39], que investigaram a superfície celular e intracelular da levedura *Y. lipolytica* crescida em meio mínimo contendo ácido oléico, e observaram a presença de pequenas saliências espalhadas pela superfície celular da levedura. Além de saliências, também foram observados corpos lipídicos na superfície das células, e seus números aumentando com o tempo de exposição ao ácido graxo. Após 2h de exposição ao cultivo os corpos lipídicos chegaram a um diâmetro de 310 ± 18 nm. Os corpos lipídicos apareceram com estruturas esféricas negras, após a coloração com ósmio, enquanto as saliências foram coradas acizentada. No crescimento em meio de glicose, foi observado pequenos corpos lipídicos e o número de saliências diminuída.

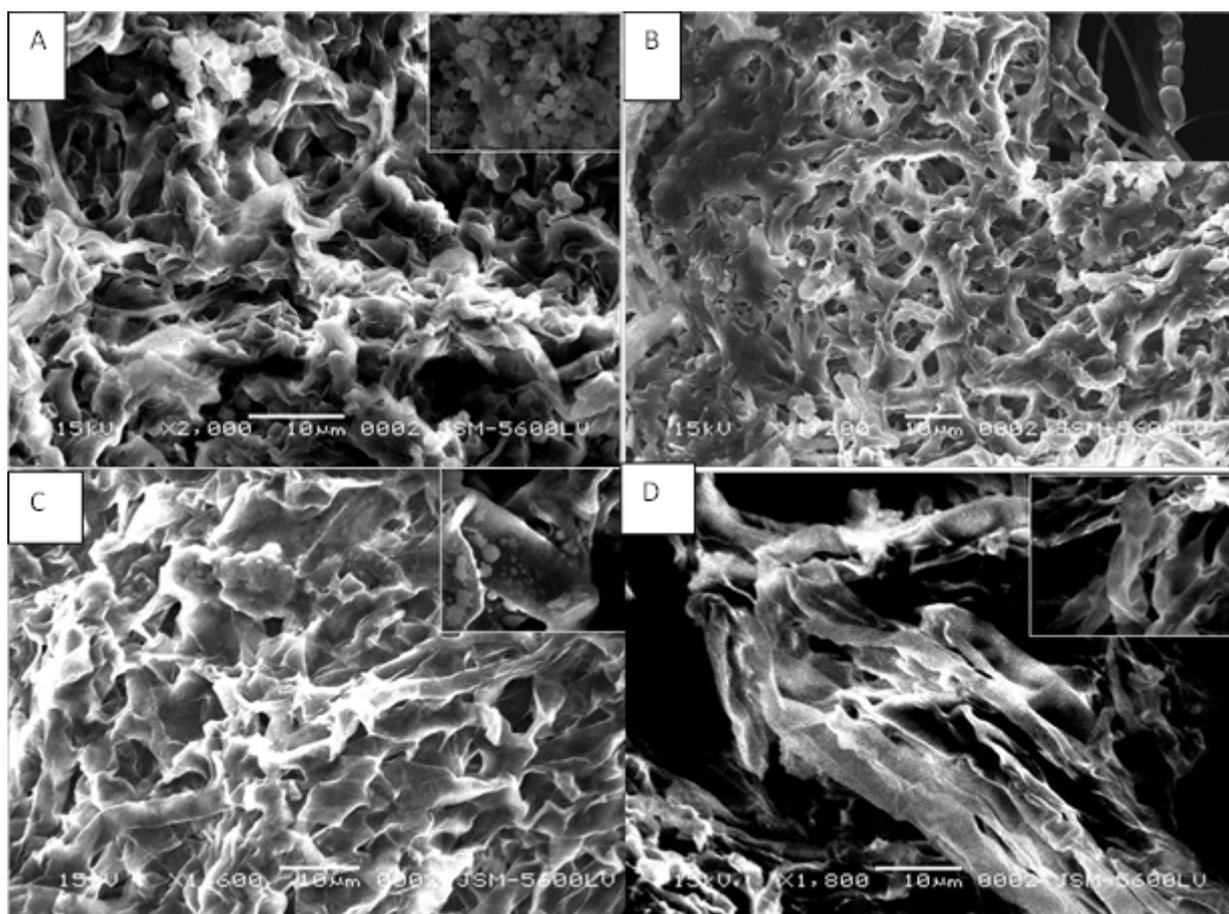


Figura 7. Eletromicrografias de *M. isabellina* cultivada em meio de composição definida para Mucorales (meio de cultura proposto por Hesseltine & Anderson (1957)). (A), meios de composição definida suplementados com glicerol residual e milhocina, em três concentrações 2% (B), 4% (C), 8% (D).

3.3. Avaliação citoquímica da produção de óleo por *Mortierella isabellina*

A utilização da coloração Sudan Black em amostras de micélios de *M. isabellina* cultivada no meio de composição definida para Mucorales e meios contendo concentrações crescentes de resíduos agroindustriais (glicerol e milhocina 2, 4 e 8%), permitiu revelar a presença de lipídeos sob a forma de inclusões de cor escura (Figura 8).

Alguns micro-organismos oleaginosos acumulam lipídeos intracelulares em mais de 50% do seu peso seco. Podendo ter a possibilidade de serem produtores de óleos comerciais para alimentos e recursos energéticos. Estes lipídeos são acumulados em organelas intracelulares, sendo chamados de corpos lipídicos. A formação e a maturação dos corpos lipídicos são processos importantes para a produção de lipídeos em micro-organismos oleaginosos [40-42].

Esse acúmulo de lipídeos é justificado pelo fato do nitrogênio ser um fator limitante para produção de lipídeos, e as fontes orgânicas são mais facilmente assimiladas. Os micro-organismos oleaginosos acumulam lipídios sob condições limitantes de nitrogênio. O fluxo de carbono é canalizada para biossíntese lipídica quando o nitrogênio está reduzido. Os produtos do metabolismo do nitrogênio desempenham um papel importante na regulação do fluxo de carbono a precursores de biossíntese de lipídeos. O esgotamento de nitrogênio provoca uma redução da concentração de AMPc intracelular, um ativador da isocitrato desidrogenase, e conseqüentemente gera um aumento de citrato e isocitrato nas células, onde o citrato é convertido em oxalacetato e acetil-CoA, que por sua vez é usado na síntese de ácidos graxos [5, 6, 21, 38, 43].

Através de uma análise das micrografias foi revelado que todas as condições de cultivo há uma forte coloração de corpos lipídicos. O crescimento do fungo em meio de composição definida permitiu (H&A) a formação de micélio homogêneo, com longas hifas e com inclusões lipídicas bem distribuídas. No entanto, o cultivo em meios suplementados com resíduos as hifas cresceram de forma heterogênea, com intensa ramificação lateral e apical e inclusões lipídicas mais difusas e dispersas no citoplasma celular. Estas alterações estão relacionadas com o aumento das concentrações da fonte de carbono (glicerol residual). As concentrações crescentes dos resíduos agroindustriais induzem a uma maior produção de (lipídeos) óleos.

Em leveduras oleaginosas, os corpos lipídicos consistem principalmente de triacilgliceróis (TAG) (até 90% ou mais), enquanto que uma pequena fração é representado por ésteres de estérol (SE). A presença significativa de quantidades de ácidos graxos livres (AGL) dentro dos corpos lipídicos foi relatada somente para *Y. lipolytica*. Em *S.cerevisiae*, que acumula menos de 15% de lipídios da sua biomassa, os corpos lipídicos contêm quantidades similares da TAG e SE. O núcleo dos corpos lipídicos é rodeado por uma monocamada de fosfolípidos onde várias proteínas são incorporadas. Estas proteínas exercem um papel fundamental no metabolismo lipídico, biossíntese e tráfico de substrato. Sob solicitação, os lipídeos de armazenamento são mobilizados a partir deste compartimento por triacilglicerol lipases e hidrolases do éster de estérol. Os respectivos produtos de degradação servem como fontes de energia e / ou blocos de construção para a formação da membrana. Os ácidos graxos hidrolisados de TAG ou SE ou são canalizadas para o peroxisome, onde ocorre a β -oxidação, ou para a biossíntese de fosfolipídios [[21, 38, 39].

Corpos lipídicos, em que os lipídios se acumulam em microrganismos oleaginosos, têm diferentes formas e desenvolvimento dependendo das espécies e condições de cultivo. Além de variar, com o tempo de crescimento do micro-organismo, Células contendo corpos lipídicos da espécie da levedura *Lipomices starkeyi* variaram de 0,5 μ m a 12 μ m de diâmetro depois de 100 horas de cultivo. Em fungos filamentosos, do gênero *Mortierella* os diâmetro das células lipídicas variaram de 0,5- 3 μ m, sendo intensificada em número a medida do aumento do tempo de cultivo [42].

Segundo, Kimura et al. [42], utilizando a metodologia da aplicação do corante vermelho do Nilo, foi verificada uma concentração maior que 20% em diferentes espécies de leveduras e fungos do gênero *Mortierella*.

Burdon, [30] descreveu pela primeira vez a coloração de corpos celulares lipídicos usando o sudan black. A partir desta data, o corante tem sido muito utilizado como uma análise qualitativa para revelação e avaliação da capacidade de produção de lipídeos intracelulares por células microbianas. [44,45].

De acordo com Harris, [46] hifas ramificadas aumentam a área de superfície da colônia, resultando num aumento de assimilação de nutrientes, o que pode estar associado com os cultivos em glicerol residual, fonte de carbono não fermentável.

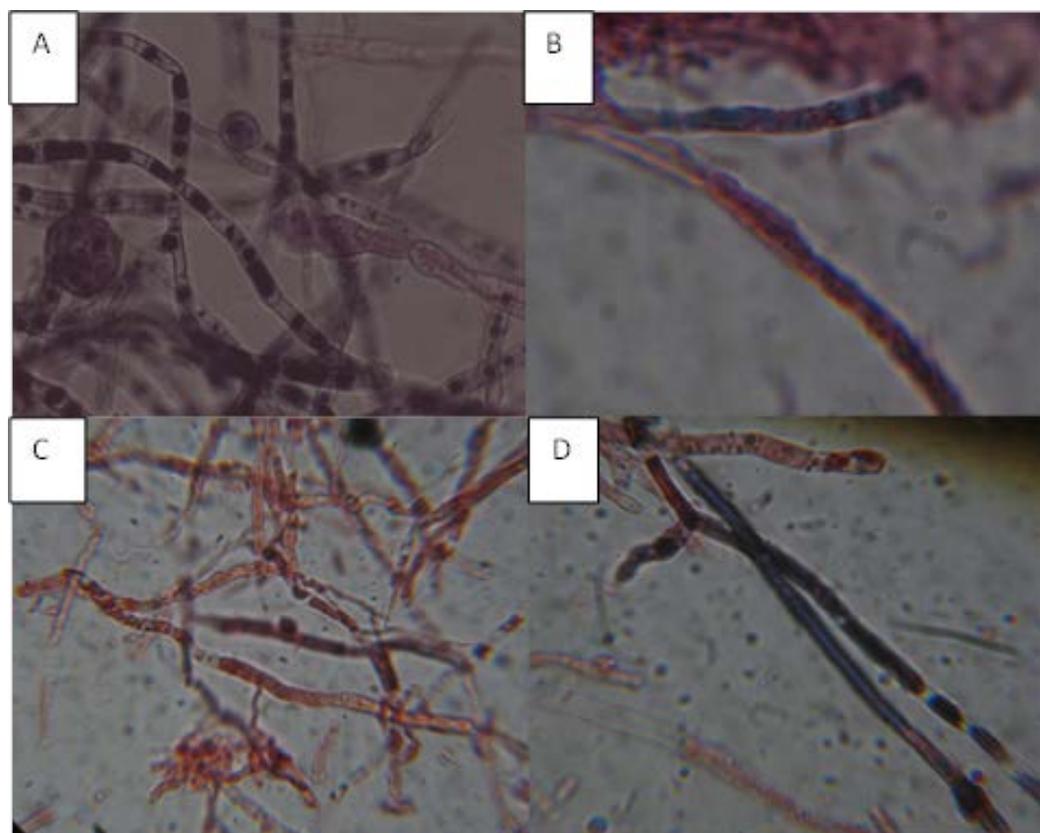


Figura 8. Citoquímica do fungo *Mortierella isabellina* cultivada no meio em meio de composição definida para Mucorales (A), suplementados com glicerol residual e milhocina a 2% (B), 4% (C) e 8% (D), com aumento de 100x.

4. Conclusões

O fungo *Mortierella isabellina* demonstrou um perfil com maior crescimento radial no meio de composição definida para Mucorales (Hesseltine & Anderson), com maior velocidade de crescimento, e comportamento semelhante foi observado com a base de Hesseltine & Anderson suplementada com 4% de resíduos industriais (glicerol residual e milhocina). Os estudos morfológicos com microscopia de luz e varredura indicaram maior esporulação nos meios de

composição definida, sendo confirmado também com 4% e 8% dos resíduos agroindustriais. A maior presença de “single cell oil” foi observada e confirmada pela análise coloração Sudan Black no fungo crescido com 8% dos resíduos agroindustriais, indicando que *M. isabellina* é um fungo com elevado potencial biotecnológico e promissor na produção de lipídeos.

Referências

1. Tkachenko, A. F.; Tiginova, O. A.; Shulga, S. M. Microbial lipids as a source of biofuel. *Cytology and Genetics*, **2013**, *47*, 343–348.
2. Vicente, G.; Bautista, L F.; Guti, F. J.; Marti, V.; Ruiz-V, R. M.; Rodri, R. A.; Torres-Marti, S.; Garre, V. Direct Transformation of Fungal Biomass from Submerged Cultures into Biodiesel, *Energy Fuels*, **2010**, *15*, 22-27,
3. Liu, B.; Zhao, Z. K. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2007**, *780*, p. 775–780,
4. Zheng, Y. et al. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for biofuels*, **2012**, *5*, 50.
5. Lu, J.; Peng, C.; Ji, X.; You., J. Fermentation Characteristics of *Mortierella alpina* in Response to Different Nitrogen Sources. *Appl Biochem Biotechnol*, **2011**, *5*, 979–990.
6. Gao, D.; Zeng, J.;Zheng, Y.; Yu, X.; Chen, S. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. *Bioresource technology*, **2013**, *133*, 315–21.
7. Papanikolaou, S.; Fakas, S.; Fick, M.; Chevalot, I.; Galiotou-Panayotou, M.; Komaitis, M.; Marc, I. Aggelis, G. Biotechnological valorisation 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 and Bioenergy*, **2008**, *32*, 60–71.
8. Bharti, R. K.; Srivastava, S.; Thakur, I. S. Extraction of extracellular lipids from chemoautotrophic bacteria *Serratia sp.* ISTD04 for production of biodiesel. *Bioresource technology*, **2014**, *165*, 201–204.
9. Pupin, A. M., Messias, C. L., Piedrabuena, A. E. ; Roberts, D. W. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. *Brazilian Journal of Microbiolog*, **2000**, *31*, 121–128.

10. Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M.; *Introductory Mycology*, 4th ed., Wiley, New York, 1996, pp. 683–737.
11. Carlile, M. J.; Watkinson, S. C.; Gooday, G. W. *The Fungi*, 2th ed, Academic press, Tokyo, 1996, pp. 38-43.
12. Meng, X.; Yang, J.; Xu, X.; Zhang, L.; Nie, Q.; Xian, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy*, **2009**, *34*, 1–5.
13. Shaw, R. The fatty acids of phycomycete fungi, and the significance of the gamma-linolenic acid component. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **1966**, p.325-331.
14. Kennedy, M. J.; Reader, S. L.; Davies, R.J. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. *Biotechnology and Bioengineering*. **1993**, *42*, 625-34.
15. Wynn, J.P.; Hamid, A.A.; Li, Y.; Ratledge, C. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*, **2001**, *147*, 2857-2864.
16. Silva, T.L.; Pinheiro, H.M.; Roseiro, J.C. Stress-induced morphological and physiological changes in γ -linolenic acid production by *Mucor fragilis* in batch and continuous cultures. *Enzyme Microbiology Technology*, **2003**, *32*, 880- 888.
17. Ahmed, S.U.; Singh, S.K.; Pandey, A.; Kanjilal, S.; Prasad, R.B.N. Effects of various process parameters on the production of γ -linolenic acid in submerged fermentation. *Food Technology Biotechnology*, **2006**, *44*, 283-287.
18. Jeennor, S.; Laoteng, K.; Tanticharoen, M.; Cheevadhanarak, S. Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*, **2006**, *259*, 60-66.
19. Certik, M.; Slavikova, L.; Masrnová, S.; Sajbidor, J. Enhancement of nutritional value of cereals with γ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations. *Food Technology Biotechnology*, **2006**, *44*, 75-82.
20. 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. *Microbial Cell Factories*, **2012**, *11*, n. 1, p. 1.
21. Subhash, G. V.; Mohan, S. V. Sustainable biodiesel production through bioconversion of lignocellulosic wastewater by oleaginous fungi. *Biomass Conv. Bioref. Biomass Conversion and Biorefinery*, **2014**, DOI 10.1007/s13399-014-0128-4.

