



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO -
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

Adriana Ferreira de Souza

PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POLI-INSATURADOS E QUITOSANA POR
***Lichtheimia hyalospora* E *Mucor subtilissimus* COM POTENCIAL DE**
APLICAÇÃO COMO NUTRACÊUTICOS

Recife

2019

**PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POLI-INSATURADOS E QUITOSANA POR
Lichtheimia hyalospora E *Mucor subtilissimus* COM POTENCIAL DE
APLICAÇÃO COMO NUTRACÊUTICOS**

Adriana Ferreira de Souza

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordestina de Biotecnologia - RENORBIO como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais

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

Recife

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Adriana
Ferreirap Souza, Adriana Ferreira de
PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS POLI-INSATURADOS E QUITOSANA POR Lichtheimia hyalospora E
Mucor subtilissimus COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO COMO NUTRACÊUTICOS / Adriana Ferreira de
Souza. - 2019.
149 f. : il.

Orientadora: Galba Maria de Campos Campos-Takaki.
Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em
Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2019.

1. Mucorales. 2. Fungos. 3. Biomoléculas. 4. Ácidos graxos. I. Campos-Takaki, Galba Maria de Campos,
orient. II. Título

CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:

ADRIANA FERREIRA DE SOUZA

Produção de lipídeos poli-insaturados e quitosana por *Lichtheimia hyalospora* e *Mucor subtilissimus* com potencial de aplicação como nutracêuticos

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 25 de outubro de 2019

Banca examinadora

Orientadora:

Profa. Dr^a. Galba Maria de Campos-Takaki
Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

Examinadores:

Profa. Dr^a Ana Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Profa. Dr^a Cristina Maria Souza-Motta
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

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

Profa. Dr^a. Juliana Moura de Luna
Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

*Dedico esta tese
ao que tenho de mais valioso nesta Terra:
Minha Família.*

*“Jamais considere seus estudos como uma obrigação,
mas como uma oportunidade invejável para aprender
a conhecer a influência libertadora da beleza
do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal
e para proveito da comunidade à qual seu futuro
trabalho pertencer.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente a Deus pela saúde, sabedoria e discernimento concedido.

A minha orientadora Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, pela sabedoria paciência, exigências com a organização e execução dos experimentos e oportunidades a mim concedidas.

A Minha Co-orientadora Norma Buarque Gusmão, pela ajuda imprescindível para a construção deste trabalho de forma profissional.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia (UFRPE), Biologia de Fungos (UFPE) e Ciências Biológicas (UFPE) pelo companheirismo e apoio, em especial, Hugo Marques Galindo, Nathália Alencar, Nadyely Regina, Daniele Souza, Davi Cavalcanti e Daylin Rubio. E aos amigos Manuela Cristina Mota Lins, Rosileide Andrade Fontenelle, Dayana Montero e Marcos Antônio Cavalcanti Luna pela força e auxílio indispensável, além de contribuírem com palavras de conforto durante o curso.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, pelo acesso aos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), pela oportunidade e uso da infra-estrutura para a realização dos experimentos.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa e fomento à pesquisa, à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento para realização deste trabalho.

A todos direta e indiretamente, meu muito obrigada!

RESUMO

Fungos da ordem Mucorales são reconhecidos por serem oleaginosos e por produzirem naturalmente quitosana em sua parede celular, sendo fontes promissoras para a demanda na indústria alimentícia e de nutrição. O objetivo deste estudo foi investigar a produção de lipídeos e quitosana por *Mucor subtilissimus* UCP1262 e *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 de forma sustentável e econômica. Inicialmente, amostras de solo foram coletadas da Caatinga e submetidas a diluições seriadas e semeadas em meio Sabouraud com cloranfenicol. As colônias de interesse foram isoladas e identificadas por observações macroscópicas e microscópicas. A produção de biomassas fúngicas foram através do cultivo em meios alternativos enriquecidos com milhocina (como fonte de nitrogênio) e suplementados manipueira e glicerol bruto (como fontes de carbono). A extração de lipídeos e quitosana foram realizadas de forma concomitante com a utilização de solventes orgânicos e tratamento alcali-ácido, respectivamente. O grau de desacetilação das quitosanas foi analisado por espectroscopia na região do infravermelho e o perfil de ácidos graxos dos lipídeos foi analisado por cromatografia gasosa. Com a *L. hyalospora* UCP 1266 foi obtido o maior rendimento de biomassa (15,5 g/L) com as maiores concentrações dos resíduos agroindustriais (8% milhocina/8% glicerol bruto), assim como maior acúmulo de lipídeos (82%). Quanto ao perfil de ácidos graxos produzidos por *L. hyalospora* UCP1266, o ácido α -linolênico (ω 3) foi o ácido graxo poli-insaturado mais representativo (17,9%). Quando cultivados em manipueira (4%) e milhocina (6%), o maior rendimento de biomassa obtidos por *M. subtilissimus* UCP 1262 e *L. hyalospora* UCP 1266 foram de 4,832 g/L e 6,540 g/L, respectivamente, assim como a maior produção de quitosana (32,471mg/g) por *M. subtilissimus* UCP1262. No entanto, o maior rendimento de quitosana (45,03mg/g) obtido por *L. hyalospora* UCP1266 foi obtido no ponto central do planejamento (4% de milhocina,6% de manipueira). As quitosanas produzidas por *M.subtilissimus* UCP1262 e *L. hyalospora* UCP1266 cultivadas em manipueira apresentaram 80,28 e 83,61% de grau de desacetilação e viscosidade de 2,78 e 3,06 cP, respectivamente. Logo, *L. hyalospora* UCP1266 foi selecionada para inclusão em experimentos utilizando ensaios DCCR 2², pois exibia a maior produção de quitosana em meios contendo a manipueira e milhocina. A maior produção de quitosana (63,18mg/g) foi obtida quando *L.hyalospora* UCP1266 foi cultivada em meio contendo 8,82% de milhocina e 7% de manipueira. O meio com glicerol (5%) e milhocina (5%) favoreceram a produção de biomassa (13,25 g/L), quitosana (44,89mg/g) e lipídeos(44,27%) por *M. subtilissimus* UCP1262. A quitosana obtida nessa condição apresentou um grau de desacetilação de 80,25% e viscosidade de 2,2 cP. Os resultados obtidos demonstram que os microrganismos são capazes de metabolizar substratos alternativos e de produzir em biomoléculas bioativas que podem vir complementar a necessidade de produtos inovadores como nutracêuticos por serem recursos naturais e de baixa toxicidade.

Palavras chaves: Mucorales; Fungos;Biomoléculas; Ácidos Graxos.

ABSTRACT

Fungi belonging Mucorales order are known to be oleaginous microorganisms and naturally produce chitosan in their cell wall, being considered as promising sources for demand in the food and nutrition industry. The aim of this study was to investigate the production of lipids and chitosan by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 and *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 in a sustainable and economical way. Initially, soil samples were collected from Caatinga, submitted to serial dilutions and subcultured in Sabouraud medium containing chloramphenicol. The colonies of interest were isolated and identified by macroscopic and microscopic observations. Production of fungal biomass was through cultivation in alternative media enriched with corn steep liquor (CSL), as a nitrogen source, and supplemented with cassava wastewater (CWW) or crude glycerol (CG) as carbon sources. Lipids and chitosan extraction were performed concurrently with the use of organic solvents and alkali acid treatment, respectively. The degree of chitosan deacetylation was analyzed by infrared spectroscopy and the lipid fatty acid profile was analyzed by gas chromatography. *L. hyalospora* UCP 1266 obtained the highest biomass yield (15.5 g/L) with the highest concentrations of agro-industrial residues (8% CSL and 8% CG), as well as the highest lipid accumulation (82%). Regarding the profile of fatty acids produced by *L. hyalospora* UCP 1266, α -linolenic acid (omega 3) was the most representative polyunsaturated fatty acid (17.9%). In the cultivation using CWW (4%) and CSL (6%), the highest biomass yields by *M. subtilissimus* UCP 1262 and *L. hyalospora* UCP 1266 were 4.832 g/L and 6.540 g/L, respectively, as well as the highest chitosan yield (32.471 mg/g) by *M. subtilissimus* UCP 1262. However, the highest chitosan yield (45.03 mg/g) obtained by *L. hyalospora* UCP 1266 was obtained at the central point of the factorial design (4% CSL and 6% CWW). Chitosans produced by *M. subtilissimus* UCP 1262 and *L. hyalospora* UCP 1266 cultivated in CWW presented 80.28 and 83.61% of deacetylation degree and viscosity of 2.78 and 3.06 cP, respectively. Therefore, *L. hyalospora* UCP 1266 was selected for a 2² Central Composite Rotational Design (CCRD), as it exhibited the highest chitosan production in media containing CWW and CSL. The highest chitosan production (63.18 mg/g) was obtained when *L. hyalospora* UCP 1266 was cultivated in medium containing 8.82% of CSL and 7% of CWW. The medium with CG (5%) and CSL (5%) favored the production of biomass (13.25 g/L), chitosan (44.89 mg/g) and lipids (44.27%) by *M. subtilissimus* UCP 1262. Chitosan obtained under this condition had deacetylation degree of 80.25% and viscosity of 2.2 cP. The results show that microorganisms are able to metabolize alternative substrates and produce bioactive biomolecules that may complement the need for innovative products as nutraceuticals because they are natural resources with low toxicity.

Keywords: Mucorales, Fungi; Biomolecules; Fatty acids.

LISTA DE FIGURA

Capítulo I

Figura 1 <i>Mucor subtilissimus</i> Oudem. Esporângios.....	28
Figura 2 <i>Mucor subtilissimus</i> Oudem. Hifas em forma de correntes artrospóricas e células leveduriformes.	29
Figura 3 <i>Lichtheimia hyalospora</i> Kerst.Holffm.,Walther & Voigt Esporângio multiesporado e columela cônica.....	30
Figura 4. Produção de biomassa oleaginosa em escassez de nitrogênio.	34
Figura 5. Biossíntese lipídica devido excesso de citrato como uma consequência da limitação de nitrogênio.	35
Figura 6. Estrutura química da quitosana.....	40
Figura 7. Biossíntese de quitina em fungo por quitina sintase, produção de quitosana através da fusão de quitossomas com membrana plasmática numa forma dispersa e subsequente desacetilação de quitina pela quitina desacetilase na parede celular. Própria autoria.	43
Figura 8. Esquema da produção de lipídeos a partir do glicerol.....	51

Capítulo II

Figure 1. <i>Lichtheimia hyalospora</i> UCP 1266. (A) Colony surfasse (25°C) ; (B) Colony surfasse (37°C);(C) Sporophores, columella and sporangia; (D) Simple sporangiophore and terminated in sporangia with prominent dome-shaped apophysis (arrow); (E) Circinate sporangiophore; (F) Columella with a apical projection (arrow); (G) Giant cells with finger-like; (H) Rhizoids;(I) Sporangiospores. Bars: C, E, H = 50 µm; D= 30 µm; F = 20 µm; G= 100 µm; I =10 µm	78
Figure 2. Cytochemistry staining of cells of <i>Lichtheimia hyalospora</i> UCP 1266 by Sudan Black method. (A) Synthetic Medium for Mucorales (SMM)[34]. (B) Assay 4 of 2 ² factorial design	80
Figure 3. Pareto chart for 2 ² factorial design of culture, where (1) corn steep liquor and (2) glycerol are the independent variables and lipids is the response variable. The point at which the estimates of the effect were statistically significant (p = 0.05) is indicated by the dotted red.....	80
Figure 4. Scanning electron micrograph of mycelium of <i>Lichtheimia hyalospora</i> UCP 1266. (a) mycelium after culture in assay 4 of the factorial design (glycerol 8% and corn steep liquor 8%) and (b) mycelium after culture synthetic medium for Mucorales (SMM)[34].....	81

Capítulo III

- Figure 1.** Scanning electron micrograph of mycelium of *Mucor subtilissimus* UCP 1262 and *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266. (a) *Mucor subtilissimus* after culture in assay 2 of the factorial design (CSL 6% and CWW 4%) and (b) *L. hyalospora* after culture in assay central point of the factorial design (CSL 4% and 6% CWW). 104
- Figure 2.** Pareto chart of standardized effects of CSL (1) and CWW (2) on the biomass production by *M. subtilissimus* UCP 1262 (A) e *L. hyalospora* UCP 1266 (B). 106
- Figure 3.** Pareto chart of standardized effects of CSL (1) and CWW (2) on the chitosan production by *M. subtilissimus* UCP 1262 (A) e *L. hyalospora* UCP 1266 (B). 107
- Figure 4.** Infrared spectra of chitosan produced by *M. subtilissimus* UCP 1262 (—) and *L. hyalospora* UCP 1266 (___) 108
- Figure 5.** Response surface graphs of the chitosan production by *L. hyalospora* grown in medium formulated with CSL and CWW for 120 h at 28 °C. 110

Capítulo IV

- Figura 1. Coloração citoquímica de hifas de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 pelo método do Sudan Black. Condição do ponto central do planejamento fatorial 2^2 : (A) 0 e (B) 24 h com baixo acúmulo de lipídeos; (C) 48 h e (D) 72 h de acúmulo relevante de lipídeos; e (E) 96h e (F)120h com maiores acúmulos de lipídeos. (G) presença de corpos lipídicos sem adição de corante Sudan Black. 127
- Figura 2. Gráfico Pareto referente à produção de biomassa de *M. subtilissimus* utilizando milhoцина (1) e glicerol bruto (2) como substratos. 128
- Figura 3. Gráfico Pareto referente ao acúmulo de lipídeos de *M. subtilissimus* utilizando milhoцина (1) e glicerol bruto (2) como substratos. 129
- Figura 4. Quadrado referente aos efeitos médios da interação das duas vias de interação (milhocina e glicerol bruto) no acúmulo de lipídeos. 130
- Figura 5. Gráfico Pareto referente a produção de quitosana por *Mucor subtilissimus* em milhoцина e glicerol bruto 131
- Figura 6. Quadrado plotado referente aos efeitos médios da interação das duas vias de interação na produção de quitosana. 132
- Figura 7. Espectro de infravermelho de quitosana produzido por *M. subtilissimus* em milhoцина e glicerol bruto 135

LISTA DE TABELA

Capítulo I

Tabela 1. Vantagens da quitosana fúngica em comparação a outras fontes de produção 22

Tabela 2 Produção de biomassa, teor de lipídeos totais e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) de táxons de Mucorales cultivados em diferentes substratos. 38

Capítulo II

Table 1. Production of biomass and total lipids by *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 according to 2^2 factorial design using corn steep liquor (CSL) and crude glycerol (CG) during 120h 79

Table 2 . Fatty acid profile of total lipids from biomass of *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 cultured in crude glycerol added corn steep liquor by 120h and cultivated in synthetic medium for Mucorales (SMM)[34] by 120h. 82

Table 3. Comparison the Mucorales fungi in different substrates for lipids and fatty acids (SAT, MUFA, and PUFA) product by literature with *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 85

Capítulo III

Table 1. Variables and levels used in the 2^2 full-factorial design. 99

Table 2. Morphological aspects of *Mucor subtilissimus* UCP 1262 cultivated in different concentrations of CSL and CWW according to 2^2 factorial design during 120 h. * Assay 1: 2% CSL and 4% CWW; Assay 2: 6% CSL and 4% CWW; Assay 3: 2% CSL and 8% CWW; Assay 4: 6% CSL and 8% CWW; Central point: 4% CSL and 6% CWW. Bars: 10 μ m 100

Table 3. Morphological aspects of *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 cultivated in different concentrations of CSL and CWW according to the 2^2 factorial design during 120 h. * Assay 1: 2% CSL and 4% CWW; Assay 2: 6% CSL and 4% CWW; Assay 3: 2% CSL and 8% CWW; Assay 4: 6% CSL and 8% CWW; Central point: 4% CSL and 6% CWW. Bars: 10 μ m 101

Table 4. Factorial design applied to production of biomass and chitosan by *Mucor subtilissimus* and *L. hyalospora* UCP 1266 using CSL and CWW as alternative substrates. 103

Table 5. Biomass and chitosan production by <i>M. subtilissimus</i> UCP 1262 and <i>L. hyalospora</i> UCP 1266 cultivated in agro-industrial medium compared with the results obtained in the literature by other Mucoralean fungi.....	105
Table 6. Characterization of chitosan samples produced by <i>M. subtilissimus</i> UCP 1262 and <i>L. hyalospora</i> UCP 1266 in CWW and CSL.....	108
Table 7. Central composite rotatable design applied to the production of biomass and chitosan by <i>L. hyalospora</i> UCP 1266 using CSL and CWW as alternatives substrates...	109

Capítulo IV

Tabela 1. Matriz para o planejamento fatorial utilizado para avaliar a influência dos dois resíduos agroindustriais na produção de lipídios por <i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262. ...	122
Tabela 2. Planejamento fatorial 2 ² aplicado à produção de biomassa, lipídeos e quitosana por <i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262 utilizando glicerol bruto e milhocina como substratos alternativos.bruto	126
Tabela 3. Produção de lipídeos por fungos filamentosos e leveduras cultivadas em glicerol bruto como fonte de carbono	133
Tabela 4. Caracterização da quitosana produzida por <i>M. subtilissimus</i> UCP 1262.....	134
Tabela 5. Viscosidade da quitosana produzida por diferentes fungos	135

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURA	iv
LISTA DE TABELA.....	vi
Capítulo I.....	11
(Revisão de Literatura)	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.1.1. Objetivos Específicos.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1. PERSPECTIVAS DE QUITOSANA E ÁCIDOS GRAXOS MICROBIANOS COMO NUTRACÊUTICOS.....	16
3.1.1. Quitosana.....	16
3.1.1.1. Propriedades Nutracêuticas	16
3.1.1.2. Atividade antioxidante	17
3.1.1.3. Redução do Peso Corporal	18
3.1.1.4. Anti-hiperlipidêmico.....	19
3.1.1.5. Mercado Global.....	19
3.1.1.6. Quitosana Microbiana como nutracêutico	20
3.1.2. Ácidos graxos.....	22
3.1.2.1. Propriedades Nutracêuticas	23
3.1.2.2. Mercado Global.....	24
3.1.2.3. <i>Single Cell Oil</i> como nutracêuticos.....	25

3.2	MUCORALES SCHRÖTER.....	26
3.2.1	Gênero <i>Mucor</i> Fresen.....	27
3.2.2	Gênero <i>Lichtheimia</i> Vuill.....	29
3.3	FUNGOS OLEAGINOSOS.....	31
3.3.1	Biossíntese de lipídeos em microrganismos oleaginosos	33
3.3.2	Cultivo de Mucorales para produção de lipídeos.....	36
3.4	QUITOSANA FÚNGICA	39
3.4.1	Biossíntese da parede celular em fungos zigospóricos.....	40
3.4.2	Cultivo de Mucorales para produção de Quitosana.....	43
3.5	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	46
3.5.1	Manipueira.....	47
3.5.2	Milhocina	48
3.5.3	Glicerol residual do biodiesel.....	50
4.	REFERÊNCIAS	53
	Capítulo II	73
	(Primeiro artigo)	73
	Produção Ecológica de Ácidos Graxos Nutracêuticos pelo Fungo Oleaginoso <i>Lichtheimia hyalospora</i> UCP 1266 usando substratos renováveis.....	73
	ABSTRACT	74
	1. BACKGROUND	75
	2. Results.....	77
	4. Materials and Methods.....	86
	5. Conclusions	89
	References	90
	CAPÍTULO III.....	96
	(Segundo artigo)	96
	Síntese verde para produção otimizada de quitosana por fungos Mucorales usando subprodutos agroindustriais.....	96

1. Introduction	98
2. Results and Discussion.....	99
4. Materials and Methods.....	110
5. Conclusions	112
References	113
CAPÍTULO IV	118
(Terceiro artigo)	118
Produção concomitante e sustentável de lipídeos e quitosana por <i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262 isolado do solo da Caatinga-Brasil para produção de ácidos graxos essenciais	119
1. INTRODUÇÃO.....	120
2. MATERIAIS E MÉTODOS	121
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
4 REFERÊNCIAS	136
CONCLUSÕES.....	140
ANEXOS.....	141

Capítulo I
(Revisão de Literatura)

1. INTRODUÇÃO

O reflexo das mudanças dos hábitos alimentares de uma população crescente em busca de uma vida saudável proporcionou o aumento na demanda do mercado por alimentos funcionais e conseqüentemente incentivos em pesquisas para produção de biomoléculas bioativas (FINCO et al., 2016). Os nutracêuticos podem ser conceituados como alimentos “fortificadores” ou um suplemento dietético que garanta a manutenção da boa saúde (GÁLAN et al., 2019).