22. Huang, C.; Chen, X. F.; Xiong, L.; Chen, X. D.; Ma, L. L.; Chen, Y. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology Advances*, **2013**, *31*, 129-139.
23. Mota, C. J. A.; Silva, C. X.; Gonçalves, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova*, **2009**, *32*, p 36-57.
24. Huang, C.; Chen, X-F.; Yang, X.-Y.; Xiong, L.; Lin, X-Q.; Yang, J.; Wang, B. Chen, X-D. Bioconversion of corncob acid hydrolysate into microbial oil by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Applied biochemistry and biotechnology*, **2014**, *172*, 4, 2197-2204.
25. Fontes, G.C.F., Amaral, P.F.F., Coelho, M.A.C. Produção de biossurfactante por levedura. *Química Nova*, **2008**, *31*, p. 8 - 15.
26. Hesseltine, C.W.; Anderson, R.P. Microbiological production of carotenoides Zigosporas and carotene produced by interspecific and crosses of Choanephoraceae in liquid media. *Mycology*, **1957**, *49*, p.449-452.
27. Laszlo, J. A.; Silman, R. W. Celular automata simulations of fungal growth on solid substrates. *Biotechnology Advances*, **1993**, *11*, 621-633.
28. Meinicke, R. M. Estudo da produção de pigmentos por *monascus ruber* cct 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso, Dissertação de mestrado, Universidade de Santa Catarina, 2008.
29. Riddell, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia*, **1950**, *42*, 265-270.
30. De Souza, W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. *Sociedade Brasileira de Microscopia*, **1998**, 271p.
31. Burdon, K. L. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *J. Bacteriol.* **1946**, *52*, 665-78.
32. Bononi, V. L. R.; Trufem. S. F. B. (Org.) **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: Noções básicas de taxonomia e aplicação biotecnológicas**. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p184. 1998.
33. Domsch K.H.; Gams, W.; Anderson, T-H. *Compendium of Soil Fungi*, Academic Press, London, 1980, 1. Pp. viii + 860.

34. Papanikolaou, S.; Komaitis, M.; Aggelis, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *BioresourceTechnology*, **2004**, *95*, 287-291.
35. Xing, D.; Wang, H.; Pan, A., Wang, J., Xue, D. Assimilation of corn fiber hydrolysates and lipid accumulation by *Mortierella isabellina*. *Biomass and bioenergy*, **2012**, *39*, p. 494-501.
36. Papanikolaou, S. Muniglia, S., Chevalot, L. Aggelis, I., Marc, G. I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, **2002**, *92*, p. 737-744..
37. Turner, M. Studies in the genus *Mortierella*. *Transactions of the British Mycological Society*, **1963**, *46*, 2, p. 262-272.
38. Rossi, M.; Amaretti, A.; Raimondi, S.; Leonardi, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. In: *Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies*. 2011, Stoytcheva, M; Montero, G. editors, 71-92 p., 458 ps. DOI: 10.5772/1094.
39. Mlickova, K.; Roux, E.; Athenstaedt, K.; d'Andrea, S.; Daum, G.; Chardot, T. et al. Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol*, **2004**, *70*:3918-24.
40. Ratledge, C. Biotechnology of oils and fats. In: *Microbial Lipids*, Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds.), Academic Press, London, 1989, vol. 2, pp. 567-668.
41. Ratledge, C., Wynn, J.P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **2002**, *51*, 1-51.
42. Kimura, K.; Yamaoka, M.; Kamisaka, Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*. **2004**, *56*, 331-338.
43. Koike, Y.; Jie Cai, H.; Higashiyama, K.; Fujikawa, S.; Park, E.Y. Effect of consumed carbon to nitrogen ratio of mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2001**, *91* (4), 382-389.
44. Neema, P. M.; Kumari, A. Isolation Of Lipid Producing Yeast And Fungi From Secondary Sewage Sludge And Soil. *Austral. J. Bas. Appl. Sc.*, **2013**, *7*, 9, 283-288.

45. MacEachran, D. P., Sinskey, A. J. The *Rhodococcus opacus* TadD protein mediates triacylglycerol metabolism by regulating intracellular NAD(P)H pools. *Microb. Cell Fact.*, **2013**, *12*, 104-115.
46. Harris, S.D. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, **2008**, *100*, 6, 823–832.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido a revista: **BioMed Research International**

ISSN: 2314-6133 (Print)

ISSN: 2314-6141 (Online)

DOI: 10.1155/2738



Produção de lipídeos pelo fungo *Mortierella isabellina*: matéria prima para biodiesel

**Manuela Cristina Mota Lins^{1*}; Adriana Ferreira de Souza²; Roberta Sampaio Pinho³,
Norma Buarque Gusmão⁴, Galba Maria Campos Takaki^{5*}**

¹ Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, 50670-901, Recife – PE, Brazil. (M.C.M.L.) E-Mail: motalinsmr@gmail.com

² Mestrado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, 50670-901, Recife – PE, Brazil. (A.F.S.) E-Mail: adrife.souza@gmail.com

³ Doutorado em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 52171-900 - Recife/PE, Brasil, (R.S.P.). E-mail: rsampaio@gmail.com

³ Dept. Antibióticos, Universidade Federal Pernambuco-UFPE, 50670-901, Recife – PE, Brazil. (N.B.G) E-Mail: normagusmao@gmail.com

⁴ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife, PE, Brasil (G.M.C.T.) E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

* Correspondência: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife, PE, Brasil Phone: +55 81 21194017; Fax: +55 81 21194043. E.mail : galba_takaki@yahoo.com.br

Resumo

A produção de lipídeos provenientes de fontes microbianas apresenta-se numa expansão contínua, por sintetizarem triacilgliceróis específicos, podendo ser utilizados como matérias primas do biodiesel. A produção industrial de óleo a partir de micro-organismos é mais vantajosa, além disso podem ser cultivados em substratos de baixo custo. Assim, visando a viabilização de biomassas de altas concentrações de lipídeos com boa qualidade, o objetivo deste trabalho é apresentar meios alternativos, através de desenho experimental, com a utilização de glicerol residual e milhocina. O fungo estudado, *Mortierella isabellina*, foi cultivado em meios contendo glicose ou glicerol residual como fontes de carbono e milhocina de nitrogênio, de acordo com planejamento fatorial. As biomassas foram submetidas a extração e caracterização dos perfis lipídicos e a estudo ultraestrutural. O cultivo do fungo em glicerol residual (8%) e milhocina (2%) possibilitou uma produtividade de 75,24% de lipídeos. O Diagrama de Pareto ilustrou que a fonte de nitrogênio foi responsável pelos efeitos da produção de biomassa e as fontes de carbono influenciaram de forma positiva a produção de lipídeos pelo fungo. Com a caracterização de ácidos graxos, foi demonstrado uma composição semelhante com o perfil de óleos vegetais considerados matérias-primas para biodiesel. As ultraestruturas mostraram que o fungo se comportou de forma diferenciada no cultivo com glicerol residual. O uso de glicerol residual proporcionou ao fungo condições favoráveis para a produção de lipídeos com potencial utilização na fabricação de biodiesel.

1. Introdução

Nos últimos anos, dois grandes setores da biotecnologia lipídica, a biocatálise não convencional e a produção de lipídeos provenientes de fontes microbianas (o chamado “single cell oil”, SCO) apresentam uma expansão contínua. Como a síntese de específicos triacilgliceróis (TAGs) semelhantes a gorduras exóticas de alto valor agregado, como a manteiga de cacau e TAGs de importância médica, produzidos em substratos gordurosos de baixo custo, por exemplo glicerol residual do biodiesel e milhocina. Além disso, as enzimas hidrolíticas (lipases) têm sido muito utilizadas em meios não convencionais, com a finalidade de produzir biocombustíveis [1].

O uso de micro-organismos como fonte de lipídeos tem sido bastante estudado para aplicação biotecnológica, através de sua aplicação em aditivos alimentares, farmacêuticos, combustíveis e ingredientes de alimentos para a aquicultura. Além disso, o avanço da demanda por biodiesel (ésteres de ácidos graxos) derivado de plantas oleaginosas tem aumentado o custo dos alimentos, levando a necessidade da descoberta de fontes de óleos não convencionais para serem convertidas em biodiesel [1-5].

Os micro-organismos oleaginosos são considerados potenciais candidatos para produção de lipídeos como matéria-prima da produção de biodiesel de 2ª geração, lipídeo este produzido a partir de cultivos em resíduos agroindustriais, como lodo de esgoto, hidrolisados de material lignocelulósico, glicerol residual, soro de leite, entre outros e, de qualidade semelhante aos óleos das plantas. A produção industrial de óleo a partir de micro-organismos em relação a outras fontes oleaginosas é mais vantajosa, por não apresentar a necessidade de grandes extensões de terras agriculturáveis, o uso de enormes quantidades de água, evita a poluição do solo e o desmatamento de reservas ambientais, são os principais fatores que afetam a agricultura [1, 3, 6].

Muitas espécies de micro-organismos acumulam corpos lipídicos no citosol, incluindo microalgas, protozoários, bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo esses dois últimos os principais micro-organismos utilizados para a produção de lipídeos, considerados oleaginosos, devido à produção de 20% de sua biomassa em lipídeos e podendo chegar à capacidade de acumular até 70% durante o período de estresse metabólico [7-9].

Os lipídeos são importantes componentes de fungos, tanto em termos de estrutura e constituição da membrana. Os principais fatores que influenciam o grau de produção de lipídeos são a natureza e percentagem de carbono (C) e nitrogênio (N), conforme fontes de nutrientes no meio. Ácido palmítico C16 normalmente é o ácido graxo saturado e oléico (C18:1) e linoléico (C18:2) são os principais ácidos graxos insaturados. Espécies do gênero *Mortierella* têm a capacidade de produzir ácidos graxos com até 20 átomos de carbono [4, 10, 11].

Dentre os representantes dos fungos, a divisão Zigomycota vem demonstrando capacidade de produzir ácidos graxos, dentre eles o ácido palmítico, ácido oléico e ácido linoléico. Espécies da ordem Mucorales, como *Mortierella isabellina* e *Cunninghamella echinulata*, são conhecidos por acumularem naturalmente elevadas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido gama - linolênico (GLA) um ácido graxo essencial, possuindo várias funções importantes, dentre elas, a formação de prostaglandina E1. Seu uso é recomendado no tratamento de: tensão pré-menstrual, osteoporose, processos inflamatórios e na pressão sanguínea alta. Este ácido vem sendo extraído de plantas, principalmente, prímula, mas determinados micro-organismos podem ser bons produtores, o que acarretaria algumas facilidades, como o não uso de grandes áreas de plantio [6, 12-15].

Devido ao rápido crescimento e adaptação de micro-organismos oleaginosos em diversos meios de cultivo e nos mais diferentes substratos, esses são apresentados como uma alternativa de inovação biotecnológica. Pesquisas mostram que a utilização de resíduos agroindustriais destaca-se no cultivo de micro-organismos como uma alternativa inovadora por conterem grande quantidade de matéria orgânica, reduzindo no custo de produção como também no descarte no meio ambiente [1,16].

O fungo *Mortierella isabellina* é conhecido pela capacidade de acumular uma quantidade considerável de lipídeos, aproximadamente 80% por biomassa seca [17]. Podendo ser cultivada em vários tipos de substratos, incluindo monômeros de açúcares [17], glicerol [18], bem como em hidrolisados lignocelulósicos (casca de arroz e sabugos de milho) [19, 20]. Além disso, Zheng et al. [21], demonstraram que *M. isabellina* teve melhor desempenho na produção de lipídeos entre 5 fungos oleaginosas que cresceram em palha de trigo pré-tratada com ácido sulfúrico diluído. Esta característica, juntamente com boa tolerância aos inibidores derivados de materiais lignocelulósicos, sugeriu que *M. isabellina* poderia ser um bom candidato para a produção de lipídeos a partir de matéria-prima renovável de baixo custo [11, 21].

O glicerol residual (glicerina), gerado pela indústria de biodiesel, vem sendo uma importante fonte de carbono para microbiologia industrial. Por isso, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de descobrir novas aplicações para este resíduo, visto que o mercado tradicional desse subproduto (indústria de medicamentos, cosméticos e alimentícios) encontra dificuldade em absorver todo o excedente oriundo da síntese do biodiesel. Uma solução está no uso de estratégias biotecnológicas para o reaproveitamento do glicerol residual com objetivo de gerar produtos de maior valor agregado [22, 23].

Um outro resíduo também muito utilizado como um suplemento nutricional e funcional do processo de fermentação é a milhocina - resíduo obtido através da maceração do milho. Sendo uma fonte nitrogênio fundamental para crescimento celular por apresentar 25% de proteínas em sua constituição. Por conseguinte, existe um interesse contínuo na utilização de milhocina em

novos sistemas de fermentação e a elucidação de seus componentes activos. A utilização de resíduos industriais e agrícolas contendo indutores de crescimento é uma alternativa eficiente e estratégica [24-26].

Portanto, considerando as altas taxas de crescimento dos fungos em variados substratos e o fungo *Mortierella isabellina* ser um micro-organismo oleaginoso, este trabalho vem apresentar meios alternativos, através de desenho experimental, com a utilização de glicerol residual e milhocina visando a viabilização de biomassas com alto teor de óleo, e lipídeos de alta qualidade.

2. Materiais e Métodos:

2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a *Mortierella isabellina* URM 3534, adquirido pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. A linhagem foi isolada da rizosfera *Vernoniae herbacea* mantido na Coleção de Culturas (registrado no World Federation Culture Collection- WFCC, sob o número 604). A cepa está mantida sob refrigeração em meio batata dextrose ágar.

2.2. Substratos utilizados

Glicerol Residual: O resíduo agroindustrial foi oriundo do processo de produção de biodiesel a partir de óleo de algodão pela Usina de Experimental de Produção de Biodiesel, gentilmente cedida pelo Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste.

Milhocina - Resíduo agroindustrial procedente do processo de refinação do milho, gentilmente cedido pela indústria Corn Products Ltda, localizada em Vitória de Santo Antão-PE.

2.3. Produção de biomassa

A Produção de biomassa fúngica, foi realizada através de um pré-inóculo numa concentração de esporos correspondente a 10^7 que foi plaqueado em forma de “tapete” em placas de Petri contendo meio de Cultura BDA, posterior o cultivo as placas foram incubadas a uma temperatura de 28°C por 24h.

Após o período de incubação, foram retirados do pré-inóculo 40 blocos da cultura em forma de discos medindo aproximadamente 90,00 mm de diâmetro, e foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 200mL do meio basal descrito por Kavadia et al., [27], suplementado com diferentes concentrações de glicose e milhocina (Planejamento Fatorial 1) e glicerol residual do biodiesel e milhocina (Planejamento Fatorial 2). corrigido para o pH 6,0. O meio basal foi composto por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0.5 g, KH_2PO_4 - 7.0 g, Na_2HPO_4 - 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.1 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.08 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.001 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.0001 g, $\text{Co}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0.0001 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.0001 g, Extrato de levedura - 0.5 g, para 1L de água.

Os fracos inoculados foram incubados sob agitação de 150 rpm e a 28°C por um período de 7 dias (168 horas). Após este período, a biomassa foi filtrada e seca em liofilizador, para posterior pesagem. A medida da biomassa de cada ensaio foi determinada pela diferença dos pesos inicial e final.