Biomoléculas de origem microbiana recebem interesse notável em diversas áreas industriais, em virtude de suas vantagens, visto que a produção não está sujeita a variações geográficas e/ou climáticas que afetam a qualidade e quantidade do produto, a possibilidade de utilizar resíduos agroindústrias como substratos e a capacidade de produzir biomoléculas com alta semelhança com outras fontes, apesar de que geralmente as propriedades são únicas e exclusivas (CASTILLO, VALDEZ e FARIÑA, 2017).

O termo single cell oils (SCOs), conhecidos como lipídios microbianos foi criado por Ratledge e Wynn (1974) para identificar os óleos de microrganismos que são adequados para consumo humano e animal como alternativa aos lipídeos vegetais e animais. No entanto, é restritamente usado para microrganismos oleaginosos, que são aquelas espécies capazes de acumular 20-80% de lipídeos em sua biomassa (GÁLAN et al., 2019). Os SCOs apresenta diferentes composições em relação aos óleos de plantas e/ou de peixe, sendo considerados como novas fontes de nutracêuticos de grande valia para consumo humano (GÁLAN et al., 2019). Além de, apresentarem vantagens consideráveis em relação às fontes clássicas, devido à capacidade significativa de produção, a facilidade de cultivo em meios de cultura com fontes nutricionais alternativas e por serem independentes das condições climáticas. Além disso, esses microrganismos não requerem grandes espaços para seu crescimento e apresentam maior produtividade (HUANG et al., 2013; ADARME-VEGA et al., 2014; FINCO et al., 2016).

O filo Mucoromycota Doweld, proposto para comportar algumas espécies de fungos do antigo filo Zygomycota (atualmente desconsiderado por ser polifilético) (HIBBETT et al., 2007; SPATAFORA et al., 2016; MORIN-SARDIN et al., 2017), abrange representantes oleaginosos como *Mortierella* Coem, *Mucor* Fresen, *Umbelopsis*, *Cunninghamella* Matr. e *Rhizopus* Ehrenb., que são fontes promissoras de ácidos graxos poli-insaturados (NARS et al., 2017; TZIMOROTAS et al., 2018; KOSA et al., 2018) e quitosana na parede celular, um polissacarídeo heterogêneo, composto de glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicose) e N-acetilglucosamina (N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicose) (GHORMARDE et al., 2017, AHMAD et al., 2019). (BERGUER et al., 2018; ZININGA et al., 2019).

A ingestão de ácidos graxos poli-insaturados tem sido amplamente disseminada por causa de seus efeitos positivos na saúde humana. No entanto, o problema emergente é fornecer recursos alimentares suficientes contendo ácidos graxos poli-insaturados para uma população crescente (FINCO et al., 2016; GÁLAN et al., 2019). A título de exemplo, a demanda de ácidos graxos polinsaturados ω -3 é de 1,274 milhões de toneladas, baseando-se no consumo diário de 500 mg/dia. Contudo, apenas 0,84 milhões de toneladas de óleo de peixe é ofertado, restando 0,434 milhões de toneladas para suprir o mercado (GÁLAN et al., 2019). Fungos filamentosos, em especial os Mucorales Schröter, ordem do filo Mucoromycota, são explorados como uma fonte alternativa sustentável e limpa em relação ao óleo de peixe (FINCO et al., 2016; KOSA et al., 2018).

Efeitos benéficos da ingestão da quitosana são relatados em vários estudos, como na redução do colesterol e triglicerídeos e ação antioxidante no sistema circulatório e renal (ANRAKU et al., 2009; ANRAKU et al., 2012; RIZZO et al., 2014; SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2019). Fungos mucoraleanos podem ser uma fonte promissora, uma vez que, diferentemente da desacetilação química de resíduos da carcinicultura, pode ser obtida por métodos químicos simples, não requer altas temperaturas e não necessita de processo de desmineralização, além de não apresentar metais pesados, qualidade

constante e um alto grau de pureza e de desacetilação (SATARI et al., 2015; GHORMARDE et al., 2017; ZININGA et al., 2019).

Dessa forma, é de fundamental importância à produção de lipídeos poli-insaturados e quitosana pelos fungos *Mucor subtilissimus* e *Lichtheimia hyalospora*, uma vez que proporciona o desenvolvimento, inovação e geração de tecnologia com uso de substratos agroindustriais que contribui para a redução desses contaminantes no ambiente e a produção de biomoléculas bioativas que podem vir satisfazer em parte uma parcela da necessidade de produtos inovadores como suplementos alimentares por ser um recurso natural e de baixa toxicidade, além de garantir impactos positivos para a economia, evoluindo as aplicações prováveis de serem implantadas nos processos de produção industrial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a produção de biomoléculas (lipídeos e quitosana) com potencial nutracêutico por *Lichtheimia hyalospora* e *Mucor subtilissimus* utilizando substratos agroindustriais, como fontes renováveis e de baixo custo.

2.1.1. Objetivos Específicos

- Realizar caracterização dos resíduos agroindustriais;
- Isolar e identificar os fungos isolados do solo ca Caatinga
- Analisar a influência da morfologia e ultraestrutura dos fungos *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 e *Mucor subtilissimus* UCP 1262 cultivados em resíduos agroindustriais na acumulação de lipídeos e na produção de quitosana;
- Avaliar através da análise citoquímica a acumulação de lipídicos nos fungos estudados;
- Avaliar o rendimento de lipídeos totais produzidos por *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 cultivada em resíduos agroindustriais, como fontes de carbono e nitrogênio;
- Avaliar a produtividade de quitosana produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 e *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 cultivados em resíduos agroindustriais;
- Avaliar a produção simultânea de lipídeos e quitosana por *M. subtilissimus* UCP 1262 em resíduos agroindustriais;
- Analisar o perfil de ácidos graxos com potencial nutracêutico dos lipídeos produzidos por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 e *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 na condição do planejamento fatorial com maior produção;
- Realizar a caracterização físico-química de quitosana isolada de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 e de *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 na condição do planejamento fatorial com maior produção.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. PERSPECTIVAS DE QUITOSANA E ÁCIDOS GRAXOS MICROBIANOS COMO NUTRACÊUTICOS

A biotecnologia industrial, nomeada como biotecnologia branca, abrange a utilização de células vivas para geração de produtos com baixa demanda de energia, fácil degradabilidade e com pouca geração de resíduos. Além de apresentar desempenhos melhores do que produtos desenvolvidos quimicamente (VALA et al., 2019). O mercado químico total apresenta aproximadamente 5% de produtos brancos à base de biotecnologia. E espera-se que até 2050 a matéria-prima biotecnológica chegue a 75% da matéria-prima química total (LEE e JANG 2006; VALA et al., 2019).

A indústria alimentícia e de nutrição é campo o mais importante da quitosana e ácidos graxos poli-insaturados produzidos por fungos (GUTIÉRREZ 2017; PHILIBERT et al. 2017; KOSA et al., 2018; YADAV et al., 2019).

3.1.1. Quitosana

A quitosana é reconhecida como um biopolímero seguro, devido à baixa toxicidade, sendo utilizado em alimentos, cosméticos e matérias médicas em países como Japão, Estados Unidos, Itália e Finlândia (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2019). Facilmente a quitosana é disponível sem receita médica em lojas de alimentos naturais e suplementos, assim como em muitos sites on-line, são suplementos semelhantes, porém se diferem no grau de desacetilação e peso molecular, impactando diretamente sobre a viscosidade e na capacidade de retenção de gorduras (GADES e STERN, 2005; SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2019).

3.1.1.1. Propriedades Nutraceuticas

A demanda por quitosana está crescendo rapidamente, principalmente para possíveis aplicações em ingredientes nutraceuticos e estoques de ração (MORIN-CRINI, et al., 2019). Vários estudos relataram os efeitos benéficos da

quitosana na redução do colesterol e triglicerídeos (Rizzo et al., 2014). Os ânions positivos se ligam a cargas negativas dos lipídios, prevenindo a digestão de gordura e reduzindo o armazenamento de gordura (NAUSS, THOMPSON e NAGYUVARY, 1983; ORMROD, HOLMES e MILLER, 1998; RIZZO et al., 2014). Ernst e Pittler (1998) verificaram que as ingestões da quitosana inibiram a ação da lipase pancreática necessária para a absorção de gordura.

Segundo os estudos de Anraku et al. (2009) e Anraku et al. (2012), a quitosana atua como um antioxidante no sistema circulatório e renal.

Rizzo et al. (2014) certificaram que a quitosana não apresenta efeitos secundários relevantes, embora possa causar constipação, gases e leve dor de estômago. Sánchez-Machado et al. (2019), sugerem o uso controlado da quitosana, devido a absorção de sais minerais, como Fe, Mg e Ca, podendo causar desequilíbrio mineral. No entanto, estudos com pacientes mais velhos não relataram diferenças nos níveis séricos de Mg ou Ca, porém sugerem que quitosana de alto peso molecular pode absorver Fe (LIAO et al., 2007; SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2019).

3.1.1.2 Atividade antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (ERO), subprodutos naturais do metabolismo aeróbico, geradas endogenamente por estimulação de citocinas, xenobióticos e invasão bacteriana, e durante o metabolismo oxidativo mitocondrial. A geração de excessiva dos principais ERO como ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila, podem causar estresses oxidativos, implicando em várias doenças como câncer, diabetes, aterosclerose, artrite e inflamação crônica e até a morte (ESSICK e SAM, 2010; HALLIWELL, 2011; QUIAO et al., 2018)

Os antioxidantes agem eliminando as ERO e reparando os danos que elas causam. Normalmente o metabolismo produz antioxidantes suficientes para atuarem contra um nível normal de radicais livres gerados (HARISH PRASHANTH et al., 2007; SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2019).

Estudos clínicos sobre a utilização da quitosana como suplemento nutricional por sua atividade antioxidante são escassos. Anraku et al. (2009) descobriram que o tratamento com a quitosana diminuiu expressivamente a proporção de albumina oxidada para diminuir a albumina no plasma. A glicose sanguínea (GS) e o índice aterogênico (IA) também foram reduzidos. Designadamente, a quitosana foi utilizada como suplemento para indivíduos jovens, visando a prevenção do estresse oxidativo associado à insuficiência renal.