As biomassas produzidas nos diferentes ensaios dos Planejamentos Fatoriais foram submetidas à extração de lipídeos, caracterização de ésteres de ácidos graxos e análises ultraestruturais.

Planejamento Fatorial Completo

Dois planejamentos fatoriais foram realizados visando otimizar as concentrações de glicerol residual e milhocina visando produção máxima de lipídeos pelo fungo *Mortierella isabellina*.

O Planejamento Fatorial Completo 2^2 constituído por 8 ensaios, e 4 repetições no ponto central, com os níveis + 1 e - 1, avaliou a influência das concentrações de glicerol residual, glicose e, milhocina (variáveis independentes ou fatores) sobre as concentrações de biomassa e de lipídeos (variáveis respostas) produzidos pelo fungo *M. isabellina*. As análises foram realizadas pelo software STATISTICA versão 6.0 da StatSoft®.

Os níveis e valores dos planejamentos estão apresentados na tabela 1 e foram selecionados baseados em experimentos preliminares.

Tabela 1: Níveis e Valores dos Fatores do Planejamento Fatorial Completo 2^2 utilizando glicose ou glicerol residual como fontes de carbono e milhocina como fonte de Nitrogênio.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Glicose (%) \ glicerol residual do Biodiesel (%)	2	5	8
Milhocina (%) (v\v)	2	5	8

2.4. Extração de Lipídeos Totais

As biomassas obtidas através de crescimento submerso liofilizadas foram submetidas à extração de lipídeos, utilizando a metodologia de Folch et al,[28].

Para extração, 1g de cada biomassa será suspensa em 20 v. da mistura dos solventes clorofórmio/metanol em três tempos, segundo as proporções 2:1, 1:1 e 1:2 (v/v). No primeiro tempo a biomassa foi suspensa em clorofórmio/metanol (2:1, v/v) e homogeneizada no escuro por 24 horas em temperatura ambiente a 150 rpm. No segundo tempo, os extratos foram separados por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi coletado e armazenado em geladeira, enquanto o sedimento foi suspenso em clorofórmio/metanol (1:1, v/v), e perfazendo os mesmos procedimentos do primeiro tempo. Para finalizar, no terceiro tempo os extratos foram resuspendidos numa proporção de 1:2 v/v da mistura clorofórmio/ metanol e submetido aos mesmos passos anteriormente citados. Os extratos combinados foram reduzidos quase até a secura em um evaporador rotativo.

Assim, os lipídeos totais extraídos das amostras de biomassa foram quantificados através do cálculo de Rendimento Percentual de Lipídeos Totais equivalente a Equação 1 [29].

$$\text{Produtividade em lipídeos} = \frac{\text{lipídeo produzido (g)}}{\text{peso da amostra (g)}} \times 100$$

2.5. Determinação da composição dos Ácidos Graxos

O perfil de ácidos graxos dos lipídeos extraídos do fungo cultivado nos diferentes meios foi determinado pela saponificação seguida da metilação de ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), de acordo com o método de Joseph e Ackman, [30] adaptado, que usa como catalisador o $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$.

O método consiste na adição de NaOH in 0,5M em metanol a 10mg de óleo e agitados por 30s. A mistura é aquecida a 100°C em estufa ou banho-maria por 5 minutos e posteriormente é esfriada em banho de gelo. A mistura é adicionada 2,0 mL de BF_3 a 14% de metanol e aquecido novamente por 30 min. A 100°C. Após este período os tubos são esfriados e adicionado 2,5 mL de solução saturada de cloreto de sódio e 3 mL de n-hexano (grau HPLC). As amostras esterificada foram colocadas freezer e deixadas em repouso para uma melhor separação das fases. Depois ser recolhida a fase superior, orgânica, em tubos âmbar para mais tarde injeção no cromatógrafo de gás.

A análise dos ácidos graxos foi efetuada por cromatografia em fase gasosa, localizada na Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste- CETENE, e a identificação dos componentes por comparação entre os tempos de retenção correspondentes aos picos das amostras e dos padrões. Foi utilizado um cromatógrafo modelo Agilent Technologies-7890A com injetor automático, sendo injetado 1 μ l, equipado com detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida DB-5MS com dimensões 30 m x 320 μ m x 0.25 μ m. A temperatura do forno da coluna terá a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 150°C por 4 min; aumentando numa razão de 4°C/min até a temperatura final de 280 °C, e uma isoterma de 280 °C durante 5 min. As temperaturas do detector e do injetor serão de 300°C, tendo hélio (43mL/min.) como gás de arraste.

A identificação dos componentes foi realizada por comparação entre os tempos de retenção correspondentes aos picos das amostras e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma Aldrich) e quantificados por normalização de áreas por meio do *software* do equipamento.

2.6. Análises Ultraestruturais - Microscopia de Varredura

Para avaliar os aspectos morfológicos do fungo cultivado por um período de 7 dias em meio formulado de acordo com os Planejamentos Fatoriais foram realizadas análises microscópicas de varredura. A avaliação foi realizada na biomassa crescida no Ensaio 3 de cada Planejamento, onde foram apresentados maiores valores de produção de lipídeos.

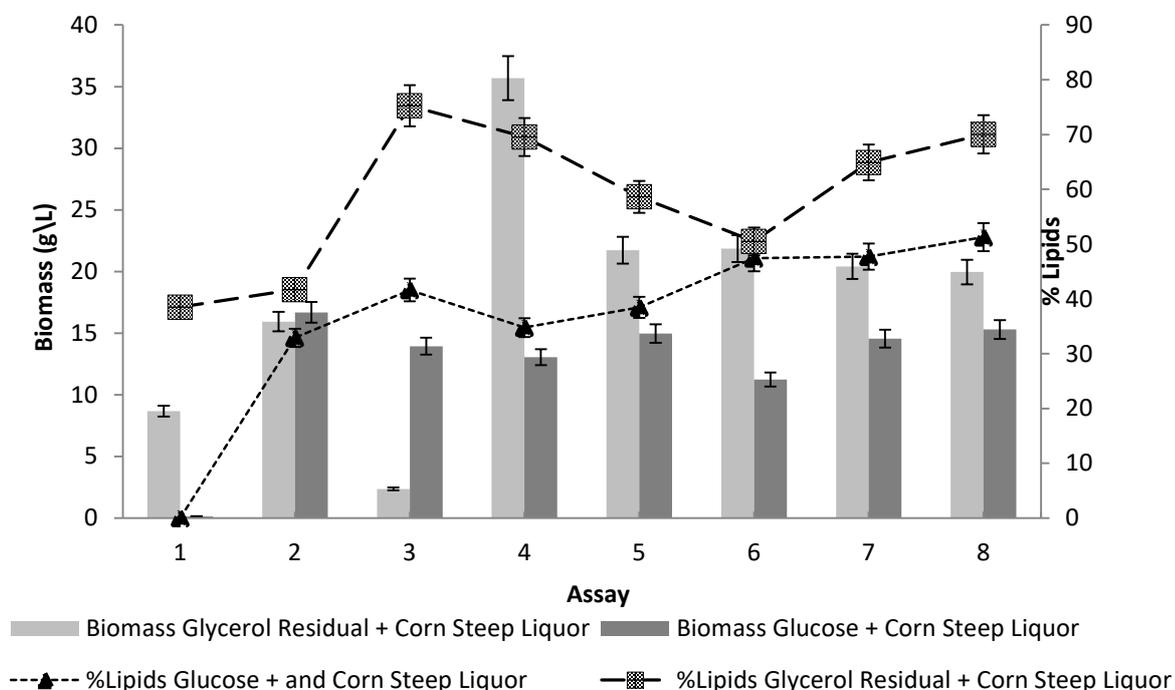
A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para obter imagens de alta qualidade. As amostras foram lavadas em tampão salina fosfato (PBS), pH 7,2 por duas vezes, durante 10 minutos. Em seguida, fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato, 0,1 M, pH 7,4, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Após a etapa de fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato, duas vezes, durante 10 minutos. Na pós-fixação foi utilizado o verde malaquita 0,05% em tampão cacodilato, durante 1 hora a temperatura ambiente, em condições de escuridão. Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M e após submetidas ao processo de desidratação com álcool etílico em proporções de 50%, 70%, 90% e 100% , foram submetidas ao ponto crítico e ao processo de metalização com ouro. As amostras foram montadas em suportes de alumínio para posterior visualização [31].

3. Resultados

3.1. Produção de biomassa e lipídeos pelo fungo *M. isabellina*

A investigação da produção de biomassa e lipídeos pelo fungo *M. isabellina* utilizando glicose \ glicerol residual e milhocina, se deu através de Planejamento Fatorial Completo 2^2 , a Figura 1 mostra os resultados observados, e nas tabelas 2 e 3 são apresentadas as matrizes decodificadas dos Planejamentos Fatoriais 2^2 e os resultados correspondentes a biomassa (massa seca) e produtividade de lipídeos totais produzidos por *M. isabellina*, cultivada em glicose e milhocina e em glicerol residual e milhocina, respectivamente.

Figura 1: Produção de Biomassa e Produtividade de lipídeos pelo fungo *M. isabellina* em meios utilizando glicose\ glicerol residual e milhocina, de acordo com Planejamento Fatorial Completo 2².



Avaliando a produção de biomassa pelo fungo *M. isabellina* foi verificado no Planejamento Fatorial 1 utilizando a glicose como fonte de carbono a maior produção se deu no Ensaio 2 (2% e 8% de glicose e milhocina, respectivamente) - 16,7g/L, e o percentual do conteúdo de lipídeos foi de 32,9% (2,08g/L). Enquanto a menor produção foi correspondente ao Ensaio 1 (2% glicose e 2% de milhocina), - 0,14g/L. A melhor produção de lipídeos foi referente ao Ensaio 3 (8% de glicose e 2% de milhocina), onde obteve uma produtividade de 41,63% (2,37g/L) e biomassa de 14,0g/L. Avaliando os pontos centrais, as maiores produções foram representados no Ensaio 8, onde foram evidenciadas as produções de 15,30g/L e 51,27% de biomassa e lipídeos, respectivamente.

Por outro lado, analisando o Planejamento Fatorial 2 utilizando o glicerol residual como fonte C, a melhor produção de biomassa foi apresentada no Ensaio 4 (35,7g/L) utilizando a concentração de 8% para ambos substratos e, obtendo um rendimento de 69,55% (3,47g/L) em lipídeos. Em contradição, a menor produção de biomassa (2,36g/L), correspondente ao Ensaio 3 (8% de glicerol e 2% de milhocina), por sua vez apresentou o rendimento em lipídeos superior a todos os outros Ensaios - 75,24%. Assim, verificando os dois Planejamentos o Ensaios 3 com

altas proporções de carbono (8%) e menores de nitrogênio (2%) favoreceu o fungo na produção de lipídeos. Este comportamento é justificado pela baixa concentração de nitrogênio no meio e a fonte de carbono, como é relatado por diversos autores.

Uma particular atenção tem sido dedicada a várias espécies de fungos zigomicetos oleaginosos, como *Mortierella isabellina* e *Cunninghamella echinulata*, que podem acumular até 86 e 57%, respectivamente, de lipídeos em biomassa seca. Além disso, estes fungos são capazes de crescer e acumular grandes quantidades de lipídeos em fermentações contendo glicerol como uma fonte de carbono (VICENTE et al, 2010; XING et al., 2012).

Em espécies do gênero *Mortierella*, *M. alpina* foi capaz de produzir 40% (w/w) de óleo enquanto a *M. isabellina* ATHUM 2935 chegou a um valor de 50,4% (w/w) de óleo quando cultivadas em glicose (KHOT et al., 2012; BELLOU et al., 2012; DONOT et al., 2014)

Tabela 2. Matriz decodificada do Planejamento Fatorial 2² e resultados correspondentes a biomassa (massa seca) e produtividade de lipídeos totais produzidos por *M. isabellina*, cultivada em glicose e milhocina.

Ensaio	Glicose (g) (v/v)	Milhocina (ml) (v/v)	Biomassa (g/L)	Lipídeos Totais (% p/v)
1	4	4	0,14	0
2	4	16	16,69	32,9
3	16	4	13,95	41,63
4	16	16	13,06	34,76
5	10	10	14,97	38,43
6	10	10	11,24	47,42
7	10	10	14,56	47,71
8	10	10	15,30	51,27

Tabela 3. Matriz decodificada do Planejamento Fatorial 2² e resultados correspondentes a biomassa (massa seca) e produtividade de lipídeos totais produzidos por *M. isabellina*, cultivada em glicerol residual e milhocina.

Ensaio	Glicerol residual (g) (v/v)	Milhocina (mL) (v/v)	Biomassa (g/L)	Lipídeos Totais (% p/v)
--------	-----------------------------	----------------------	----------------	-------------------------

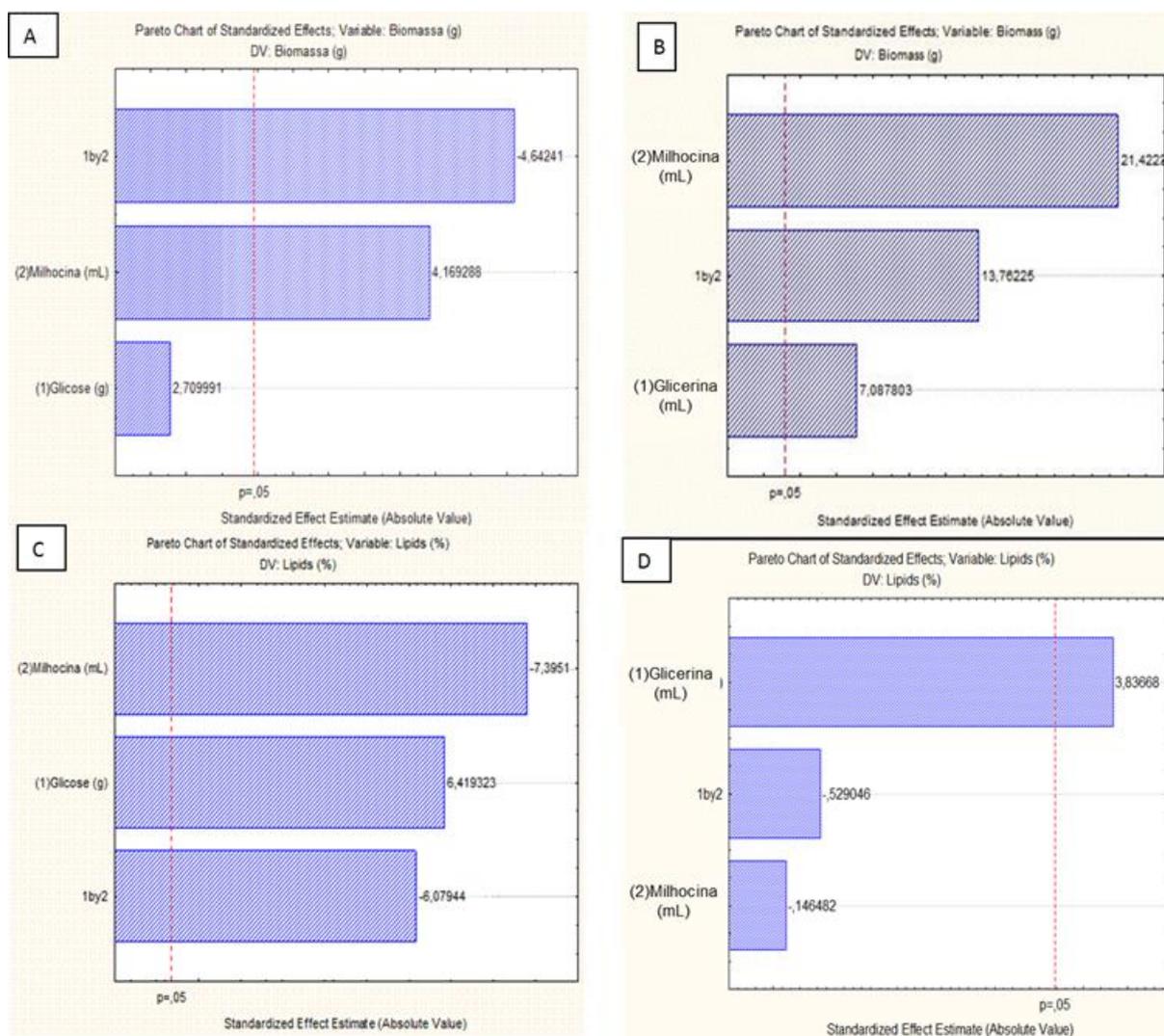
1	4	4	8,68	38,49
2	4	16	15,94	41,71
3	16	4	2,36	75,24
4	16	16	35,68	69,55
5	10	10	21,73	58,62
6	10	10	21,85	50,51
7	10	10	20,41	64,91
8	10	10	19,95	70,03

3.2. Efeitos das concentrações de glicose ou glicerol residual e milhocina sobre a concentração de biomassa e de lipídeos totais produzidos por *M. isabellina*.