Anraku et al. (2011) avaliaram a influência da quitosana como suplemento dietético sobre os índices de estresse oxidativo através dos níveis de albumina oxidada no plasma. A ingestão de quitosana durante um período de 2 meses diminuiu expressivamente os níveis de colesterol total (CT) e IA, e aumentou o colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Os pesquisadores concluíram que a quitosana poderia diminuir os níveis de pró-oxidantes como o colesterol e as toxinas urêmicas no trato intestinal.

Anraku et al. (2014) avaliaram os efeitos da ingestão de quitosana sobre o estresse oxidativo em pacientes em hemodiálise. Foi observado que a biomolécula pode diminuir os níveis de lipídeos e toxinas urêmicas que induzem a produção de EROs no trato gastrointestinal. Eles descobriram que 38,5% da quitosana se ligou a indoxil sulfato (IS) e 17,8% de fosfato, e ambos induzem a produção de EROs. Essas descobertas poderiam prevenir doenças cardiovasculares em pacientes em hemodiálise.

3.1.1.3 Redução do Peso Corporal

Vários pesquisadores sugeriram a utilização da quitosana como suplemento para prevenir a absorção de lipídeos ingeridos, controlando assim o peso corporal (MUZZARELLI, 1996; SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2019).

Rodríguez e Albertengo (2005) propõem que a biomolécula se dissolve no meio ácido do estômago formando uma emulsão com lipídeos. Segundo SÁNCHEZ-MACHADO et al. (2019), com o aumento do pH no duodeno, a quitosana torna-se insolúvel, formando um gel com lipídeos encapsulados não são absorvidos pelas paredes do intestino. Para Kaats et al. (2006), o

complexo insolúvel de quitosana e lipídeos atravessa o intestino grosso e é naturalmente excretado.

Em estudos envolvendo experimentos com animais, Anraku et al.(2012) observaram que os ratos que receberam quitosana tiveram perda de 15% de peso corporal. Egan et al. (2016) a quitosana também influenciou positivamente sobre o peso corporal em suínos, visto à sua capacidade de alterar a conduta alimentar e controlar o apetite.

3.1.1.4 Anti-hiperlipidêmico

A atividade anti-hiperlipidêmica da quitosana é comprovada em diversos estudos, devido a sua eficácia de baixar os níveis de colesterol em animais e humanos, apresentando potencial como suplemente diético no tratamento de obesidade (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2019).

Park et al. (2010) provaram, através de estudos com ratos, que a quitosana reduz o colesterol total e o colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e aumenta os níveis de colesterol HDL. No entanto, Gallaher et al. (2002) observaram que ingestão de quitosana e glucomanana em pacientes com distúrbio do peso corpóreo, acarretou em redução significativa no HDL, assim como a redução do colesterol LDL, sem alterações na concentração total de triglicérides. Panith et al. (2016), propuseram em um estudo in vitro, que o peso molecular e o arranjo da biomolécula garantem a sua capacidade em ligar-se a colesterol e a sais biliares.

Rizzo et al. (2014) sugeriram a ingestão de quitosana para pacientes com hipercolesterolemia, uma vez que obtiveram resultados significativos com 28 pacientes com esse distúrbio, após o tratamento com a biomolécula o colesterol total foi reduzido em 8% e os triglicérides em 19%, sem intervenção de outro tratamento com reguladores lipídicos.

3.1.1.5 Mercado Global

A quitosana apresenta propriedades físico-químicas e biológicas que resultam em várias aplicações em áreas, como tratamento de resíduos em água, agricultura, tecidos e têxteis, cosméticos, aprimoramento nutricional e processamento de alimentos (SENEL e MCCLURE, 2004; MUÑOZ et al.,

2018). E devido, a baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade o torna promissor para várias aplicações com um biomaterial na área farmacêutica e médica (SENEL e MCCLURE, 2004; KOPACIC et al., 2018; BANO et al., 2019).

Devido à crescente demanda de diferentes setores, em 2018, o valor do mercado global da quitosana alcançou U\$ 1,3 bilhões (INDUSTRYARC, 2019). Segundo a Global Market Insights (2018) o mercado de quitosana deverá atingir US \$ 5,1 bilhões até 2024.

A quitosana comercial é produzida pela desacetilação química de quitina de resíduos de crustáceos (ZAMANI, 2010, KARIMI e ZAMANI, 2013), em que forte solução salina e alta temperatura são empregadas para o processo de desacetilação (KARIMI e ZAMANI, 2013). Este processo consiste em remover os grupos acetilados (COCH_3) da molécula de quitina, permanecendo os grupos amino ($-\text{NH}_2$), dando origem a quitosana. Chen et al., (2008) analisaram a estrutura e as propriedades mecânicas do exoesqueleto do caranguejo (*Loxorhynchus grandis*). Segundo eles, é constituído majoritariamente por fibras de proteína e quitina altamente mineralizada (proteína, 20-40%; carbonato de cálcio, 20-50%; quitina, 15-40%), sugerindo que, geralmente, para o isolamento de quitina de diferentes fontes marinhas, tratamentos químicos como a desproteínização com álcalis em alta temperatura (NaOH 1N a 65–100°C por 1–72 h), desmineralização para eliminar o carbonato de cálcio (0,275 a 2M HCl em aproximadamente 100°C para 1–48 h) e descoloração para remover os pigmentos.

3.1.1.6 Quitosana Microbiana como nutracêutico

Vários estudos vêm mostrando o potencial de vários fungos como fonte comercial de quitosana natural (KARIMI e ZAMANI, 2013; GHOMARDE et al., 2017), que apresenta uma série de benefícios em comparação a quitosana oriunda da desacetilação química da carnicultura, sendo a característica mais importante à reação de desacetilação enzimática (KARIMI e ZAMANI, 2013). O

tratamento para o isolamento da quitina e quitosana das paredes celulares dos fungos não são tão severos como o tratamento usado para obtenção da quitosana oriunda de resíduos da carcinicultura (FEOFILOVA, 2010). O processo de extração da quitosana fúngica não requer altas temperaturas e soluções alcalinas fortes, a biomassa apresenta baixo teor de materiais inorgânicos comparado com os resíduos dos crustáceos, não necessitando do processo de desmineralização, não apresenta metais pesados, como níquel e cobre, apresenta valores similares ou maiores de grau de desacetilação e viscosidade e peso molecular menores do que a quitosana obtida da desacetilação da quitosana oriunda de crustáceos (TAN et al., 1996; VAINGANKAR & JUVEKAR, 2014; MONDALA et al. 2015; GHORMADE et al., 2017). Além disso, a quitosana fúngica é produzida em ambiente controlado e independente de sazonalidade (WHITE et al. 1979; MONDALA et al. 2015).

A quitosana, ocorre naturalmente, juntamente com quitina em diferentes proporções na parede celular das células fúngicas (VAN LEEUWEN, 2016), porém representantes do filo Mucoromycota podem apresentar até 50% deste polímero na sua estrutura (ZAMANI et al., 2010), o que levou a acreditar que era exclusiva deste grupo. Porém, alguns estudos comprovam que este componente está presente nas paredes celulares de espécies de Ascomycota e Basidiomycota (BANKS et al., 2005; MATSUO et al., 2005). A tabela 1, apresenta vantagens da quitosana fúngica comercial.

Tabela 1. Vantagens da quitosana fúngica em comparação a outras fontes de produção

Resíduos de carcinocultura	Processos enzimáticos	Parede celular dos fungos
<ul style="list-style-type: none"> Alta disponibilidade de material; Forte tratamento de bases e ácidos fortes e outras soluções despigmentação; Alta temperatura; Processo oneroso e de alto custo; Presença metais pesados, como níquel e cobre na quitosana; Poluentes químicos no meio ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> Alto custo; Baixa produtividade; O tratamento não requer compostos químicos. 	<ul style="list-style-type: none"> Síntese natural da quitosana, principalmente espécies do filo Mucoromycota; Reaproveitamento de resíduos agroindustriais como fontes nutricionais no cultivo destes microrganismos; Não requer altas temperaturas e soluções alcalinas fortes; A biomassa fúngica apresentar baixo teor de materiais inorgânicos; Não apresentar metais pesados.

Fonte: Ghormade et al., (2017)

3.1.2 Ácidos graxos

Em geral, os ácidos graxos são classificados como ácidos graxos saturados (por exemplo, palmítico, esteárico), mono-insaturados (AGMI) (por exemplo, palmitoleico, oleico) e poli-insaturados (AGPI). Além disso, os AGPIs podem ser classificados em várias famílias, como ômega-3 (ω -3, v-3 ou n-3), ômega-6 (ω -6, v-6, n-6) e ômega-9 (ω -9, v-9 ou n-9). A família ω -3 inclui ácido α -linolênico - ALA (C18: 3n-3), ácido eicosapentaenóico - EPA (C20: 5n-3) e ácido docosahexaenóico - DHA (C22: 6n-3), enquanto a família ω -6 reúne ácido linoleico - LA (C18: 2n- 6), ácido γ -linolênico GLA (C18: 3n-6), ácido araquidônico - ARA (C20: 4n-6) (GÁLAN et al., 2019).

AGPIs dos grupos ω -3 e ω -6 são essenciais são fundamentais para a manutenção em mamíferos, incluindo seres humanos. ALA e LA são os precursores para a síntese dos demais ácidos graxos poli-insaturados das famílias ω -3 e ω -6, respectivamente. O LA e o ALA são essenciais, os mamíferos não possuem a capacidade de sintetizá-los, portanto devem ser fornecidos pela dieta (GÁLAN et al., 2019). Os ácidos graxos poli-insaturados são fundamentais para o desenvolvimento nos primeiros meses da vida humana, principalmente por estarem envolvidos no desenvolvimento neural e visual, devendo ser obtidos em sua dieta, uma vez que, são incapazes de sintetizá-los a uma velocidade rápida o suficiente para acompanhar a demanda do cérebro em desenvolvimento acelerado (SIJTSMA e DE SWAAF, 2004; GÁLAN et al., 2019). Além disso, são utilizados para prevenção e tratamento de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, câncer e diabetes.

3.1.2.1 Propriedades Nutracêuticas

Como mencionado acima, a ingestão de fontes de ALA será convertido em EPA e DHA. O DHA é um componente essencial das membranas celulares, sendo sua presença bastante expressiva (60% do total de ácidos graxos) da área externa da retina (GÁLAN et al., 2019). Segundo Hou et al. (2016) o DHA ainda pode agir como agente quimiopreventivo do câncer de mama e cólon.