De acordo com os Diagramas de Pareto, ilustrados na Figura 2, para um nível de confiança de 95%, pode-se observar que:

- O aumento das concentrações de milhocina exerceram efeitos positivos, estatisticamente significativos, sobre o aumento da produção de biomassa do fungo nos cultivos utilizando glicose e glicerol residual como fontes de carbono. No Planejamento 2, o glicerol residual também foi um contribuinte, estatisticamente significante, sobre a produção de biomassa. Avaliando as interações entre os substratos, foi observado que a associação de glicose e milhocina exerceram efeitos negativos, estatisticamente significativos, sobre o aumento da concentração de biomassa, enquanto nos cultivos com glicerol residual a associação influenciou de forma positiva. (Fig.2 A e B)
- Para o planejamento utilizando glicose, o aumento da concentração de milhocina e as interações entre os substratos desempenharam efeitos negativos, estatisticamente significativos, sobre a produção de lipídeos totais, enquanto a glicose exerceu efeitos positivos. O uso de glicerol residual influenciou positivamente a geração de lipídeos, estatisticamente significativo, enquanto as interações e a milhocina não influenciaram de forma significativa. (Fig. 2 C e D).

Figura 2: Diagramas de Pareto para planejamento fatorial completo 2^2 , tendo como variáveis independentes as concentrações de glicose, glicerol residual e milhocina e como variável resposta a concentração de biomassa (massa seca) e lipídeos totais produzidos por *M. isabellina*. Os diagramas (A) e (B) referem-se a produção de biomassa utilizando como substratos glicose e glicerol residual, respectivamente, enquanto (C) e (D) referem-se a produção de lipídeos totais utilizando glicose e glicerol residual, respectivamente.



Em resultados publicados por Papanikolaou et al. [32], o fungo *M. isabellina* cultivado em glicerol residual e limitação de nitrogênio produziu quantidades significantes de lipídeos, 4,4g/L, cerca de 50%, sendo considerado um resultado importante, dado que o glicerol não é um substrato adequado para produção de lipídeos por vários Zygomycetos oleaginosos em contraste com vários açúcares, polissacarídeos e materiais gordurosos. Já em estudo realizado por Demir et al. [33] utilizando o mesmo fungo cultivado em lactose como fonte de carbono, a concentração máxima de óleo microbiano encontrada foi de 3,65 g/L e o rendimento microbiano de óleo foi de 12,11% obtidos a partir da biomassa cultivada numa concentração de 16,0% de lactose. E Gao, et al., [11], avaliando o crescimento da mesma espécie de fungo em meio contendo xilose como fonte de

carbono a uma concentração de 100g\L, verificou a produção de 18,6 g\L de biomassa com produtividade de 55,1% em lipídeos.

A milhocina é considerada uma fonte de nitrogênio orgânica responsável pela produção de aminoácidos e proteínas de crescimento celular e lipídeos totais, podendo influenciar na composição de ácidos graxos de micro-organismos. Apresenta um teor de 25% de proteína, é rica em nutrientes importantes, incluindo as vitaminas, minerais, aminoácidos e estimulantes de crescimento, entre eles os ácidos vanílico, ácido, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ferúlico e sinapínico, portanto, não devendo ser considerada proteína hidrolisada ou hidrolisado protéico e sim como fonte de nitrogênio essencial para o crescimento celular [26]. A concentração de nitrogênio é fator essencial que influencia na produção de lipídeos, pois o seu esgotamento provoca uma diminuição na concentração intracelular de AMP, um ativador da isocitrato desidrogenase, e, como consequência, um aumento no conteúdo de citrato e isocitrato nas células, citrato é convertido por adenosina trifosfato:citrato liase em oxalacetato e acetil-CoA, que por sua vez é usado para a síntese de ácidos graxos, enquanto que o aumento de nitrogênio há uma crescente produção de biomassa e redução de lipídeos. E quando há um jejum de carbono, os TAGs são preferencialmente consumidos [4,17,18,34-37].

Resultados similares foram encontrados por Chatzifragkou et al. [17] demonstrando que a fonte de carbono desempenhou um papel essencial no processo de acumulação lipídica. Mesma observação foi feita por Kumar et al. [38], que estudou a produção de lípidos por *Mortierella sp* em diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose e lactose) e fontes de nitrogênio (extracto de levedura, NH₄Cl e (NH₄)₂SO₄). No estudo de Donot, et al, [36], a glicose como fonte de carbono conduziu para o mais alto teor de lipídeos na biomassa (28,2 %) e o teor de biomassa mais elevado (10 g\L), enquanto frutose conduziu a um teor de lípidos de 26,5 %.

Uma outra pesquisa realizada por Fakas, et al., [18] avaliando o crescimento de *C. echinulata* em amido de milho, milhocina, soro de leite, extrato de levedura e resíduos de tomate, observou que o aumento da concentração de nitrogênio estimula a produção de biomassa e reduz a acumulação de lipídeos, com exceção para os resíduos de tomate. O cultivo com a concentração de 0,7g\L de milhocina, a *C. echinulata* apresentou uma biomassa de 18,5g\L e um rendimento de 14% de lipídeos.

Geralmente, existem dois tipos principais de síntese lipídica na célula de micro-organismos oleaginosos, classificadas como “de novo” e “ex novo”. A diferença entre as biossínteses é que a acumulação “ex novo” se dá em substratos hidrofóbicos e a “de novo” em substratos hidrofílicos. Limitações de nutrientes (geralmente fonte de nitrogênio) são necessários para acúmulos de lipídeos “de novo”. No entanto, neste trabalho foi observado que a adição de milhocina não interferiu o acúmulo de lipídeos. Semelhante ao ocorrido no trabalho de Huang, et al., [39], que

constatou que a adição de hidrolisados de sabugo de milho a fermentação com *L. starkeyi* causou pouco efeito no rendimento de lipídeos produzidos.

Segundo Kavadia et al., [27], a degradação de lipídeos começa após esgotamento da fonte de carbono, independente da natureza do substrato (por exemplo, glicose ou gorduras). No entanto, a biossíntese de lipídeos de armazenamento a partir de carboidratos, como glicose ou outros ocorre após a exaustão da fonte de nitrogênio.

3.3. Perfil de ácidos graxos

Os resultados da composição de ácidos graxos mostraram que nos óleos extraídos das biomassas crescidas em meios de acordo com o Planejamento Fatorial 1, utilizando glicose e milhocina, continha ácidos de 8 a 22 carbonos, dentre eles 54% de saturados. E os correspondentes ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) estão listados na Tabela 1, são eles: Ácido Caprílico (C8:0), Ácido laurílico (C12:0), Ácido mirístico (C14:0), Ácido palmítico (C16:0), Ácido γ -linolênico (C18:3 - ω -6), Ácido linoléico (C18:2), Ácido Oléico (C18:1), Ácido linolênico (C18:3 - ω -3), Ácido esteárico (C18:0), Ácido eicosenóico (C20:1), Ácido araquídico (C20:0), Ácido erúcico (C22:1) e Ácido behênico (C22:0). Sendo os de maiores proporções apresentados na Figura 3. Os maiores picos foram correspondentes aos ácidos oleico e palmítico, de acordo com as concentrações de carbono e nitrogênio. Na condição 3, onde foi verificada maior produção de lipídeos pelo fungo, apresenta um perfil predominante de ácidos palmítico (31,40%), linoléico (7,80%), oléico (42,41%) e esteárico (10,19%) (Tabela 4).

Conforme o Planejamento 2, utilizando o glicerol residual e milhocina, a composição predominante anterior foi mantida, apenas variando as porcentagens. Avaliando o Ensaio 3, foram verificadas as correspondentes concentrações para ácido palmítico, linoléico, oléico e esteárico – 21,8%, 44,5%, 23,24% e 5,45%, respectivamente. Chamando atenção para o aumento considerável de ácido linoleico (C18:2) e redução de oleico comparado com os resultados do Planejamento anterior, ou seja, maior teor de ácidos graxos insaturados (Tabela 5). Segundo Kiran, et al., [40], característica desejável por proporcionar boa qualidade ao biodiesel, como viscosidade gravidade específica, índice de cetano e iodo, e bom desempenho do motor a baixas temperaturas.

Como a qualidade do biodiesel é dependente da composição de ácidos graxos presentes na matéria-prima do óleo, o conteúdo de lipídeos totais (> 20%) e o tipo de ácidos graxos são

critérios importantes. A espécie *M.i sabellina* é composta principalmente por lipídeos não polares, perfazendo mais de 90% dos lipídeos totais. (KHOT et al., 2012; HUSSAIN et al., 2014).

Tabela 4. Perfil de Ácidos Graxos de *M. isabellina* (%) em diferentes meios de cultura, de acordo com o Planejamento Fatorial 1, utilizando glicose e milhocina.

Ensaio Ácidos graxos	% de ácidos graxos						
	2	3	4	5	6	7	8
Ácido Caprílico (C8:0)	0,29	0,81	0,60	0,84	0,37	0,46	0,48
Ácido laurílico (C12:0)	0,32	0,00	0,32	0,51	0,52	0,48	0,50
Ácido mirístico (C14:0)	2,98	2,31	3,74	3,73	3,50	3,14	3,15
Ácido palmítico (C16:0)	30,36	31,40	34,30	33,21	32,52	31,64	30,07
Ácido γ -linolênico (C18:3 - ω -6)	0,16	8,89	1,45	1,28	0,19	0,22	0,16
Ácido linoléico (C18:2)	9,47	0,00	7,80	7,19	7,82	7,59	8,68
Ácido Oléico (C18:1)	44,25	42,41	38,15	40,90	44,02	44,58	46,27
Ácido linolênico (C18:3 - ω -3)	0,73	0,76	0,54	0,74	0,84	1,05	0,95
Ácido esteárico (C18:0)	7,55	10,24	10,19	8,91	7,41	7,45	7,69
Ácido eicosenóico (C20:1)	0,45	0,59	0,39	0,41	0,36	0,42	0,27
Ácido araquídico (C20:0)	0,31	0,41	0,35	0,30	0,29	0,45	0,28
Ácido erúico (C22:1)	2,12	1,48	1,50	0,95	0,53	0,56	0,23
Ácido behênico (C22:0)	0,58	0,70	0,68	1,03	1,62	1,96	1,12

Tabela 5. Perfil de Ácidos Graxos de *M. isabellina* (%) em diferentes meios de cultura, de acordo com o Planejamento Fatorial 2, utilizando glicerol residual e milhocina.

Ensaio Ácidos graxos	% de ácidos graxos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ácido Caprílico (C8:0)	0,50	0,69	1,21	0,43	0,34	0,34	0,12	0,51
Ácido mirístico (C14:0)	0,70	0,89	0,00	0,54	0,59	0,71	0,76	0,56
Ácido palmítico (C16:0)	20,14	21,07	21,79	20,40	20,93	22,67	24,22	21,36
Ácido γ -linolênico (C18:3- ω 6)	3,23	1,55	0,00	0,15	0,47	0,45	0,39	0,35
Ácido linoléico (C18:2)	40,05	44,78	44,49	50,83	46,59	42,82	43,11	46,23
Ácido Oléico (C18:1)	27,19	22,54	23,24	21,00	23,17	23,69	22,42	22,65
Ácido linolênico (C18:3 - ω -3)	1,39	1,32	1,70	1,22	1,44	1,42	1,59	1,35
Ácido esteárico (C18:0)	5,11	6,56	5,45	4,75	5,52	6,89	5,92	4,97
Ácido eicosenóico (C20:1)	0,28	0,00	0,00	0,15	0,19	0,20	0,18	0,20
Ácido araquídico (C20:0)	0,54	0,35	0,60	0,30	0,36	0,39	0,34	0,33
Ácido erúico (C22:1)	0,26	0,00	1,05	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00
Ácido behênico (C22:0)	0,39	0,25	0,47	0,23	0,26	0,28	0,50	0,75

Estes resultados são bem parecidos com os observado no trabalho de Kiran, et al., [40], em que estudaram o crescimento da levedura *R. toruloides* em diferentes fontes de C e N, e obtiveram a produção de ácidos oleico (53,7-66,6%), palmítico (15,1-20,1%), linoleico (4,4-19,2%) e esteárico (8,1-12,7%) e por isso o óleo encontrado foi considerado como potencial matéria-prima para biodiesel.

Segundo Koike, et al., [41], a chave para produção de lipídeos é a redução de nitrogênio no meio de cultivo. Através de investigações dos efeitos da limitação de carbono e nitrgênio, variando a relação C\N nos meios, verificou que os rendimentos de ácidos graxos eram máximos quando o nitrogênio estava em concentração limitada. E em condições de excesso de nitrogênio, a produção de biomassa era elevada e a proporção de ácidos graxos poli-insaturados era crescente, enquanto a de ácidos graxos saturados diminuía. Mas quando o carbono estava em excesso, as proporção de ácidos graxos insaturados e saturados eram contrárias. A partir destes resultados, ficou claro que as concentrações da fonte de carbono e nitrogênio devem ser equilibradas.

Estudos realizados por Demir, et al., [33], o mesmo fungo desta pesquisa cultivado em lacase apresentou em seu perfil lipídico cerca de 34% dos ácidos graxos saturados e 66% insaturados, sendo os mais predominantes os ácidos palmítico e oleico.

As Tabelas 6 e 7 mostram alguns resultados comparativos das composições de ácidos graxos entre o lipídeo de *M. isabellina* e óleos vegetais mais comumente utilizados na produção de biodiesel. Demonstrado que a composição de ácidos graxos do fungo estudado é semelhante a de óleos vegetais, sendo considerado uma potencial matéria-prima para a produção de biodiesel.

Tabela 6: Composição de ácidos graxos de plantas oleaginosas utilizados na produção de biodiesel

Fontes de lipídeos	Composição de ácidos graxos (%)				
	C14:0	C16:0	C18:2	C18:1	C18:0
Canola	Nd	4-5	20-31	55-63	1-2
Milho	Nd	7-13	39-52	30.5-43	2.5-3
Oliva	1.3	7-18.3	4-19	55.5-84.5	1.4-3.3
Palma	0.6-2.4	32-46.3	6-12	37-53	4-6.3
Amendoim	0.5	6-12.5	13-41	37-61	2.5-6
Girassolr	Nd	4-8	11-19	73.6-79	2.3-8
Soja	Nd	2.3-11	49-53	22-30.8	2.4-6

Nd: não detectado

(Fonte: Huang, et al., 2012)

Tabela 7: Composição de ácidos graxos do lipídeo de *Mortierella isabellina* cultivada em meios de combinações diferentes.

Fontes de lipídeos	Composição de ácidos graxos (%)				
	C14:0	C16:0	C18:2	C18:1	C18:0
<i>M. isabellina</i> *	2.9-3.74	30.07-34.30	7.19-9.47	38.15-46.27	7.41-8.91
<i>M. isabellina</i> **	0.54-0.89	20.14-24.2	40.05-50.83	22.54-27.2	4.75-6.9

*: cultivada em glicose + milhocina

** : cultivada em glicerol residual + milhocina

3.4. Aspectos ultraestruturais das melhores condições em produção de lipídeos

A estrutura fina do fungo *M. isabellina* cultivado em meios contendo glicose ou glicerol e milhocina, referentes ao Ensaio 3 de acordo com os Planejamentos Fatoriais estudados, onde foi obtido maior concentração de lipídeos, está apresentada na Figura 3.

A análise das micrografias, em amplitude de 3000x, obtidas através do método de rotina pela microscopia eletrônica de varredura permitiu verificar na biomassa cultivada em presença de glicose e milhocina a ocorrência de hifas com textura lisa e homogênea, profusamente ramificadas e largas, apresentando grande quantidade de clamidosporos com diferentes formas e tamanhos (Fig.3 A e B). Por outro lado no cultivo em presença de glicerol residual e milhocina, as hifas apresentaram-se mais eletrodensas, forma tubular com textura lisa e mais heterogênea, clamidosporos com forma globosa e em número mais reduzido que a amostra anterior (Fig. 3 C e D). Também foi visualizada nos cultivos tendo como fonte de C a glicose, a presença de esporângios e a presença de abundantes corpos lipídicos proporcionando um aumento do calibre das hifas (Figura 4).

Figura 3: Eletromicrografias da biomassa do fungo *M. isabellina* cultivada no Ensaio 3 de cada Planejamento estudado, em 8% de glicose\ glicerol residual e 2% de milhocina (A e B) micrografias do cultivo em glicose e milhocina, (C e D) micrografias do cultivo em glicerol residual e milhocina

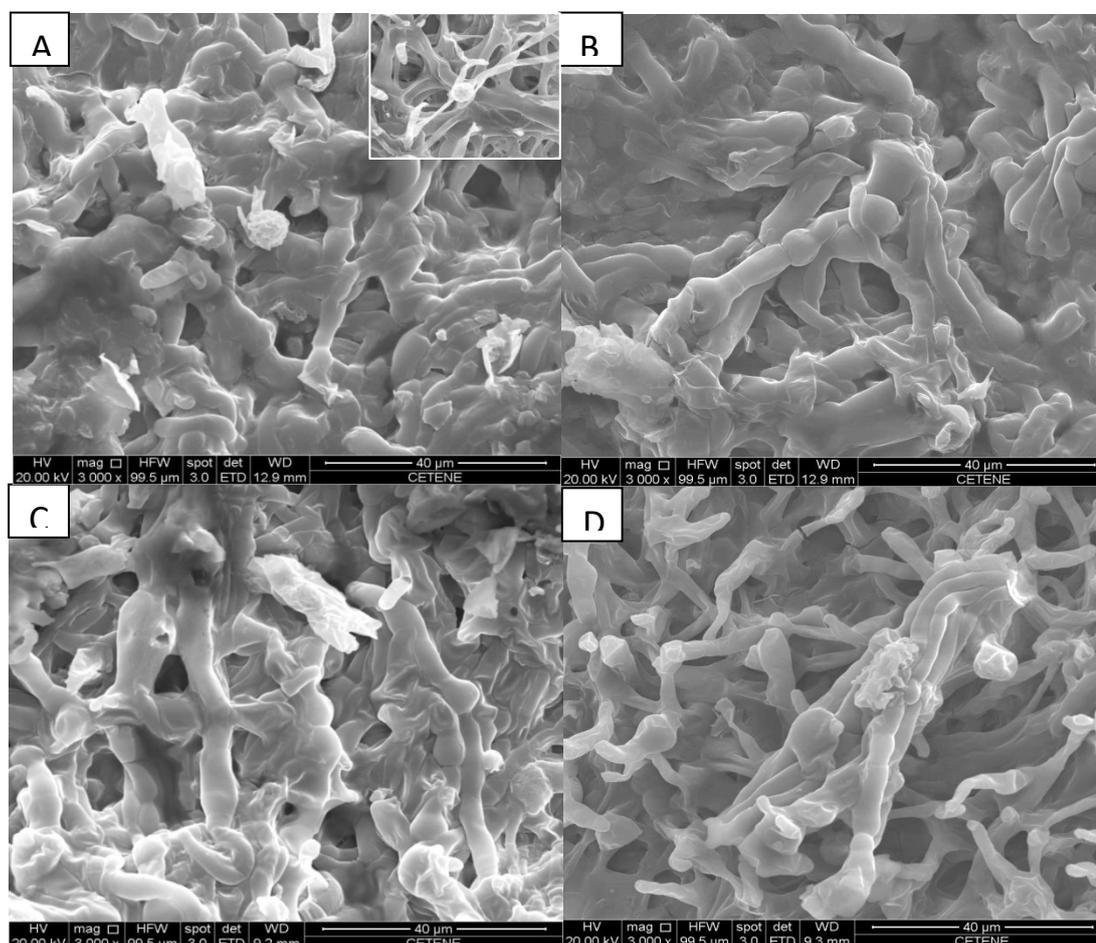
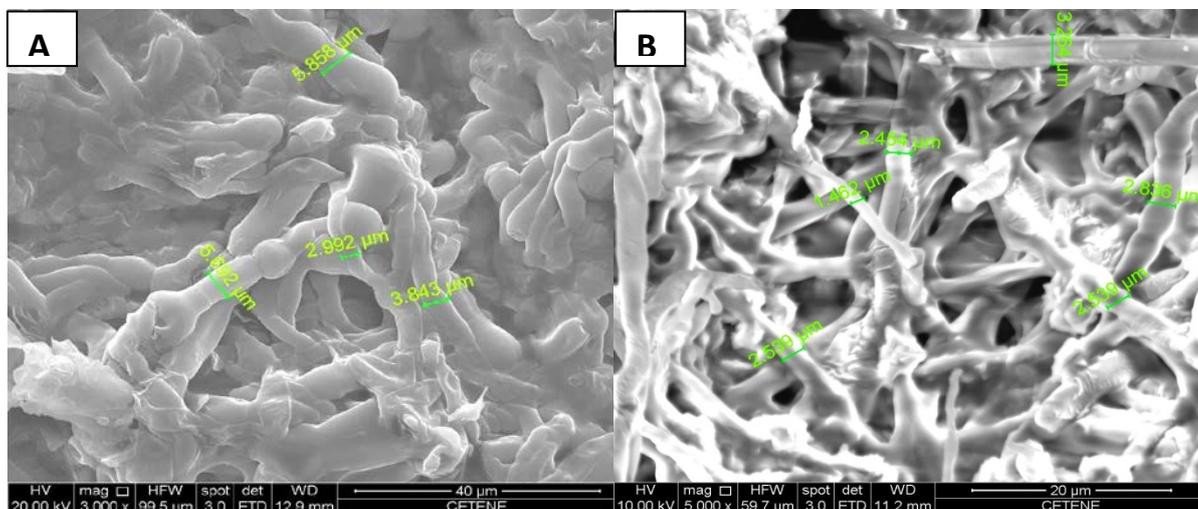


Figura 4: Eletromicrografias mostrando as diferenças de diâmetro em hifas cultivadas em glicose (A) e em glicerol residual (B).



4. Conclusões

Em conclusão, a valorização de resíduos agro-industriais por meio de fermentação microbiana com o fungo *Mortierella isabellina* para a produção de SCO parece ser uma perspectiva realista, embora a otimização dos processos biológicos envolvidos seja claramente um pré-requisito para utilização de resíduos agroindustriais. O uso de glicerol residual proporcionou ao fungo condições favoráveis para a produção de lipídeos, sobressaindo-se a produção com a utilização da glicose como fonte de carbono. Fornecendo um balanço equilibrado associado à milhocina para acumulação de lipídeos de composição química equivalente às matérias-primas do biodiesel, por apresentar um grau médio de insaturações.

Agradecimentos

Ao CNPq e a CAPES pelo financiamento dos materiais de consumo e bolsa de pós-graduação, respectivamente. Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, da Universidade Católica de Pernambuco pelo acolhimento no desenvolvimento deste trabalho.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não houve conflitos no decorrer do desenvolvimento da pesquisa

Contribuição dos autores

Manuela Cristina Mota Lins contribuiu para a execução dos experimentos, revisão de literatura e desenvolvimento do artigo. Adriana Ferreira Souza e Roberta Sampaio Pinho contribuíram com a execução de experimentos e análises cromatográficas. Norma Buarque Gusmão e Galba Maria Campo Takaki contribuíram para a composição do artigo e foram responsáveis pelo produto final, contribuindo igualmente para este trabalho. Todos os autores analisaram e aprovaram o documento final.

Referências:

1. Papanikolaou, S.; Aggelis, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011, 113, 1052–1073. DOI: 10.1002/ejlt.201100015.
2. Ratledge, C. Microorganisms for lipids, *Acta Biotechnol.*, 1991, 11, 429–438.
- 3 Ratledge, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production, *Biochimie*, 2004, 86, 807–815. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.09.017.
- 4 Dyal, S.D.; Bouzidi, L.; Narine, S.S. Maximizing the production of c-linolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. *Food Research International*, 2005, 38 (7), 815–829.
- 5 Szczesna-Antczak, M.; Antczak, T.; Piotrowicz-Wasiak, M.; Rzycka, M.; Binkowska, N.; Bielecki, S. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39, 1214–1222. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.03.008.

- 6 Certik, M.; Slavikova, L.; Masrnová, S.; Sajbidor, J. Enhancement of nutritional value of cereals with γ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations. *Food Technology Biotechnology*, 2006, 44, 75-82.
- 7 Ratledge, C. Microorganisms for lipids. In: Meesters, P. A.; Huijberts, G. N. High-cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1996, v.45, n.5, p.575-579.
- 8 Liu, B.; Zhao, Z. K. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, 780, p. 775–780. DOI: 10.1002/jctb.
- 9 Zheng, Y.; Yu, X.; Zeng, J.; Chen, S. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for biofuels*, 2012, 5, 50. DOI: 10.1186/1754-6834-5-50.
- 10 Pupin, A. M., Messias, C. L., Piedrabuena, A. E. ; Roberts, D. W. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. *Brazilian Journal of Microbiolog*, 2000, 31, 121–128. ISSN 1517-8382.
- 11 Gao, D.; Zeng, J.;Zheng, Y.; Yu, X.; Chen, S. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. *Bioresource technology*, 2013, 133, 315–21. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.132.
- 12 Shaw, R. The fatty acids of phycomycete fungi, and the significance of the gamma-linolenic acid component. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1966, p.325-331.
- 13 Kennedy, M. J.; Reader, S. L.; Davies, R.J. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993, 42, 625-34.
- 14 Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. **Introductory Mycology**, 4th ed., Wiley, New York, 1996, pp. 683–737.

- 15 Bononi, V. L. R.; Trufem. S. F. B. (Org.) **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: Noções básicas de taxonomia e aplicação biotecnológicas**. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p184. 1998.
16. Vicente, G.; Bautista, L F.; Guti, F. J.; Marti, V.; Ruiz-V, R. M.; Rodri, R. A.; Torres-Marti, S.; Garre, V. Direct Transformation of Fungal Biomass from Submerged Cultures into Biodiesel, *Energy Fuels*, 2010, 15, 22-27. DOI: 10.1021/ef9015872.
17. Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., Papanikolaou, S. Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2010, 112 (9), 1048–1057. DOI: 10.1002/ejlt.201000027.
18. Fakas, S.; Certik, M.; Papanikolaou, S.; Aggelis, G.; Komaitis, M.; Galiotou-Panayotou, M. c-Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 5986–5990. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.10.016.
19. Economou, C.N.; Aggelis, G.; Pavlou, S.; Vayenas, D.V. Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (20), 9737–9742. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.08.025.
20. Ruan, Z.; Zanotti, M.; Wang, X.; Ducey, C.; Liu, Y. Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 2012, 110, 198–205. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.053.
21. Zheng, Y. et al. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for biofuels*, 2012, 5, 50.
22. Huang, C.; Wu, H.; Li, R.-F.; Zong, M.-H. Improving lipid production from bagasse hydrolysate with *Trichosporon fermentans* by response surface methodology. *New Biotechnology*, 2012, 29, 3, 372-378. DOI: 10.1016/j.nbt.2011.03.008.

23. Rivaldi, J.D.; Sarrouh, B.F.; Fiorilo, R. E Silva, S.S. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. *Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2008, Brasil, n.37, p. 44-51.
24. Paiva, S.; Devaux, F.; Barbosa, S.; Jacq, C.; Casal, M.. Ady2p is essential for acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2004, 21, 201– 210.
25. Fontes, G.C.F., Amaral, P.F.F., Coelho, M.A.C. Produção de biossurfactante por levedura. *Química Nova*, 2008, 31, p. 8 - 15.
26. Wang, F.; Hu, Jian-H.; Guo, C.; Liu, Chun-Z. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. *Bioresource technology*, 2014, 166, 602-605. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.05.068.
27. Kavadia, A.; Komaitis, M.; Chevalot, I.; Blanchard, F.; Marc, I.; Aggelis, G. Lipid and γ -linolenic acid accumulation in strains of zygomycetes growing on glucose. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001, 78, 4, 341-346. DOI: 10.1007/s11746-001-0266-3.
28. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497–509.
29. Xu, J.; Zhao, X.; Wang, W.; Du, W.; Liu, D. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochem. Eng. J.* 2012: 65, 15, 30–36. DOI: 10.1016/j.bej.2012.04.003.
30. Joseph, J. D.; Ackman, R. G. Capillary column gas-chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl-esters - Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 1992, 75 (3), 488-506.
31. De Souza, W. *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas*. Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998, 271p.

- 32 Papanikolaou, S.; Galiotou-Panayotou, M.; Fakas, S.; Komaitis, M.; Aggelis, G. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 2419–2428. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.05.005.
- 33 Demir, M.; Turhan, I.; Kucukcetin, A.; Alpkent, Z. Oil production by *Mortierella isabellina* from whey treated with lactase. *Bioresource Tecnology*, 2013, 128, 365-369. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.078.
- 34 Lu, J.; Peng, C.; Ji, X.; You., J. Fermentation Characteristics of *Mortierella alpina* in Response to Different Nitrogen Sources. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 5, 979–990. DOI: 10.1007/s12010-011-9189-z.
- 35 Papanikolaou, S.; Komaitis, M.; Aggelis, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology*, 2004, 95 (3), 287–291. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.02.016.
36. Donot, F.; Fontana, A.; Baccou, J.C.; Strub, C.; Schorr-Galindo, S. Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and Bioenergy*, 2014, 68 (04), 135-150. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.06.016.
- 37 Liang M.-H.; Jiang, J.-G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in lipid research*, 2013, 52, 4, p. 395-408. DOI: 10.1016/j.plipres.2013.05.002.
- 38 Kumar, I.; Ramalakshmi, M.A.; Sivakumar, U.; Santhanakrishnan, P.; Zhan, X.M. Single cell oil production from *Mortierella sp* for generation of biodiesel feedstock- a feasibility study. *Afr J Microbiol Res*, 2011; 5(24):4105-11. ISSN: 19960808.
- 39 Huang, C.; Chen, X.-F.; Yang, X.-Y.; Xiong, L.; Lin, X.-Q.; Yang, J.; Wang, B.; Chen, X.-D. Bioconversion of Corn cob AcidHydrolysate into Microbial Oil by the Oleaginous Yeast *Lipomyces starkeyi*. *Appl Biochem Biotechnol* (2014) 172:2197–2204. DOI 10.1007/s12010-013-0651-y.

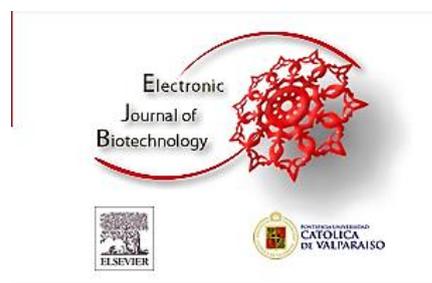
40. Kiran, U. E.; Trzcinski, A.; Webb, C. Microbial oil produced from biodiesel by-products could enhance overall production. *Bioresource technology*, 2013, 129, p. 650–4. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.152.