Embora os benefícios nutricionais do EPA sejam pouco esclarecidos, comparado ao DHA. O EPA pode exercer efeitos benéficos na hipertensão, trombose, arteriosclerose, artrite e várias respostas inflamatórias (LENIHAN-GEELS et al., 2013).

Segundo Gálan et al. (2019), as concentrações normais do EPA no sangue, estão contrariamente relacionados ao risco de morte súbita, devido a doença cardiovascular. Inclusive, o ácido graxo tem sido utilizado para a prevenção de doença cardíaca crônica e arteriosclerose, e o uso de dose baixa (20 mg/kg/dia) mostra proteger contra arritmia cardíaca. Além disso, o EPA tem sido utilizado para aliviar alguns distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo o maníaco-depressivo (transtorno bipolar), esquizofrenia e também

transtorno do déficit de atenção com hiperatividade em crianças (RATLEDGE, 2013).

O ácido linoleico (LA) é precursor da síntese dos demais ácidos graxos poli-insaturados da família ω -6, como o ácido γ -linolênico (GLA) e o ácido araquidônico (ARA). O GLA é um ácido graxo poli-insaturado comumente incorporado à fórmula infantil. Além disso, é geralmente utilizado no tratamento de artrite reumatóide, esclerose múltipla, eczema atópico e tensão pré-menstrual (GÁLAN et al., 2019).

O ARA tem um papel fundamental na membrana plasmática, associado predominantemente com fosfolipídios, sendo precursor da síntese de vários eicosanóides que regulam o metabolismo das lipoproteínas, função leucocitária e ativação plaquetária (GÁLAN et al., 2019). A ingestão de ARA e DHA apresenta ser favorável na redução do risco de transmissão do vírus do tipo HIV-1, durante a amamentação (GÁLAN et al., 2019).

Segundo YAMADA (2017), é visto uma possibilidade de formular alimentos multifuncionais mais eficazes, incluindo os AGPIs, considerando o efeito sinérgico dessas biomoléculas (Yamada, 2017).

3.1.2.2 Mercado Global

Oleos de peixe são ricos em ácidos graxos poli-insaturados, especialmente em EPA e DHA, mas nem toda pessoa está disposta a ter produtos de peixe em sua dieta (GÁLAN et al., 2019). Vale destacar que, aproximadamente 70% do óleo de peixe gerado é utilizado para a produção de ração de peixes para salmões e trutas, e apenas uma pequena porção é utilizada para produzir alimentos nutracêuticos (GÁLAN et al., 2019)

Em 2016, o mercado global de AGPIs US \$ 421,20 milhões até o final de e estima-se uma taxa de crescimento anual (CAGR) de 10,7% no período 2016–2026 (FMI 2016). Com base no tipo de produto, o mercado é categorizado em AGPIs ω -3 e ω -6.

O mercado de ω -3 é ainda segmentado em ALA, DHA e EPA. De acordo com a FAO (2014) e Grand View Research (2014), estima-se que a demanda global por ω -3 em 2025 alcance 135.500 toneladas (FMI, 2016).

O mercado de ω -6 é segmentado em LA e ARA. O mercado global do ARA foi de US \$ 176,48 milhões em 2016 e estima-se o crescimento uma taxa de crescimento anual de 6,8% durante 2017-2022 (MORDOR INTELLIGENCE 2017).

Segundo Gálan et al. (2019), o problema futuro é o fornecimento de recursos alimentares suficientes compostos por AGPIs, em especial os ômega 3, para uma população progressiva. Uma vez que, a demanda potencial de ω -3 é de 1,274 milhão de toneladas (consumo de 500 mg / dia). No entanto, a disponibilização de óleo de peixe é de apenas 0,84 milhões de toneladas, apresentando uma diferença de 0,434 milhão de toneladas para suprir a demanda.

3.1.2.3 *Single Cell Oil* como nutracêuticos

Segundo Finco et al. (2017), há várias fontes alternativas sendo avaliadas no mercado para produção de AGPIs, porém microrganismos oleaginosos apresentam ampla disponibilidade e capacidade de acumular grandes rendimentos de lipídios em curto prazo tempo e em pequeno espaço, além de produzem altos valores de AGPIs, em especial os ácidos ω -3. A produção de lipídeos por plantas oleaginosas requer grandes áreas de extensão de terra, podem atingir 500-5000 kg / ha / ano de lipídeos, os microrganismos podem atingir até 2000 kg / m³ / ano de lipídeos (FINCO et al., 2017).

A produção comercial de SCO é principalmente restrita a fungos e algas. Em 1985, a J & E Study (Reino Unido) produziu o primeiro óleo microbiano em escala comercial por *Mucor circinelloides*, chamado de OIL of Javanicus, competindo com óleo extraído da semente de *Oenothera biennis* (prímula), também rico em GLA. O óleo microbiano foi comercializado como suplemento dietético para aliviar a tensão pré-menstrual em mulheres (RATLEDGE 2006).

Em 1992, a Martek Corporation iniciou pesquisas com a produção de DHA em escala industrial pela microalga *Cryptocodinium cohnii*. Em 2002, o óleo foi nomeado como DHASCOTM e considerado GRAS (Generally Recognized As Safe) pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados

Unidos. Deste esse tempo, o óleo foi regularmente adicionado a fórmulas para bebês nos no país. Diante disto, várias pesquisas foram impulsionadas para produção de ômega-3 por microrganismos no mundo inteiro (RATLEDGE et al., 2008; HUANG et al., 2013; GARAY et al., 2014; PARSAEIMEHR et al., 2017; KOSA et al., 2018; JIN et al., 2019).

3.2 MUCORALES SCHRÖTER

A ordem Mucorales está inserido no sub-reino Mucoromyceta, subfilo Mucoromycotina, filo Mucoromycota (SPATAFORA et al., 2016; TEDERSOO et al., 2018), um filo proposto para acomodar várias espécies de Zygomycota, um filo não mais aceito por ser polifilético (JAMES et al. 2006, HIBBETT et al., 2007). Morfologicamente, espécies de Mucorales são caracterizadas pela produção de esporangiosporos (fase assexuada) em esporângios, merosporângios, esporangíolos e a formação de zigósporos, esporos de origem sexual formados pela fusão de dois gametângios (KENDRICK 2000; LIMA et al., 2018).

A maioria dos táxons de mucorales degradam apenas fontes de carbonos de moléculas simples, como glicose, e a minoria é capaz de degradar substratos mais complexos como hemiceluloses, lipídeos e proteínas (DOMSCH et al., 2007, RICHARDSON 2009, LIMA et al., 2016). São promissoras na indústria de alimentos e bebidas devido à termotolerância e à produção de enzimas como amilases e proteases (KWASNA et al. 2006).

A biomassa das espécies desse grupo é rica em quantidades significativas de proteínas, lipídeos (em especial ácidos graxos poli-insaturados), aminoácidos, quitosana e quitina, que os tornam interessantes para serem utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e de biocombustíveis (FERREIRA et al., 2013). Além de apresentarem grande importância ecológica, pois são decompositores de matéria orgânica no solo e outros substratos, que contribui para o ciclo de nutrientes e conservação de diversos ecossistemas (LIMA et al., 2018).

Os gêneros mais comuns de Mucorales, como *Rhizopus* Ehrenb, *Mucor* Fresen e *Lichtheimia* Vuill, são reconhecidos por serem os agentes etiológicos

de casos de mucormicose (70 a 80% dos casos), enquanto os gêneros *Cunninghamella* Matr., *Saksenaea* S. B. Saksena, *Rhizomucor* Lucet & Costantin, *Apophysomyces* P.C. Misra, *Syncephalastrum* J. Schrot, *Cokeromyces* Shanor, e *Actinomucor* Schostak são relatados em apenas 1–5% dos casos (GOMES et al., 2011)

3.2.1 Gênero *Mucor* Fresen

A classificação mais atual para *Mucor* é: Fungi, Mucoromyceta, Mucoromycota, Mucoromycotina, Mucorales, Mucoraceae, *Mucor* (SPATAFORA et al., 2016; MORIN-SARDIN et al., 2017; TEDERSOO et al., 2018). O gênero *Mucor* apresenta o maior número de espécies dentro da ordem Mucorales e da família Mucoraceae (SPATAFORA et al., 2016; MORIN-SARDIN et al., 2017). O gênero é amplamente distribuído na natureza, e as espécies são geralmente sapróbias, comumente isolados de solo, grãos, frutos, restos de vegetais, fezes de herbívoros (HESSELTINE & ELLIS 1973; ALEXOPOULOS et al. 1996, ALVES et al., 2002; HERMET et al., 2012; DE LIMA et al., 2018), frequentemente isolados de matérias-primas e alimentos processados, entretanto, não há relatos de produção de micotoxinas (HOLLMANN et al., 2008; HERMET et al., 2012) e raramente encontrados em flores e agáriscos carnosos (fungos basidiomicetos). Algumas espécies foram descritas como endófitos de plantas e outras como patógenas oportunistas de animais e humanos (HOFFMANN et al., 2013; MORIN-SARDIN et al., 2017).

As características morfológicas das espécies de *Mucor* foram revisadas por Schipper (1967, 1969, 1973, 1976), Schipper e van Wetenschappen (1975) e Zycha (Zycha et al., 1969). Espécies de *Mucor* crescem rapidamente, principalmente como hifas cenocíticas apresentando septos apenas em delimitação de estruturas reprodutivas (STAJICH et al., 2009) e regiões de hifas senescentes, evitando que materiais tóxicos corram por todo micélio (CARLILE, 1995). Rizóides são encontradas em poucas espécies, algumas espécies produzem clamidósporos em hifas senescentes, às vezes desenvolvem abundantemente, como na espécie *M. racemosus* Bull. (MORIN-SARDIN et al., 2017).

Os representantes de *Mucor* reproduzem-se, assexuadamente, por meio de esporângios multiesporados que se envolvem em uma columela sem apófise (Figura 1), sendo essa uma estrutura inchada que delimita o esporângio e o esporangióforo, presente em outros gêneros da ordem Mucorales, e produção de clamidósporos. Táxons de *Mucor* se reproduzem sexuadamente, pela fusão de dois gametângios morfológicamente semelhantes, provenientes de um único micélio (homotático) ou de micélios diferentes, mas geneticamente compatíveis (heterotático), dando origem ao zigósporo (TRUFEM 1981; ALVES et al., 2002; MORIN-SARDIN et al., 2017; DE LIMA et al., 2018).



Figura 1 *Mucor subtilissimus* Oudem. Esporângios multiesporado sem apófise.