41. Koike, Y.; Cai, H. J.; Higashiyama, K.; Fujikawa, S.; Park, E. Y. Effect of Consumed Carbon to Nitrogen Ratio on Mycelial Morphology and Arachidonic Acid Production in Cultures of *Mortierella alpina*. *Journal of bioscience and Bioengineering*, 91 (4), 382-389, 2001

CAPÍTULO IV

Artigo submetido a revista: **Electronic Journal of Biotechnology**

ISSN: 0717-3458



Produção de lipídeos e ácidos graxos a partir de biomassa do fungo *Mortierella isabellina* utilizando glicerol residual do biodiesel

¹Manuela Cristina Mota Lins; ²Bruno Guedes Campelo; ³Adriana Ferreira de Souza;
⁴Norma Buarque Gusmão, ⁵Galba Maria Campos Takaki

- ¹ Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Endereço: Fone: 50670-901, Recife – PE, Brasil. (M.C.M.L.) E-Mail: motalinsmr@gmail.com
- ² Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura, Faculdade Salesiana do Nordeste, Recife –PE, Brasil (B.G.C.). E-mail: bruno_campelo21@hotmail.com
- ³ Mestrado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, 50670-901, Recife – PE, Brasil. (A.F.S.) E-Mail: adrife.souza@gmail.com,
- ⁴ Dept. Antibióticos, Universidade Federal Pernambuco-UFPE, 50670-901, Recife – PE, Brasil. (N.B.G) E-Mail: normagusmao@gmail.com
- ⁵ Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology-NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, Recife – PE, Brasil. (G.M.C.T.) E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

* Corresponding Author: Profa.Dra.Galba Maria de Campos Takaki, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife,PE, Brasil Phone: +55 81 21194017; Fax: +55 81 21194043. E.mail : galba_takaki@yahoo.com.br

Resumo

Este estudo utilizou a linhagem do fungo *Mortierella isabellina*, com objetivo de avaliar a produção de lipídeos a partir do aproveitamento do glicerol residual do biodiesel para produção de biomassa fúngica e lipídios. Esta espécie vem se destacando por apresentar em algumas espécies 86% de lipídeos poliinsaturados em sua biomassa total. A busca por micro-organismos que acumulem altos teores de lipídios torna-se um caminho biotecnológico promissor para o reaproveitamento do glicerol, bem como, minimização dos custos de produção do biodiesel. O inóculo foi preparado em Erlenmeyers contendo 250 mL do meio de cultivo com concentrações (2, 4 e 8%) dos substratos: glicose, glicerol comercial, glicerol residual do biodiesel, e milhocina, com pH ajustado para 6,0. A incubação foi realizada sob agitação de 120 rpm, a 28°C por 168 horas. Após este período a biomassa foi filtrada e liofilizada até peso constante. Os lipídios totais foram extraídos das biomassas secas pelo sistema utilizando solvente orgânico, e foram quantificados através do cálculo de diferença dos pesos. Os ésteres dos ácidos graxos esterificados foram submetidos à leitura em cromatografia gasosa.

Resultados: Como resultados, o cultivo em glicerol residual a 8% alcançou maior produção de biomassa (20 g/L), contendo os seguintes ácidos graxos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), oleico (C18:1), γ - linolênico (C18:3), e linoleico (C18:2), apresentando a máxima porcentagem (60,1%).

Conclusões: Os resultados obtidos demonstraram a possibilidade de reaproveitamento dos resíduos agroindustriais, favorecendo o desenvolvimento da inovação tecnológica com a geração de matéria-prima potencial para produção de biodiesel.

Palavras-chaves: Fungo, *Mortierella isabellina*, Glicerol residual, Milhocina, Lipídeos.

1. Introdução

As primeiras pesquisas sobre a produção de óleo micróbios provavelmente surgiram a partir da Primeira Guerra Mundial, onde os alemães para substituir o óleo de cozinha usaram cepas de *Endomyces* e *Fusarium sp.* [1]

Atualmente, os altos preços da energia, segurança energética e ambiental, preocupações com o suprimento do petróleo são pontos de grande atenção à busca de novas fontes de combustíveis renováveis. O biodiesel é considerado um dos biocombustíveis mais promissores para suprir esta demanda energética. Sendo uma fonte alternativa, atóxico e produzido a partir de fontes renováveis, como óleos vegetais, ou de gorduras animais por transesterificação com álcoois de baixo peso molecular. Os triacilgliceróis (TAGs) reagem com o álcool sob presença de catalisador ácido ou alcalino, pela transesterificação para produzir o biodiesel - os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) e o glicerol como subproduto [2, 3, 4].

O uso de micro-organismos oleaginosos vem sendo apresentado como uma fonte de óleos e gorduras de baixo custo. Os micro-organismos oleaginosos são definidos como aqueles que apresentam um conteúdo lipídico acima de 20%. Existem diversas variedades, tais como microalgas, bactérias, fungos e leveduras. Os teores de lipídios variam entre 16 a 77% para microalgas, 18 até valores superiores a 40% para bactérias, entre 50 a 70% para leveduras e 50 a 85% para fungos filamentosos [4, 5, 6, 7, 8, 9; 10, 11, 12].

Acumulação lipídica em leveduras e fungos oleaginosos tem sido demonstrada por ocorrer quando um nutriente no meio (por exemplo, fonte de nitrogênio ou fósforo) torna-se limitada e a fonte de carbono está presente em excesso. A limitação de nitrogênio é a condição mais eficiente para a indução de lipogênese. Durante a fase de crescimento, o nitrogênio é necessário para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, enquanto que o fluxo de carbono é distribuída entre os processos energéticos e anabólicos rendendo hidratos de carbono, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Quando a fonte de nitrogênio fica limitada, a taxa de crescimento diminui e a síntese de proteínas e ácidos nucleicos que tende a cessar. Nas espécies não oleaginosas, o excesso de carbono permanece não utilizado ou é convertida em polissacarídeos de armazenamento, enquanto que, em

espécies oleaginosos, é preferencialmente, canalizado para a síntese de lipídeos, levando à acumulação de TAG dentro de corpos de lipídicos intracelulares [13; 14].

Exploração de fungos filamentosos oleaginosos para produção de biodiesel tem uma história mais recente, que, com poucas exceções, deriva de estudos focados para produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), tais como ácido araquidônico e ácido γ -linolênico. O exemplo mais relevante desta aplicação biotecnológica é representado pela exploração de *Mortierella alpina* para produzir óleos que contenham ácidos graxos de 1 a 9 insaturações. Entre os principais produtores de lipídios está a espécie *Mucor circinelloide*, um fungo Zygomycete, que está emergindo como patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos. *M. circinelloides* foi usado como o primeiro produtor comercial de lipídeos microbianos [15]. O acúmulo de lipídios em *M. circinelloides* tem sido extensamente estudada, e estes triglicerídeos (TAG) foram propostos como matéria-prima para a produção de biodiesel por transformação direta de seus lipídeos [5]. As espécies *M. circinelloides* e *Mortierella isabellina* representam um modelo de destaque dentro do filo Zygomycota, como espécies promissoras para converter resíduos de biomassa em precursores do biodiesel. Em contrapartida, a espécie de *Aspergillus oryzae* está sendo extensivamente estudada como produtor de lipase para realizar a transesterificação de TAG [16].

Algumas espécies do gênero *Mortierella sp.* se destacam como fonte energética para a produção de biodiesel por apresentar em algumas espécies 86% de lipídeos poliinsaturados em sua biomassa total, correspondendo principalmente aos seguintes ácidos graxos: ácido palmítico, ácidos oléico e linolênico [8].

Em comparação com os óleos vegetais, óleos microbianos têm muitas vantagens, por apresentarem ciclo de vida mais curto, quantidade de lipídeo obtido e rendimento do produto final, são menos afetados por local, estação e clima, mais fácil de escalar e manipular geneticamente e principalmente com baixo custo de produção. [5, 18, 19, 20]. Portanto, os micro-organismos podem tornar-se uma das potenciais matérias-primas para a produção de biodiesel no futuro, contudo, poucos trabalhos estão sendo desenvolvidos associados à produção de óleos por micro-organismos [2, 21, 22].

Como o custo de produção de biodiesel é fator limitante do desenvolvimento em grande escala do biodiesel, para reduzir os custos das matérias-primas as atenções têm sido voltadas para os óleos microbianos. Com isso, a produção dos óleos microbianos vem explorando outras fontes de carbono, em vez de glicose, especialmente para tais óleos aplicados à produção de biodiesel. Foi relatado que a xilose, glicerol, palha de milho, e outros resíduos agrícolas e industriais podem ser utilizados como fontes de carbono para a acumulação de óleos microbianos. Devido ao baixo rendimento de óleo na maioria das bactérias, os pesquisadores se concentram principalmente em microalgas e fungos no presente [2, 23].

A utilização de lipídios microbianos para a produção de biodiesel só é economicamente viável se os micro-organismos oleaginosos forem cultivados com substratos de baixo custo (por exemplo, os derivados ou resíduos de outros processos)

produzindo alta concentração de lipídios e de biomassa e exibindo rendimento e produtividade adequada. Nesta perspectiva, a glicerol bruto (glicerol residual do biodiesel) é uma matéria-prima muito promissora, porque é o residual sem custos de produção de biodiesel, que consiste de uma mistura de glicerol (65-85%, w / w), metanol, sabonetes e sais minerais [24], que podem ser valorizados na produção de lipídeos. Assim como, culturas de leveduras oleaginosas em meio à base de glicerol estão atraindo grande interesse e a biodiversidade natural é cada vez mais explorada para identificar espécies oleaginosas novas utilizando esta fonte de carbono para crescimento e de produção de lipídeos [25-26] A aplicação de técnicas de cultivo promove melhor rendimento do substrato para conversão de fontes de carbono em biomassa e lipídios que podem estar ligados à membrana (lipídios polares) ou de armazenamento (lipídios neutros) têm sido amplamente estudados. Pois, o desequilíbrio de nutrientes no meio de cultura é conhecido por provocar lipogênese em micro-organismos oleaginosas, a melhor condição de este fato acontecer é com a limitação de nitrogênio na presença de um excesso de fonte de carbono é convertida em ácidos graxos insaturados permitindo que o microrganismo continue se desenvolvendo [14, 27]. Trabalhos realizados em cultivo submerso têm o objetivo de aumentar a produção de lipídios e ácidos graxos insaturados sem que esta esteja diretamente relacionada com a produção de biomassa. Alguns estudos têm obtido importantes resultados, com valores aproximados do encontrado em óleos vegetais [28, 29].

Atualmente muitos estudos estão sendo desenvolvidos com utilização de glicerol residual do biodiesel para se encontrar uma melhor condição de produção de biomassa e lipídeos em altas proporções, mas devido aos custos de purificação, glicerol refinado não é viável para a cultura de micro-organismos oleaginosos, sendo utilizado o glicerol bruto (glicerina). No entanto, o glicerol puro está sendo usado para ativar a reprodutibilidade dos dados e composição do meio, porque a composição do glicerol bruto é muito variável, dependendo da matéria-prima, do tipo de catálise e as condições da reação de transesterificação [30,31].

Desta forma, aplicações biotecnológicas têm sido voltadas para o uso da glicerina obtida como subproduto do biodiesel [32]. Podendo ser utilizada como substrato para o crescimento de micro-organismos oleaginosos, que possuam pelo menos 20% do seu peso seco em lipídeos [9, 21, 22, 24].

A glicerina é o principal co-produto gerado da fabricação de biodiesel, onde em cada 9 Kg de biodiesel produzido é formado cerca de 1 Kg de glicerina. Este cenário indica que a viabilização comercial do biodiesel demanda um volume extra de glicerina, sendo necessária a busca de aplicações em larga escala, promovendo a agregação de valor à cadeia produtiva [9, 11].

O glicerol é um álcool tri-hídrico, isto é, 1,2,3-propanotriol, e um constituinte natural de lipídios animais e vegetais. Pode ser aplicada em indústrias como a de alimentos e bebidas, pasta de dente, cosméticos, produtos de higiene pessoal, plástico, tabaco, celulose e papel, tinta, couro e têxtil, farmacêutica, e automotivo. Recentemente, está sendo estudado como potencial substituto para os açúcares de carboidratos em processos de fermentações industriais para obter uma gama de produtos orgânicos com

valor agregado [16]. Além disso, é considerada uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica. Muitos estudos apontam para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis a partir mecanismos de assimilação de glicerol por micro-organismos. Dessa forma, a bioconversão do glicerol adiciona um valor significativo à produtividade da indústria do biodiesel, diminuindo significativamente o custo de produção [33, 34, 23, 8, 10, 12; 13].

O excesso de glicerol bruto (glicerina) deu origem a uma queda mais de 10 vezes no preço do glicerol industrial nos últimos anos resultando no desligamento de algumas indústrias de produção de glicerol. Além da queda no valor econômico / mercado de glicerol industrial, o superávit glicerol bruto apresenta outro desafio. Em primeiro lugar, ele não pode ser aplicado em qualquer processo industrial sem purificação. As impurezas são tão diversas contendo a matéria-prima e os catalisadores utilizados no processo de transesterificação, e exigem processos complexos e caros para remoção. Segundo, o glicerol bruto não pode ser disposto no meio ambiente sem tratamento, e o custo de tal tratamento pode ser proibitivo. Metanol, uma das impurezas no glicerol bruto, é conhecido por ser um álcool tóxico que pode afetar a flora microbiana se glicerol bruto for descartado no meio ambiente, até contaminando as águas subterrâneas. Os resíduos de hidróxido sódio ou potássio presentes no glicerol bruto elevam o pH, o que pode pôr em perigo a comunidade biótica se o glicerol bruto é descartado sem neutralização. Além disso, a ação de microrganismos selvagens libera odor ofensivo que polui o ambiente atmosférico. Portanto, o glicerol bruto deve ser tratado antes do descarte, um processo economicamente ineficiente e ineficaz para as indústrias de biodiesel. [35]

Por esses fatores, a produção de biodiesel não só tem sido desvantajoso para sua produção ser considerada de baixo custo, mas também é um obstáculo importante no desenvolvimento de novos combustíveis alternativos que podem ser adicionados ao limitado arsenal de biocombustíveis. Portanto, o atual interesse e valorização deste coproduto para biotransformação em produtos de alto valor agregado através de rotas microbiológicas ou químicas [36, 37, 38].

Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a produção de lipídeos e ácidos graxos pelo fungo *Mortierella isabellina* a partir do aproveitamento dos resíduos de glicerina do biodiesel e milhocina, proveniente do beneficiamento do milho, visando associar novas aplicações, assim como, novas alternativas para as vias que já estão estabelecidas em relação ao excedente de glicerina oriunda das usinas de produção do biodiesel na tentativa de valorização do co-produto.

2. Material e métodos

2.1. Micro-organismo

A linhagem utilizada neste estudo, *Mortierella isabellina* URM 3534, foi adquirida através do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, isolada da rizosfera *Vernoniae herbacea* e mantida na Coleção de Culturas (registrado no World Federation Culture Collection- WFCC, sob o número 604).

2.2. Produção de Biomassa

Para produção de biomassa fúngica, foi realizado um pré-inóculo numa concentração de esporos correspondente a 10^7 que foi plaqueado em forma de “tapete” em placas de Petri contendo meio de Cultura Batata Dextose Ágar, as placas foram incubadas a uma temperatura de 28°C por 72h. Após o período de incubação, foram retirados do pré-inóculo, 40 blocos da cultura em forma de discos medindo aproximadamente 90,00 mm de diâmetro, e foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 250mL do meio para o Cultivo Submerso do Micro-organismo. A composição de sais do meio foi descrito por [17] Kavadia et al., (2001), tendo como fontes de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e extrato de levedura a 0,5g\L. A esta composição foi adicionado diferentes substratos em diferentes concentrações (2, 4 e 8%): glicose, glicerol comercial P.A., glicerina residual do biodiesel e milhocina, corrigido para o pH 6,0.

Os fracos inoculados foram incubados sob agitação de 120 rpm e a 28°C por um período de 7 dias (168 horas). Após este período, a biomassa foi filtrada e liofilizada. A medida da biomassa de cada tratamento foi medida pela diferença dos pesos. O valor final das biomassas obtidas correspondeu à média aritmética de três réplicas. As biomassas foram submetidas aos estudos extração de lipídios e caracterização ésteres de ácidos graxos.

A glicerina utilizada foi proveniente da usina experimental de biodiesel do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), a qual foi gerada através da produção de biodiesel a partir de óleo de algodão e, foi adquirida após passar por um processo de evaporação do álcool metílico.

O resíduo de milhocina foi proveniente do beneficiamento do milho para ração animal e foi doada por uma empresa localizada em Vitória de Santo Antão – PE.

2.3. Produção de Lipídeos Totais

As biomassas obtidas através de crescimento submerso liofilizadas foram submetidas à extração de lipídios, utilizando a metodologia de [39], a qual é realizada em três tempos com 20 volumes de da mistura clorofórmio\metanol (2:1, 1:2, 2:1 v/v)

num sistema de homogeneizador. Os extratos combinados foram rota-evaporados e determinada produção de lipídeos por diferença de peso.

A produtividade de lipídios totais produzidos foi calculada através da diferença dos peso de lipídeos (g) por grama de biomassa (g) x 100 [10].

2.4. Caracterização dos Lipídios

Para a identificação dos ésteres de ácidos graxos do óleo produzido e extraído do micro-organismo, foi realizado o processo de transesterificação pelo método analítico descrito por [40] Hartman & Lago, (1973), considerado essencialmente quantitativo.

Os óleos extraídos das biomassas do micro-organismo cultivado nos meios de Cultivo Submerso suplementados de glicose, glicerol comercial P.A., glicerol do biodiesel e milhocina a uma concentração de 8%. As reações de transesterificação foram realizadas usando a mistura $H_2SO_4/NH_4Cl/CH_3OH$ como catalisador

Foram pesados de 0,5 mg de óleo, adicionou-se 5,0 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol e a mistura foi levada para aquecimento em refluxo por 5 minutos. Após foram adicionados 15,0 mL do reagente de esterificação (preparado a partir da mistura de 2,0 g de cloreto de amônio, 60,0 mL de metanol e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, aquecida por aproximadamente 15 minutos), a mistura foi aquecida em refluxo por mais 3 minutos e, em seguida, foi transferida para um funil de separação juntamente com 25,0 mL de n-hexano e 10 mL de água saturada com cloreto de sódio. Após agitar vigorosamente por alguns segundos, deixou-se em repouso para separação completa das duas fases. A fase inferior, composta por água, cloreto de sódio, excesso de álcool, glicerol e hidróxido de sódio foi removida e a fase superior foi lavada com outra porção de 10 mL de água saturada com cloreto de sódio. Finalmente, o material (mistura de ésteres metílicos dos ácidos graxos constituintes da amostra) foi transferido para um recipiente âmbar, ao qual foi adicionado sulfato de sódio anidro para remoção de toda umidade. Os ésteres metílicos (biodiesel) foram conservados sob refrigeração ($T \leq 10^\circ C$) até a realização da análise cromatográfica.

A análise dos ácidos graxos foi efetuada por cromatografia em fase gasosa no Laboratório de Química Industrial do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco. Foi utilizado um cromatógrafo a gás Varian, modelo CP 3380A, equipado com detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% de difenil e 95% de dimetilpolisiloxano), 30m x 0,25mm. A temperatura do forno da coluna apresentou a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 150°C por 4 min; aumentando numa razão de 4°C min⁻¹ até se chegar a 250°C, assim permanecendo por 20 min. As temperaturas do detector e do injetor serão de 280°C, tendo hélio (1cm³min⁻¹) como gás de arraste.

Os ésteres metílicos foram identificados pela comparação com tempos de retenção em comparação aos padrões (Sigma Aldrich) e quantificados por normalização de áreas por meio do *software* do equipamento.

3. Resultados e Discussões

3.1. Produção de Biomassa e lipídeos totais

Os resultados obtidos para produção de biomassa constataram que o maior crescimento foi para o cultivo com glicerina do biodiesel numa concentração de 8% (20.4g/L), enquanto para mesma proporção de glicerol comercial P.A. a produção foi de 16.2g/L, o que pode ter sido favorecido pela presença de ácidos graxos livres presentes na glicerina do biodiesel. Além disso, foi observado que o microrganismo apresentou maior produção de biomassa a uma concentração de substratos a 8%, sendo que no meio suplementado com glicose a taxa de crescimento foi menor, em relação aos outros substratos estudados (Tabela 1).

Em contradição a Papanikolaou et al., (2004) [41], relata em artigo científico que a *Mortierella sp.* apresentou crescimento celular significativo relacionado com a concentração de açúcar, este trabalho observou que o micro-organismo não obteve um crescimento diferenciado em relação às outras fontes de carbono.

Vale ressaltar que, para lidar com um reprodutível e meio cultural controlável, glicerol puro foi usado como controle, sem levar em conta qualquer efeito potencial das impurezas que ocorrem na glicerina do biodiesel. Estes níveis de impurezas são conhecidos por afetar negativamente ou inibir o crescimento microbiano [42]. No entanto, alguns fungos oleaginosos foram notificados por produzirem maior biomassa e/ou produção de lipídeos com o glicerol bruto, a partir da produção de biodiesel comparado com glicerol puro [43, 44]. O fato é que quantidades de glicerol bruto resultam em menor estresse osmótico em comparação com glicerol puro e apresentam nutrientes (sais) que podem melhorar a produção de biomassa ou podem ser utilizados para a produção de lipídeos (por exemplo, ácidos graxos livres) [25]. Entre outras impurezas, sal inorgânico, glicerídeos, e sabões afetam positivamente a produção biomassa e lipídeos, enquanto que os ésteres metílicos não exercem qualquer inibição [29, 45]. Portanto, neste trabalho o fungo se adaptou satisfatoriamente as propriedades da glicerol bruto (glicerina) em relação à produção de biomassa, sobressaindo-se aos outros substratos.

Quanto a produção de lipídeos a tabela 1 demonstra que a maior produção de lipídeos pelo micro-organismo se deu no cultivo com glicose a 4% e 8% (73%), onde anteriormente foi apresentado menor taxa de crescimento. Este fato também acontece com os outros substratos utilizados, onde o crescimento microbiano foi inversamente proporcional à produção de óleo. Utilizando os substratos de glicose e glicerol comercial como padrões, para avaliação de crescimento e produção de lipídeos, foram verificados

que para os resíduos de glicerina do biodiesel e milhocina as grandezas foram proporcionais aos resultados dos padrões.

Tabela 1: Produção de biomassa e lipídeos pelo fungo *Mortierella isabellina*, em diferentes concentrações de substratos.

	Biomassa (g/L)			Lipídeos (%)		
	2%	4%	8%	2%	4%	8%
Glicose	6.6 ± 0,12	10.6 ± 0,23	12,8 ± 0,21	55	73	73
Glicerol comercial	6.12 ± 0,25	8.0 ± 0,21	16.2 ± 0,42	50	63	61
P.A.						
Glicerina do biodiesel	6.8 ± 0,30	7.6 ± 0,10	20.4 ± 0,45	40	36	33
Milhocina	4.4 ± 0,08	6.4 ± 0,07	15.2 ± 0,57	46	33	33

Desta forma, a glicerina do biodiesel pode ser usada como um precursor da biossíntese de lipídeos ou outros produtos metabólitos secundários de alto valor agregado, como biossurfactantes. O fungo *M. isabellina* utilizou as vias lipogênicas para acumulação de lipídios em sua estrutura celular. Pesquisadores que estudaram a produção de ácidos graxos essenciais, verificaram que a glicose foi a melhor fonte de carbono para os fungos do gênero *Mortierella sp.* e *Mucor sp.*, além disso constataram que nem sempre a melhor fonte de carbono para a produção de biomassa, no entanto, é a melhor fonte de carbono para a produção de metabólitos como ácidos graxos por fungos filamentosos, o que se aplica neste trabalho [28].

Papanikolaou, et al., (2007) [45], em trabalhos científicos realizados com o fungo *Mortierella sp.* cultivado em diferentes substratos, como lactose, glicose, pectina e amido obteve a maior produção de 48% de lipídeos totais em cultivo com glicose.

Como em micro-organismos oleaginosos, a acumulação de lipídeos pode ser excitada por condições de limitação de nutrientes, geralmente nitrogênio e a geração de lipídeos iniciado quando a fonte de carbono é exaurida, [42] Papanikolaou *et al.* (2004) estudaram os padrões de biossíntese de reserva lipídica e degradação em dois fungos oleaginosos *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabellina* sob várias condições de crescimento e propôs que o modelo dos micro-organismos oleaginosos é utilizar seus lipídeos armazenados para a produção de biomassa.

Segundo relatos de muitos autores, [46, 16, 47, 48, 49], o cultivo em batelada de microrganismos oleaginosos é realizado com uma elevada relação C/N, onde o carbono em excesso é canalizado para acumulação de lipídeos e as condições de nitrogênio são limitantes. Tão longo quanto o nitrogênio não é limitante, a cultura continua na fase exponencial continuando a geração de biomassa. Após o esgotamento de nitrogênio, o crescimento da cultura quase pára e entra em fase de acumulação de lipídeos. Se o meio de cultivo possui carbono limitado ou quando o fornecimento de carbono extracelular fica exausto, os lipídios intracelulares armazenados podem ser mobilizados

e utilizados pelos micro-organismos para sustentar a geração e produção de biomassa, reduzindo a produção de lipídeos. Mas se o meio está equilibrado e/ou fornece a quantidade certa de carbono para satisfazer a necessidade de crescimento, um crescimento equilibrado ocorre sem qualquer acúmulo de lipídeos. Em alguns fungos oleaginosos, a presença de um grande excesso de carbono leva à produção de grandes quantidades de ácidos orgânicos, tais como o ácido pirúvico e diversos intermediários do ciclo de Krebs, à custa de acúmulo de lipídios. Por isso, neste trabalho foi observado que nos tratamentos com glicose e glicerol P.A. o micro-organismo apresentou um alto acúmulo de lipídeos em relação aos outros substratos.

A concentração de lipídeos acumuladas depende da concentração de biomassa constituída durante a fase de crescimento, que por sua vez depende da concentração inicial da fonte de carbono adicionada [47]. Mas uma alta concentração da fonte de carbono pode ser inibitória para a cultura. [46].

Embora a utilização de glicerol bruto (glicerina) no meio de fermentação sem purificação prévia, ofereça uma notável vantagem contra o uso tradicional de glicerol puro como substrato, poucos relatos têm aparecido na literatura sobre a utilização desse substrato como única fonte de carbono [21].

3.2. Composição dos Lipídios

Para avaliar o potencial uso do fungo estudado como matéria-prima do biodiesel, sua composição em ácidos graxos foi determinada nos tratamentos em concentração de 8%, escolhido porque obtiveram uma maior produção de biomassa. As análises de ácidos graxos metílicos (FAMES) indicaram que o perfil de ácidos graxos foi similar em todos os tratamentos estudados. Nos cultivos realizados em glicose e glicerol P.A. foi observado que o ácido graxo oleico (C18:1) e palmítico (C16:0) foram os dominantes, seguidos por linoleico (C18:2) enquanto que para os cultivos em resíduos o ácido linoleico (C18:2) estava presente em abundância, seguido pelo palmítico e oleico. Traços dos ácidos mirístico (C14:0), palmitoléico (C16:1), esteárico (C18:0) e γ - linolênico (C18:3) foram encontrados nas reservas lipídicas. Estes resultados são mostrados na Tabela 2. Similares resultados foram também observados em pesquisas realizadas por Ruan et al, (2012) [50]. O perfil completo dos ácidos graxos presente nos lipídios de fungos filamentosos tem potencial utilização para produção de biodiesel como tem sido documentado por óleos vegetais e fúngicos [5, 41].

A composição de ácidos graxos encontrada neste estudo pode ser considerada adequada para geração de biodiesel. Pois segundo [49], óleos com maior nível de ácidos graxos saturados do que ácidos graxos insaturados podem solidificar e entupir a tubulação de combustível em condições de inverno. Biodiesel que contém alto teor de ácidos graxos insaturados é menos viscoso e apresentam propriedades como maior fluidez e ponto de fulgor fazendo um combustível adequado para condições climáticas quentes e frias. Prevê-se que altos níveis de ácido oleico são os mais adequados para a produção de biodiesel. Os ácidos graxos poli-insaturados (por exemplo, C18: 2 e C18: 3) têm uma maior tendência para oxidação [51].

A composição de ácidos graxos identificados no óleo extraído da biomassa seca do fungo cultivado em glicose apresentou as seguintes proporções: mirístico (C14:0) – 1,7%, palmítico (C16:0) – 22,1%, C16:1 (palmitoléico) – 5,2%, C18:0 (esteárico) – 6,5%, oleico (C18:1)- 45,9%, linoleico (C18:2) – 12,8%, γ - linolênico (C18:3) – 5,7%. Como observado no glicerol comercial, a maior porcentagem encontrada foi para o ácido oleico.

Investigando a composição dos ácidos graxos presentes no óleo extraído da biomassa cultivada em glicerol comercial, foi verificada uma caracterização similar a anterior, apenas com o acréscimo de C16:1 (ácido palmitoléico) e C18:0 (ácido esteárico). Sendo que as concentrações encontradas foram: mirístico (C14:0) – 2,3%, palmítico (C16:0) – 33,9%, C16:1 (palmitoléico) – 7,8%, C18:0 (esteárico) – 2,9%, oleico (C18:1)- 38,8%, linoleico (C18:2) – 11,8%, γ - linolênico (C18:3) – 2,6%. Sendo o ácido oleico o mais abundante.

Na composição de ácidos graxos do óleo extraído da biomassa cultivada em glicerina residual do biodiesel foi verificada a presença dos seguintes ácidos graxos: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), oléico (C18:1), linoleico (C18:2), γ linolênico (C18:3), como as respectivas concentrações 0,7%, 20,3%, 17,3%, 60,1%, 1,6%. Sendo o maior pico do ácido linoleico, mesmo apresentado para o meio suplementado com milhocina.

A avaliação dos ácidos graxos presentes na biomassa cultivada com milhocina foi observada a presença de Ácido mirístico (C14:0), Ácido palmítico (C16:0), Ácido esteárico (C18:0), Ácido oléico (C18:1), Ácido linoléico (C18:2) e Ácido γ - linolênico (C18:3), respectivamente com as seguintes proporções 3,9; 26,9; 2,8; 29,2; 33,9; 3,3. Sendo a maior produção para ácido linoleico.

Tabela 2. Composição (%) de ácidos graxos do óleo extraído, proveniente da biomassa do fungo *Mortierella isabellina* cultivada em diferentes substratos.

Ácidos graxos	Glicose	Glicerol comerc. P.A.	Glicerina do biodiesel	Milhocina
Ácido mirístico (C14:0)	1,7	2,3	0,7	3,9
Ácido palmítico (C16:0)	22,1	33,9	20,3	26,9
Ácido palmitoléico (C16:1)	5,2	7,8	0,0	0,0
Ácido esteárico (C18:0)	6,5	2,9	0,0	2,8
Ácido oléico (C18:1)	45,9	38,8	17,3	29,2
Ácido linoléico (C18:2)	12,8	11,8	60,1	33,9
Ácido γ - linolênico (C18:3)	5,7	2,6	1,6	3,3

De acordo com os resultados apresentados, a composição dos ácidos graxos do fungo estudado *Mortierella isabellina* está condizente com as diferentes espécies de fungos da ordem a qual pertence, Mucorales, por exemplo, *M. circinelloides*, *C. echinulata*, *Z. moelleri*, *R.stolonifer*. O ácido oléico está no topo de produção pelas células, seguido pelo ácido palmítico e linoleico com quantidades significantes nas reservas de lipídeos das células fúngicas. Já os ácidos palmitoléico e esteárico foram encontrados em menores proporções [41].

Os resultados mostraram uma composição de ácidos graxos compatível com a literatura em comparação com outras espécies ou plantas oleaginosas, como relatado em estudos realizados [52; 53, 45; 47; 25; 54 apud 46] os perfis lipídicos obtidos em algumas estirpes são relativamente similares quanto ao tipo e composição para os óleos e gorduras a partir de plantas ou animais, mostrando-se potenciais candidatos para a produção de biodiesel. Os principais ácidos graxos presentes nas células dos microorganismos são: ácido oleico, ácido linoleico [55, 56], ácido palmitoléico, ácido araquidônico, ácido palmítico e ácido esteárico [41, 57, 58]. Estes ácidos graxos podem ser utilizados como suplemento nutricional para utilização médica e também podem ser utilizados para a produção de biodiesel. Por Exemplo, os ácidos graxos palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoléico (C18:2), linolênico (C18:3) as espécies de *Cunninghamella echinulata* obtiveram respectivamente a seguinte composição - 16-19%, ausência, 12-14%, 40-48%, 4%, 3%, enquanto a *M. isabellina* apresentou 20-27%, 1-4%, 2-6%, 44-54%, 4-18%, 3-8%, já no óleo de soja foi encontrado a seguinte composição: 7-14%, ausência, 1-6%, 19-30%, 44-62%, 4-11%.