Fonte: Própria autoria

Algumas espécies de *Mucor* são dimórficas, isto é, são capazes de crescer sob uma forma de filamentosa ou leveduriforme. A transição morfológica depende das condições ambientais e especialmente das concentrações de oxigênio e dióxido de carbono (BARTNICKI-GARCIA, 1963). Em condições aeróbicas, crescem em filamentos, e em condições anaeróbicas, exibem formas leveduriformes (Figura 2). Em algumas espécies, durante o crescimento submerso, a septação das hifas forma correntes artrospóricas que podem fragmentar e possivelmente se desenvolver em forma leveduriforme (LÜBBEHÜSEN, et al., 2003). Esta transição é conduzida por uma proteína

fosfatase específica de serina / treonina e uma proteína quinase A (PKA) de AMPc (Adenosina Monofosfato cíclico) dependente (LEE et al., 2013).

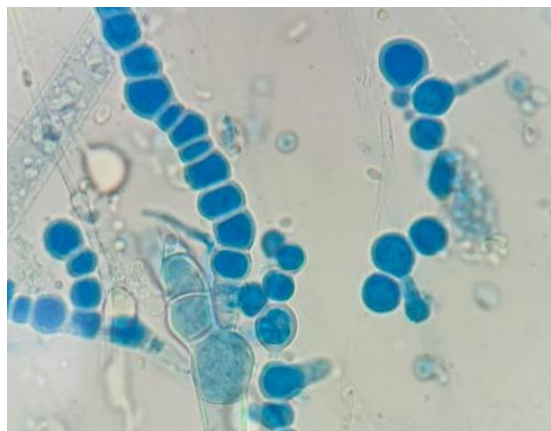


Figura 2 *Mucor subtilissimus* Oudem. Hifas em forma de correntes artrospóricas e células leveduriformes.

Fonte: Própria autoria

Espécies de *Mucor* são promissoras para a indústria biotecnológica devido à produção de uma grande variedade de enzimas como as uricasases (YAZDI et al., 2006), proteases (ALVES et al., 2005, SOUZA et al., 2015, NASCIMENTO et al., 2016), fitase e lipases (ROOPESH et al., 2006, CARVALHO et al., 2015). Há espécies de *Mucor* que são utilizadas em processos de biorremediação (WEI et al., 2015, SUN et al., 2017), e outras na indústria de alimentos (MORIN-SARDIN et al., 2016, SNYDER et al., 2016).

3.2.2 Gênero *Lichtheimia* Vuill.

A classificação mais atual para *Lichtheimia* é: Fungi, Mucoromyceta, Mucoromycota, Mucoromycotina, Mucorales, Lichtheimiaceae, *Lichtheimia* (HOFFMANN et al., 2009; SPATAFORA et al., 2016; TEDERSOO et al., 2018).

O gênero *Lichtheimia* Vuill. foi classificado anteriormente em outros gêneros, incluindo o gênero *Absidia* Tiegh. Estas espécies foram descritas como *Absidia* por Ellis e Hesseltine (1965, 1966) e Hesseltine e Ellis (1961, 1964, 1966). Hoffmann et al., (2007), em uma revisão de *Absidia*, analisaram os sinônimos *Absidia*, *Pseudoabsidia* Bainier e *Lichtheimia*. As espécies

termotolerantes de *Absidia* foram examinadas e são reconhecidas como *Lichtheimia*.

As espécies de *Lichtheimia* são: *L. blakesleeana* (Lendn.) Kerst. Hoffm., G. Walther & K. Voigt; *L. corymbifera* (Cohn) Vuill.; *L. hyalospora* (Saito) Kerst. Hoffm., G. Walther & K. Voigt; *L. ramosa* (Zopf) Vuill.; *L. brasiliensis* A.L.Santiago, N.Lima & R.J.V.Oliveira; *L. ornata* (A.K.Sarbhoy) Alastr,-IZq. & Walther; *L. sphaerocystis* Alastr,-IZq. & Walther.

Algumas espécies apresentam crescimento rápido entre 37 e 42°C, alcançando até 55°C, sendo assim , espécies termotolerantes. O gênero é caracterizado por formarem esporângios pequenos. Os esporangióforos não são ramificados e raramente apresentam septo subsporangial. Esporangio multiesporado, esférico ou subpiriforme, apofisado e com columela esférica ou hemisférica, ocasionalmente cônica (Figura 3), e apresenta projeções (como em *Absidia*). Os esporangioforos nunca são formados opostos aos rizóides (como em *Rhizopus*). Os zigósporos são globosos de coloração acastanhada, podendo apresentar anel equatorial. Ao contrario do gênero *Absidia* os zigósporos não apresentam apêndices (HOFFMANN et al. 2007; ALASTRUEY-IZQUIERDO et al. 2010)

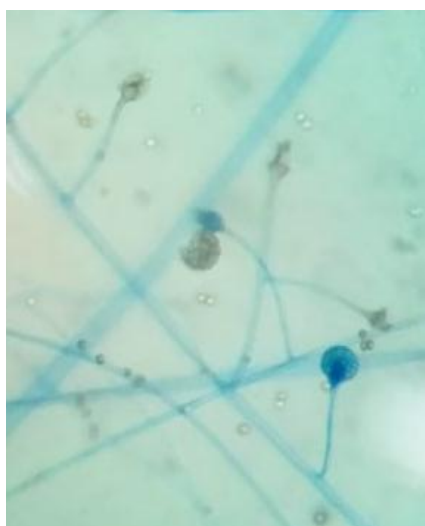


Figura 3 *Lichtheimia hyalospora* Kerst.Holffm.,Walther & Voigt. Esporangio apofisado e multiesporado e columelas cônicas.

Fonte: Própria autoria

Espécies de *Lichtheimia* são estudadas para aplicações biotecnológicas, como produção de enzimas, como peroxidases (EL-RAHIM et al., 2019), celulasas e hemicelulasas (GARCIA et al., 2018), β -glicosidases (GONÇALVES et al., 2013; MORAIS et al., 2019), fitase e xilanase (NEVES et al., 2011; TIAN et al., 2018), amilase (OLIVEIRA et al., 2016). Algumas espécies são reconhecidas como oleaginosas, alcançando até 27% de lipídeos (KOSA et al., 2018). De Andrade Silva et al. (2011), obtiveram bons rendimentos de quitosana por *L. corymbifera*, aplicando na remoção de corantes de águas de rio. No estudo de Berger et al., (2018) comprovaram a capacidade da *L. hyalospora* de produzir uma quitosana sustentável ao ser cultivada em milhocina e suco de cascas de mamão.

Vários relatos de mucormicoses causados por *Lichtheimia* spp. são relatados em imunocomprometidos (THIELEN et al., 2019; GROSSI et al., 2019, TANAKA et al., 2019; ; ZHANG et al., 2019) e raramente em imunocompetentes (RAZOUK et al., 2012; GENG et al., 2019).

3.3 FUNGOS OLEAGINOSOS

Os lipídeos são moléculas importantes para o funcionamento das células fúngicas, não apenas como constituintes principais dos sistemas de membranas, mas também como substâncias de reserva (principalmente em forma de triglicérides), componentes de hormônios, como anteridiol, ácidos trispóricos e sirenina, fonte de energia e fonte de carbono, componentes da parede celular e do envoltório de esporos dos fungos (PUTZKE & PUTZKE, 2004; AKPINAR-BAYIZIT, 2014). Os principais fatores que influenciam diretamente a produção de lipídios são a natureza e a concentração de carbono (C) e de azoto (nitrogênio), em meios de cultura (PUTZKE & PUTZKE 2004; PUPIN, et al., 2000; GAO, et al., 2013)

Lipídeos são biomoléculas produzidas em grandes quantidades em certas espécies de fungos e vem despertado interesse biotecnológico para muitos pesquisadores nas últimas décadas, devido às suas diversas aplicações, como biocombustíveis, em aditivos alimentares, farmacêuticos, e

ração animal (ZHAO et al., 2015; LI et al., 2015; SOUZA et al., 2016; ATHENAKI et al., 2018; ZININGA et al., 2019).

Várias espécies (mais de 64) de fungos são capazes de acumular mais de 25% (em biomassa) de lipídios (RATLEDGE e WYNN, 2002; ZHAO et al., 2015; LI et al., 2015; ATHENAKI et al., 2018). A maioria das espécies de fungos contém, em ordem de abundância, ácido oleico (C18: 1), palmítico (C16: 0) e linoleico (C18: 2) como os principais ácidos graxos e em proporções menores, o esteárico (C18: 0), linolênico (C18: 3) e palmitoléico (C16: 1). Além da ocorrência de grandes quantidades de PUFAs encontrados principalmente em Mucorales do que os lipídeos acumulados em leveduras (AKPINAR-BAYIZIT, 2014; ATHENAKI et al., 2018). Esta é uma das principais razões pelas quais um número significativo de pesquisas sobre a produção de lipídios por fungos filamentosos está focado principalmente na produção de PUFAs, como ácido γ -linolênico, ácido araquidônico, ácido docosaenoico e ácido eicosapentaenoico (ČERTIK e SHIMIZU 2000; RATLEDGE e WYNN 2002; SAKURADANI e SHIMIZU 2009; SAKURADANI et al., 2009; BELLOU et al., 2016; BHARATHIRAJA et al., 2017).

Várias espécies de fungos oleaginosas podem competir em escala comercial com a tradicional produção lipídica de origem vegetal e animal, com base em vários motivos: grande produção de biomassa, capacidade de metabolizar vários substratos baratos, ambiente controlado que não é afetado por condições sazonais e climáticas, e a possibilidade de otimizar a produção, visando obter as principais etapas das enzimas sintetizadoras de lipídeos valiosos, como os ácidos poli-insaturados (GÁLAN et al., 2019). Espécies de fungos, como *Aspergillus terreus*, *Claviceps purpurea*, *Tolyposporium*, *Mortierella alpina* e *Umbelopsis isabellina*, são relatadas como bons acumuladores de lipídios, principalmente para produção de ácidos graxos essenciais (BELLOU et al., 2012).

3.3.1 Biossíntese de lipídeos em microrganismos oleaginosos

O termo, single cell (SCOs), também chamado de lipídeos microbianos ou óleos microbianos, foi denominado por Ratledge e Wynn (1974) para identificar os lipídios de microrganismos (archaea, bactérias, leveduras, fungos e microalgas) com teor de óleo superior a 20% do peso da biomassa, que seriam adequados para consumo humano e animal (GÁLAN et al., 2019).

Segundo Rossi et al., (2011) e Vorapreeda et al., (2012), a acumulação de lipídeos nas leveduras e nos fungos filamentosos oleaginosos tem sido relacionada com a escassez de fonte de nitrogênio e/ou fósforo no meio de cultivo e à fonte de carbono em excesso, condições eficientes para induzir a lipogênese. A enzima ATP citrato liase, desempenha um papel fundamental na direção do excesso de carbono para ser armazenada como lipídeos. Há ainda, vários estudos publicados destacando a influência da limitação do fósforo, magnésio, zinco, chumbo ou ferro na acumulação de lipídeos em leveduras oleaginosas (HALL e RATLEDGE 1977; BEOPOULOS et al., 2009; WU et al., 2010).

Fungos oleaginosos crescidos sob limitações de nutrientes necessários para a proliferação celular e excesso de carbono passam por três fases de crescimento: proliferação celular, acumulação de lipídeos, e, na terceira fase às células entram na fase estacionária, em que o acúmulo de lipídeos é contínuo (Figura 4), porém na fase estacionária a β -oxidação também se inicia para remobilização dos lipídeos armazenados em forma de triacilglicerídeos para serem utilizados como fonte de carbono pela célula (BEOPOULOS et al., 2012).

Segundo Papanikolaou e Aggelis (2011) inicialmente a acumulação de lipídeos por microrganismos oleaginosos está diretamente relacionada com a produção de ácido cítrico à atividade da isocitrato desidrogenase, enzima dependente de adenosina monofosfato (AMP). A diminuição desta molécula altera as funções do Ciclo de Krebs, pois a isocitrato desidrogenase, enzima responsável pela transformação do ácido isocítrico em ácido α -cetoglutárico, perde sua atividade. Então, o ácido isocítrico é acumulado dentro da

mitocôndria e encontra-se em equilíbrio com o ácido cítrico (reação catalisada por isocitrato aconitase). Quando valores de ácido cítrico dentro da mitocôndria aumentam, ele é transportado para o citoplasma através do transporte citrato-malato, sendo clivado pela enzima ATP: citrato liase (ACL) formando oxaloacetato e acetil-Co-enzima A (Figura 5). O acetil-CoA é unidade básica da biossíntese de ácidos graxos, é o precursor da síntese lipídica *de novo* por microrganismos oleaginosos (BEOPOULOS et al., 2009; PAPANIKOLAOU & AGGELIS, 2011).

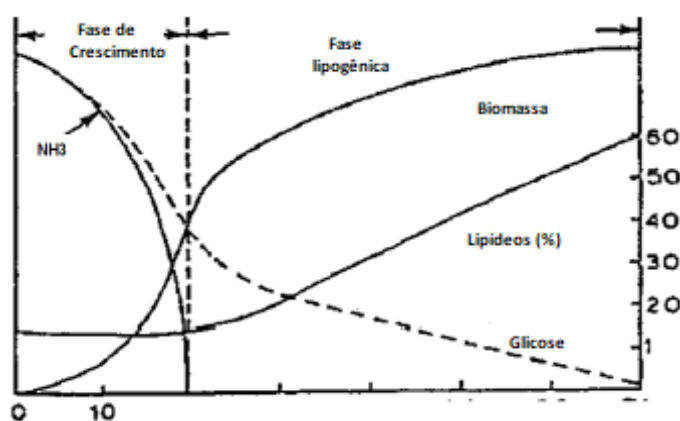


Figura 4. Produção de biomassa oleaginosa em escassez de nitrogênio.

Fonte: Akpinar-Bayizit, 2014

Os lipídeos intracelulares podem ser acumulados através de duas vias metabólicas: síntese *de novo*, que envolve a produção propriamente dita (como relatado acima) tendo como precursores a acetil-coenzima A (acetil – CoA) e malonil-CoA como os principais precursores, a partir de carboidratos hidrofílicos e sua via biossintética de armazenamento de lipídeos (via Kennedy), e a via de acumulação *ex novo*, que envolve a captação de ácidos graxos, óleos e triacilglicerídeos (TAG) do meio de cultura e seu acúmulo em forma não-modificada ou modificada no interior da célula (BEOPOULOS et al., 2012). Porém a via acumulativa *ex novo* requer a hidrólise do substrato hidrofóbico, transporte dos ácidos graxos liberados para dentro da célula e posteriormente são remontados em triacilglicerol (TAG) e em frações de esterol éster (ES) gerando um acúmulo dentro dos corpos lipídicos dentro das células (BEOPOULOS et al., 2009).

A via de síntese *de novo* é a mais influenciada por fatores nutricionais, os mais estudados são o excesso de carbono e exaustão de nitrogênio (Akpinar-Bayizit, 2014). A ausência de nitrogênio promove a falta de AMP, clivando-a em IMP (inosina monofosfato), assim a isocitrato desidrogenase, perde sua atividade, visto que a mesma é ativada alostericamente por AMP intracelular (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011). Quando a fonte de nitrogênio é limitada, a célula continua assimilando a fonte de carbono, porém, o crescimento celular desacelera, uma vez que a fonte de nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas e ácidos nucléicos (BEOPOULOS et al., 2009). A fonte de carbono em excesso é direcionada para a síntese de ácidos graxos, ocorrendo o acúmulo de triacilglicerol em corpos lipídicos na célula (BEOPOULOS et al., 2009).

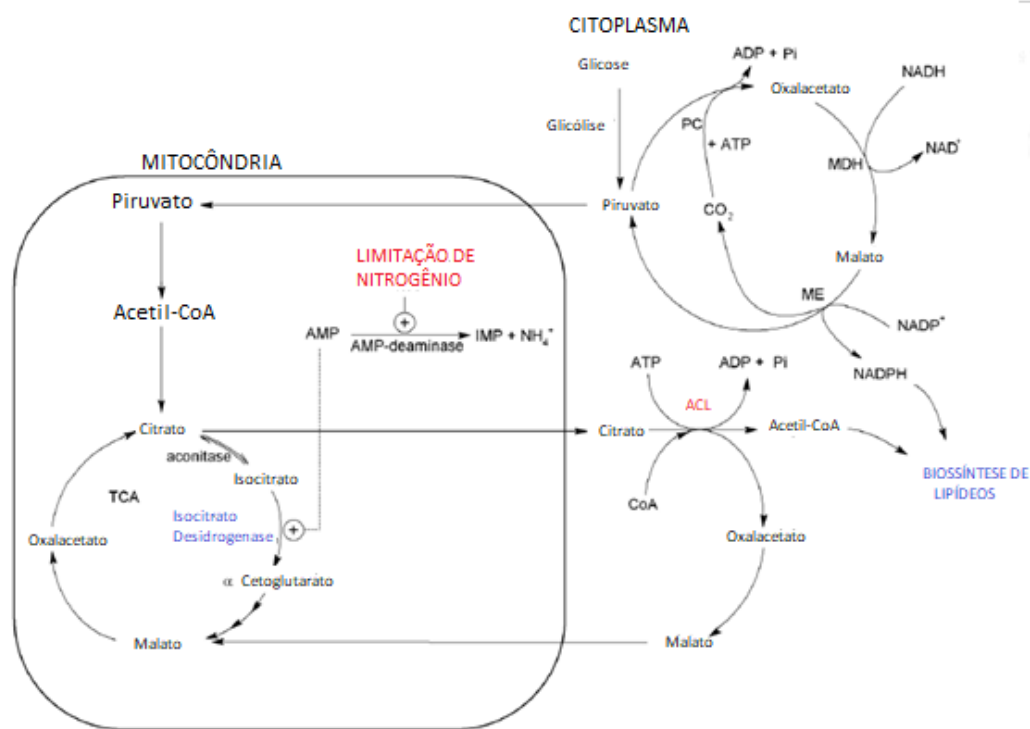


Figura 5. Biossíntese lipídica devido excesso de citrato como uma consequência da limitação de nitrogênio.

Fonte: Adaptado de Ratledge de 2004.

A via de acumulação de lipídios *ex novo* envolve a captação de ácidos graxos, óleos e triacilglicerídeos (TAG) do substrato hidrofóbico em que o microrganismo é cultivado e o acúmulo dos lipídeos intracelular sofre

modificações ou não (BEOPOULOS et al., 2012). Os substratos oleosos encontrados no meio de cultura são disponibilizados através de moléculas de biossurfactantes e degradados através de enzimas hidrolíticas, como as lipases, que melhoram o acesso da célula à fonte de carbono (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

O óleo produzido por microrganismos apresenta composição e valor energéticos similares aos óleos vegetais e animais. A produção de óleo vegetal é influenciada por variações climáticas, ciclos sazonais e requer grandes extensões de terra para produção. Em comparação as plantas oleaginosas, à utilização de microrganismos oleaginosos como matéria-prima é economicamente viável, devido à rápida geração de biomassa, melhor controle da produção e do produto, não competem por recursos alimentares e substratos de baixo custo que podem ser utilizados como fontes nutricionais de cultivo para baratear o custo de produção (ROSSI et al., 2011; ATABANI et al., 2012; SITEPU et al., 2014b; BELLOU et al., 2016).

3.3.2 Cultivo de Mucorales para produção de lipídeos

Está bem estabelecido que representantes do filo Mucoromycota, como os gêneros *Umbelopsis*, *Cunninghamella* e *Mucor*, possuem a habilidade de acumular lipídios, além de produzirem valores significativos de ácidos graxos poli-insaturados em sua composição (KOSA et al., 2011; BHARATHIRAJA et al., 2017; KOSA et al., 2018). A Tabela 2 mostra os rendimentos de biomassa, lipídeos e ácidos poli-insaturados produzidos por alguns representantes do grupo.

Ratledge (2005) realizou uma triagem de mais de 300 fungos Mucoromycota, visando encontrar o melhor promissor na produção de ácido gama-linolênico (GLA), os gêneros *Cunninghamella*, *Mucor* e *Rhizopus* foram os gêneros promissores na produção de lipídeos. Ao avaliar o desempenho de algumas espécies, o rendimento de lipídios e GLA dos ácidos graxos variavam significadamente dentro de uma mesma espécie, por exemplo, das quatorze

cepas de *Mucor circinelloides*, o conteúdo de lipídios nas células variaram de 3 a 37% e o GLA variou de 8 a 22%, das dez cepas de *Mucor genevensis* Lendn., o percentual de lipídeos variaram de 2 a 27% e o GLA variou de 11 a 32%. Weete et al., (1998) rastrearam mais de 150 cepas de Mucoromycota para produção de GLA e mostraram que *Syzygites megalocarpus* Erhenb acumulou até 62% de GLA. Espécies do gênero *Mortierella* são bastante estudadas quanto à produção de ácido araquidônico (ARA), Eroshin et al., (1996) e Botha et al., (1999) estudaram 87 e 61 cepas de *Mortierella*, respectivamente, para produção desse ácido graxo poli-insaturado e em ambos os estudos a *M. alpina* Peyronel foi a espécie mais promissora.