4. Conclusões

O fungo *Mortierella isabellina* demonstrou um crescimento e produção de lipídeos satisfatórios em meios com fontes de carbono sintéticas e em meios com resíduos agroindustriais. Com a utilização do glicerol residual o fungo produziu uma melhor biomassa de aproximadamente 20,4g/L e produtividade de 33 - 40% de lipídeos totais. Mesmo a glicose sendo uma fonte de carbono pura e mais eficiente, é considerada custosa para produção de lipídeos microbianos. De acordo com a caracterização química da composição dos lipídeos, foi concluída que a produção de ácidos graxos pelo fungo foi equivalente a literatura, podendo ser considerada matéria-prima para produção de biodiesel cultivado em resíduos de baixo custo.

5. Referências

- [1] Liu, B., Sun Y.; Liu, Y.H., Zhao, Z.B. Progress on microbial glyceride biosynthesis and metabolic regulation in oleaginous microorganisms. *Acta Microbiol Sin* 2005;45:153–6.
- [2] LIANG, MH; JIANG, JG. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research*, 2013, 52(4):395-408. DOI: 10.1016/j.plipres.2013.05.002.
- [3] Xu, X.; Young, J.; Uk, H.; Rim, H. Moon, J. BIOCONVERSION OF VOLATILE FATTY ACIDS FROM MACROALGAE FERMENTATION INTO MICROBIAL LIPIDS BY OLEAGINOUS YEAST. *Chemical Engineering Journal*, 2015; 264, 735–743. DOI: 10.1016/j.cej.2014.12.011.
- [4] Li, Q.; DU, W.; LIU, D.H. PERSPECTIVES OF MICROBIAL OILS FOR BIODIESEL PRODUCTION. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL* 2008; 80:749–56. DOI: 10.1007/s00253-008-1625-9.
- [5] VICENTE, G.; BAUTISTA, L.F., RODRÍGUEZA, R.; GUTIÉRREZA, F. J.; SÁDABA, I.; RUIZ-VÁZQUEZB, R.M.; ET. AL. BIODIESEL PRODUCTION FROM BIOMASS OF AN OLEAGINOUS FUNGUS. *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 2009, v. 48, N. 1, P. 22-27. DOI: 10.1016/J.BEJ.2009.07.014.
- [6] Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advanced*, 2007, v. 25, p. 294–306. Doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.
- [7] Demain, A.L., Adrio, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*, *Molecular Biotechnology*, 2008, 38(1):41-55. 10.1007/s12033-007-0035-z.
- [8] Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energy*, 2009, v. 34, p. 1–5. doi:10.1016/j.renene.2008.04.014.
- [9] Silva, G. P.; Mack, M.; Contiero, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 2009, v.27, p. 30-39. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.006.
- [10] Xu, J.; Zhao, X.; Wang, W.; Du, W.; Liu, D. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochem. Eng. J.* 2012: 65, 15, 30–36. DOI: 10.1016/j.bej.2012.04.003.
- [11] Amaral, P.F.F.; Ferreira, T.F.; Fontes, G.C.; Coelho, M.A.Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing*, 2009, v. 87, p.179-186. DOI: 10.1016/j.fbp.2009.03.008.
- [12] Mota, C. J. A, Silva, C. X. , Gonçalves, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova*, 2009, v.32, p 36-57. doi.org/10.1590/S0100-40422009000300008.

- [13] Ratledge, C. & Wynn, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. 2002, Vol. 51, No. 1, pp. 1–44. doi: 10.1016/S0065-2164(02)51000-5.
- [14] Granger, L.M., Perlot, P., Goma, G., Pareilleux, A. Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: Prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method. *Journal of biochemical and microbiological technology and engineering*. 1993, Vol. 42, No. 10, pp. 1151-1156, ISSN 0006-3592.
- [15] Ratledge, C., Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*. 2004, Vol. 86, No. 11, pp. 807–815, ISSN 0300-9084. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.09.017.
- [16] Rossi, M.; Amaretti, A.; Raimondi, S.; Leonardi, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. In: *Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies*. 2011, Stoytcheva, M; Montero, G. editors, 71-92 p., 458 ps. DOI: 10.5772/1094.
- [17] Kavadia, A.; Komaitis, M.; Chevalot, I.; Blanchard, F.; Marc, I.; Aggelis, G. Lipid and γ -linolenic acid accumulation in strains of zygomycetes growing on glucose. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2001. Volume: 78, Ed: 4, p: 341-346. DOI: [10.1007/s11746-001-0266-3](https://doi.org/10.1007/s11746-001-0266-3).
- [18] MA Y.L. MICROBIAL OILS AND ITS RESEARCH ADVANCE. *CHIN. J. BIOPROCESS ENG.* 2006;4:7–11. ISSN: 1672-3678
- [19] Yi SJ, Zheng YP. Research and application of oleaginous microorganism. *China Foreign Energy* 2006;11:90–4. ISSN: 1673-579X
- [20] Certik, M.; Shimizu, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal Bioscience Bioengineering*, 1999, 87 (1), 1-14. DOI: 10.1016/S1389-1723(99)80001-2
- [21] PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICKA, M.L; CHEVALOTA, I.; GALIOTOU-PANAYOTOUB, M.; KOMAITISB, M.; MARCA, I.; AGGELIS, G. BIOTECHNOLOGICAL VALORISATION 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 AND BIOENERGY*, 2008, 32, 60 – 71. DOI: 10.1016/j.biombioe.2007.06.007.
- [22] Ledesma-Amaro, R.; Santos, M.A., Jiménez, A., Revuelta, J.L. Strain Design of *Ashbya gossypii* for Single-Cell Oil Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, V. 80, N. 4, p. 1237–1244. doi:10.1128/AEM.03560-13.
- [23] XUE, F.Y.; ZHANG, X.; TAN, T.W. RESEARCH ADVANCE AND PROSPECT IN MICROBIAL OILS. *CHINESE JOURNAL OF BIOPROCESS ENGINEERING*, 2005; 3:23–7.
- [24] DA SILVA GP, MACK M, CONTIERO J. GLYCEROL: A PROMISING AND ABUNDANT CARBON SOURCE FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY. *BIOTECHNOL ADV* 2009, 27:30–39. DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2008.07.006.

- [25] Easterling, E.R.; French, W.T.; Hernandez, R.; Licha, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, 2009, v. 100, p. 356–361. doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.030.
- [26] KITCHA S, CHEIRSILP B: ENHANCING LIPID PRODUCTION FROM CRUDE GLYCEROL BY NEWLY ISOLATED OLEAGINOUS YEASTS: STRAIN SELECTION, PROCESS OPTIMIZATION, AND FED-BATCH STRATEGY. *BIOENERGY RES* 2013, 6:300–310.
- [27] AGEITOS J, VALLEJO J, VEIGA-CRESPO P, VILLA T. OILY YEASTS AS OLEAGINOUS CELL FACTORIES. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL* 2011, 90:1219–1227. DOI: 10.1007/S00253-011-3200-Z.
- [28] Tauk-Tornisielo, S.M.; Arasato, L.S.; Almeida, A. F.; Govone, J.S.; Malagutti, E. N. Lipid formation and γ -linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus* sp., grown on vegetable oil. *Braz. J. Microbiol.*, 2009, vol.40, no.2. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822009000200025>.
- [29] RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; LEONARDI, A.; BIANCHI, M. M.; RINALDI, T.; AMARETTI, A. GETTING LIPIDS FROM GLYCEROL: NEW PERSPECTIVES ON BIOTECHNOLOGICAL EXPLOITATION OF *CANDIDA FREYSCHUSSII*. *MICROBIAL CELL FACTORIES* 2014, 13:83. DOI:10.1186/1475-2859-13-83.
- [30] CHATZIFRAGKOU A, PAPANIKOLAOU S: EFFECT OF IMPURITIES IN BIODIESEL-DERIVED WASTE GLYCEROL ON THE PERFORMANCE AND FEASIBILITY OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL* 2012, 95:13–27. DOI: 10.1007/s00253-012-4111-3.
- [31] NICOL, R.W., MARCHAND, K., LUBITZ, W.D. BIOCONVERSION OF CRUDE GLYCEROL BY FUNGI. *APPL MICROBIOL BIOTECHNOL* 2012, 93:1865–1875. DOI: 10.1007/s00253-012-3921-7.
- [32] IMANDI, S.B.; BANDARU, V.V. R.; SOMALANKA, S.R.; GARAPATI, H. R. OPTIMIZATION OF MEDIUM CONSTITUENTS FOR THE PRODUCTION OF CITRIC ACID FROM BYPRODUCT GLYCEROL USING DOEHLERT EXPERIMENTAL DESIGN. *ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY*, 2007, VOL. 40, NO. 5, P. 1367-1372. DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2006.10.012.
- [33] Papanikolaou, S.; Muniglia, S.; Chevalot, L.; Aggelis, I.; Marc, G. I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, v. 92, p. 737–744. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01577.x.
- [34] ITO, T., Nakashimada, Y.; Senba, K.; Matsui, T.; Nishio, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, v. 100, p. 260– 265. DOI: 10.1263/jbb.100.260.
- [35] NWACHUKWU, R.E.S.; SHAHBAZI, A.; WANG, L.; WORKU, M.; IBRAHIM, S.; SCHIMMEL, K. OPTIMIZATION OF CULTURAL CONDITIONS FOR CONVERSION OF GLYCEROL TO ETHANOL BY *ENTEROBACTER AEROGENES* S012. *AMB EXPRESS* 2013, 3:12. DOI: 10.1186/2191-0855-3-12.

- [36] JOHNSON, D.T.; TACONI, K.A. THE GLYCERIN GLUT: OPTIONS FOR THE VALUE ADDED CONVERSION OF CRUDE GLYCEROL RESULTING FROM THE BIODIESEL PRODUCTION. ENVIRON. PROG. 2007, 26, 338–348. DOI: 10.1002/EP.10225.
- [37] PAPANIKOLAOU, S. MICROBIAL CONVERSION OF GLYCEROL INTO 1,3-PROPANEDIOL: GLYCEROL ASSIMILATION, BIOCHEMICAL EVENTS RELATED WITH 1,3-PROPANEDIOL BIOSYNTHESIS AND BIOCHEMICAL ENGINEERING OF THE PROCESS. IN AGGELIS, G., ED., MICROBIAL CONVERSIONS OF RAW GLYCEROL, NOVA SCIENCE PUBLISHERS INC, 2009: P. 137–168.
- [38] ANAND, P.; SAXENA, R.K. A COMPARATIVE STUDY OF SOLVENT-ASSISTED PRETREATMENT OF BIODIESEL DERIVED CRUDE GLYCEROL ON GROWTH AND 1,3-PROPANEDIOL PRODUCTION FROM CITROBACTER FREUNDII. NEW BIOTECHNOLOGY, 2012, V. 29, N. 2. DOI: 10.1016/J.NBT.2011.05.010.
- [39] Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal Biological Chemistry, 1957, 226, p. 497-509. PMID: 13428781.
- [40] Hartmann, L.; Lago, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Laboratory Practices, 1973: 22: 475-477. PMID: 4727126.
- [41] Papanikolaou, S.; Komaitis, M.; Aggelis, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. Bioresource Technology, 2004, Essex, 95 (3), 287-291. ISSN: 0960-8524.
- [42] Samul D, Leja K, Grajek W: Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. Ann Microbiol 2013, in press, doi:10.1007/s13213-013-0767-x.
- [43] Marchand, K.; Lubitz, W.D.; Nicol, R.W. Utilization of biodiesel derived crude glycerol by fungal isolates for biomass and single cell oil production. J Biobased Mater Bio 2013, 7:415–419. DOI: <http://dx.doi.org/10.1166/jbmb.2013.1367>.
- [44] Xu, J.; Zhao, X.; Wang, W.; Du, W.; Liu, D. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. Biochem Eng J 2012, 65:30–36. DOI: 10.1016/j.bej.2012.04.003.
- [45] Papanikolaou, S.; Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S.; Aggelis, G. Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. Eur J Lipid Sci Technol. 2007; 109: 1060-1070. DOI: 10.1002/ejlt.200700169.
- [46] CHRISTOPHE, G.; KUMAR, V.; NOUAILLE, R.; GAUDET, G.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Recent Developments in Microbial Oils Production: a Possible Alternative to Vegetable Oils for Biodiesel Without Competition with Human Food? Brazilian Archives of Biology and Technology, 2012, Vol.55, n. 1: pp. 29-46, Doi: 10.1590/S1516-89132012000100004.

- [47] Beopoulos, A., Chardot, T., & Nicaud, J.M. *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie.*, 2009, Vol. 91, No. 6, pp. 692-696, ISSN 0300-9084.
- [48] Wynn J.P., Hamid A.A., Ratledge C. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. *Microbiology*. 1999; 145: 1911-1917. PMID: 10463157
- [49] Nigam P. Production of oils and fatty acids. In: Robinson CA Batt PD editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*, vol 2. Academic Press. 2000. 718-729.
- [50] Ruan, Z.; Zanotti, M.; Wang, X.; Ducey, C.; Liu, Y. Evaluation of lipid accumulation from lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 2012, 110, 198–205. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.053.
- [51] Bharti, R. K., Srivastava, S., Thakur, I. S. Extraction of extracellular lipids from chemoautotrophic bacteria *Serratia sp.* ISTD04 for production of biodiesel *Bioresour Technol.* 2014 Aug;165:201-4. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.075.
- [52] Zhu, M.; Zhou, P.P.; Yu, L.J. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. *Bioresource Technol.* 2002; 84: 93-95. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00028-7.
- [53] Li Y, Zhao Z.K.; Bai F. High density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fedbatch culture. *Enzyme Microb Technol.* 2007; 41: 312- 317. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.02.008.
- [54] Feofilova, E.P., Sergeeva, Y.E., Ivashechki, A.A. Biodieselfuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology (Review). *Appl Biochem Microbiol.* 2010; 46(4): 369-378. DOI: 10.1134/S0003683810040010.
- [55] Chen, H.C.; Chang, C.C. Production of γ -linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnol Prog.* 1996; 12: 338-341. DOI: 10.1021/bp960009y.
- [56] Chen, HC, Liu TM. Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Enzyme Microb Technol.* 1997; 21: 137-142. DOI: 10.1016/S0141-0229(96)00262-1.
- [57]. PENG X, CHEN, H. RAPID ESTIMATION OF SINGLE CELL OIL CONTENT OF SOLID-STATE FERMENTED MASS USING NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY. *BIORESOURCE BIORESOUR TECHNOL.* 2008; 99(18):8869-72. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2008.04.055.
- [58] Angerbauer, C.; Siebenhofer, M.; Mittelbach, M.; Guebitz, G.M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technol.* 2008; 99(8): 3051-3056. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.06.045.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O fungo *Mortierella isabellina* cultivado em meio suplementado com glicerol residual e milhocina, demonstrou um comportamento semelhante aos cultivos em meios de composição definida;
- As análises ultra-estruturais e citoquímicas revelaram a presença de corpos lipídicos no fungo, confirmando a formação e acumulação de lipídeos em meios suplementados com glicerol residual e milhocina, indicando que *M. isabellina* é um fungo com elevado potencial biotecnológico e promissor na produção de lipídeos;
- A associação de glicerol residual com milhocina forneceu um balanço equilibrado para crescimento e acumulação de lipídeos pelo fungo *M. Isabellina*,
- no ensaio com a concentração mais elevada de glicerol residual (8%) e menor concentração de milhocina (2%), enquanto na produção de lipídeos o rendimento foi de 75,2%.
- A utilização de glicerol residual como fonte de carbono foi determinante para o perfil dos ácidos graxos produzidos pelo fungo, o que possibilitou uma composição química equivalente às matérias-primas vegetais do biodiesel;
- O fungo *Mortierella isabellina* demonstrou um crescimento e produção de lipídeos satisfatórios cultivado em meios alternativos com uma produtividade lipídica superior às sementes oleaginosas;
- A valorização de resíduos agro-industriais por meio de fermentação microbiana com o fungo *Mortierella isabellina* para a produção de SCO é uma perspectiva realista e otimista para a realidade brasileira;
- O fungo *M. isabellina* cultivado em resíduos agroindustriais de baixo custo, pode ser considerado matéria-prima para produção de biodiesel.