Kosa et al. (2018), realizaram uma triagem de 100 cepas de Mucoromycota para avaliar o percentual de lipídeos totais, assim como produção de ácidos graxos de alto valor, foi verificado que *Mucor fragilis* Bainier e *Cunninghamella echinulata* Thaxt foram as melhores produtoras de GLA com 24,5% e 24,0%, respectivamente. Foi confirmado o potencial de *Mortierella alpina* na produção de ácido araquidônico (41,1% do total de ácidos graxos). Os pesquisadores ainda observaram a influência da baixa temperatura (15 °C) na produção ácido eicosapentaenoico, e verificaram um rendimento de até 11,0% de ácidos graxos totais em *M. humilis* Naumov. No mesmo estudo, foi mostrado que *Cunninghamella blakesleeana* Lendn. e *Umbelopsis vinacea* Arx produziram bons rendimentos de biomassa e de lipídeos totais com perfis adequados para produção de biodiesel.

Tabela 2 Produção de biomassa, teor de lipídeos totais e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) de táxons de Mucorales cultivados em diferentes substratos.

Mucorales	Substratos	Biomassa g/L	Lipídeos totais (%)	AGPI (%)	Referências
<i>Lichtheimia corymbifera</i> CCM 8077	Glicose e extrato de levedura	18	27	15	Kosa et al., 2018
<i>Amylomyces rouxii</i> (atual <i>Rhizopus arrhizus</i>) CCM F-220	Glicose e extrato de levedura	10	26	24	Kosa et al., 2018
<i>Absidia glauca</i> CCM 451	Glicose e extrato de levedura	13	47	27	Kosa et al., 2018
<i>Mucor circinelloides</i> VI04473	Batata hidrolisada e extrato de levedura	14,45	41,6	40,65	Tzimirotas et al., (2018)
<i>Mortierella vinacea</i> (<i>Umbelopsis vinacea</i>) PTCC 5262	Glicose e extrato de levedura	4,2	14,76	-	Nasr et al.,2017
<i>M. vinacea</i> PTCC 5262	Lactose e peptona	4,6	18,70	52,76	Nasr et al., 2017
<i>M. circinelloides</i> URM4182	Glucose e ácido glutâmico	4,23	44	20,5	Carvalho et al., (2015)
<i>Thamnidium elegans</i>	Água residual de fábrica de azeite	-	64,1	11,3	Bellou et al., 2014
<i>T.elegans</i>	Glicose	-	81,7	13,1	Bellou et al., 2014
<i>T.elegans</i> CCF-1465	Glicerol	2,5	37,2	23,4	Bellou et al., 2012
<i>Zygorhynchus moelleri</i> (<i>Mucor moelleri</i>) MUCL 143	Glicerol	0,7	25,7	28,5	Bellou et al., 2012
<i>Mortierella isabellina</i> (<i>Umbelopsis isabelina</i>)	Glicose e (NH ₄) ₂ SO ₄	10,9	48	16,7	Papanikolaou et al., (2007)
<i>Cunninghamella</i> <i>echinulata</i> ATHUM 4411	Glicose e (NH ₄) ₂ SO ₄	9,2	35	28,2	Papanikolaou et al., (2007)
<i>Mucor racemosus</i> CCF – 86	Glicose e íngreme de milho	10,4	13,9	22,3	Čertík et al.,1993
<i>Gongronella butleri</i> CCF - 413	Glicose e íngreme de milho	13,5	30,4	11,4	Čertík et al., 1993
<i>Rhizopus arrhizus</i> CCF – 465	Glicose e íngreme de milho	8,0	18,0	21,9	Čertík et al.,1993

Em outro estudo, a *Mortierella alpina* em substrato de palha de arroz em hidrolisada em fermentação submersa produziu bons rendimentos de lipídeos, sendo o rendimento de 40%, quando o resíduo após a hidrólise não passou pelo processo de desintoxicação e 26% com o resíduo hidrolisado desintoxicado (DIWAN et al., 2017). No estudo de Economou et al. (2011) a *U. isabellina* produziu 64% de lipídeos em casca de arroz hidrolisado com ácido e não desintoxicado.

3.4 QUITOSANA FÚNGICA

Os fungos são as maiores fontes de quitina no solo com cerca de 6-12% da biomassa da quitina, que está na faixa de 500-5000 kg / ha (SHAHIDI e ABUZAYTOUN, 2005; DHILLON et al., 2013). No entanto, mudanças fisiológicas decorrentes do ambiente natural assim como nas condições de fermentação durante um processo biotecnológico podem variar as quantidades de quitina (DHILLON et al., 2013). A parede celular de fungos corresponde a 20-45% de peso seco celular, ela determina a forma das células fúngicas, protege-as contra diferentes estresses e ataques microbianos (BARTNICKI-GARCIA e LIPPMAN, 1969; ZAMANI et al., 2008; KARIMI e ZAMANI, 2013). A parede celular corresponde a 80-90% de polissacarídeos (quitina, quitosana, celulose e β -Glucanos) 3-20% de proteínas (3-20%), e pequenas proporções de lipídeos, pigmentos e sais orgânicos (KARIMI e ZAMANI, 2013). De maneira interessante, a parede celular das leveduras apresenta como principais componentes as manoproteínas e glucanos, e a quitina representa apenas 1-2% do peso celular seco (KLIS, 1994). Os fungos zigospóricos, com base na composição polissacarídica da parede celular, são colocados na categoria quitina-quitosana (ZAMANI et al., 2008; KARIMI e ZAMANI, 2013).

Na célula fúngica, a quitosana e proteínas cobrem a quitina, devido a essa conformação, acredita-se que a quitosana proteja a quitina contra quitinases (ZAMANI et al., 2008), além de apresentar função semelhante do glucano na parede celular de outros microrganismos (KARIMI e ZAMANI, 2013). Segundo Zamani et al., (2008), a quitosana, devido a sua carga catiônica, pode ser responsável pelo acúmulo e armazenamento de diferentes

compostos aniônicos, como polifosfato e ácido poliglucurônico na parede celular de Mucorales.

A quitosana é um heteropolissacarídeo constituído principalmente de glicosamina e um número variável de resíduos de acetil-glicosamina (RUIZ-HERRERA, 2016), em que unidades de glicosamina estão presentes em maior proporção ou a sua distribuição na cadeia polimérica é tal que garante sua dissolução em soluções aquosas de ácido (LIZAEDI-MENDOZA et al., 2016). A estrutura química da quitosana (Figura 6) apresenta predominantemente grupos aminos que podem ser ionizados em meio ácido. Assim como a quitina, a quitosana apresenta uma estrutura cristalina rígida, uma vez que, forma ligações de hidrogênio inter e intramolecular com o grupo amina e grupos hidroxila (HEJAZI e AMIJI, 2003, CHOI, NAM e NAH, 2016).

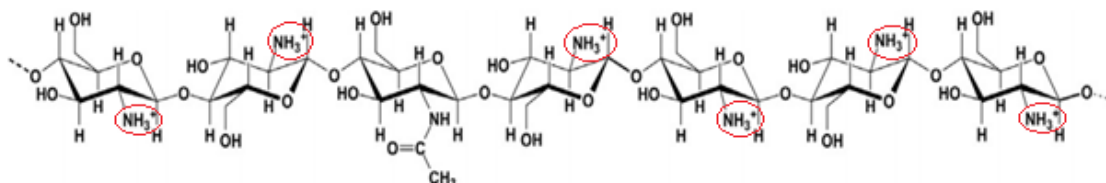


Figura 6. Estrutura química da quitosana.

Fonte: Lizardi-Mendoza et al., 2016

3.4.1 Biossíntese da parede celular em fungos zigospóricos

Assim como o exoesqueleto de artrópodes, a quitina é um componente estrutural da parede celular amplamente distribuída no Reino Fungi, ocorrendo em Mucoromycota, Ascomycota Wittaker e Basidiomycota. Na parede celular os polímeros de quitina estão associados covalentemente a microfibrilas de β-(1,3) glucano e forma um entrelaçado com glicoproteínas estabelecendo uma base estrutural que concede rigidez a parede celular (FREE 2013, LATG'E e BEAUVAIS 2014, S´ANCHEZ-VALLET, MESTERS e THOMMA, 2014).

A síntese da parede celular fúngica requer uma quantidade considerável de energia, portanto é estritamente regulada (S´ANCHEZ-VALLET, MESTERS e THOMMA, 2014). A quitina é sintetizada por enzimas chamadas de quitina

sintase, β -glicosiltransferases, localizadas na região apical da hifa, que são transportadas do citoplasma para a superfície da célula através de pequenas microvesículas, chamadas de quitossomas. (BARTNICKI-GARCIA, 2006, KARIMI e ZAMANI, 2013, S´ANCHEZ-VALLET, MESTERS e THOMMA, 2014). Em 1957 Glase e Brown, perceberam que a UDP-N-acetilglucosamina era utilizada como substrato para a produção de quitina em fungos (BARTINICKI-GARCIA RUIZ-HERRERA e BRACKER, 1979; BARTNICKI-GARCIA et al., 1984; SIETSMA et al., 1996)

De acordo com Karimi e Zamani (2013), a quitina sintase encontrasse em estado silencioso dentro dos quitossomas e devem ser ativadas através de proteases. Outro fator para a ativação dessas enzimas é a localização dos quitossomas, quando essas microvesículas alcançam um local desejado na superfície da célula são supostamente fundidas com a membrana plasmática, onde as quitina-sintases são ativadas (BARTINICKI-GARCIA RUIZ-HERRERA e BRACKER, 1979; BARTNICKI-GARCIA et al., 1984). Em seguida, as quitina-sintases ativadas na presença de cofatores como o íon de Mg^{2+} , obtêm UDP-GlcNAc a partir do citoplasma e sintetizam a quitina (KARIMI e ZAMANI, 2013).

Durante a síntese de quitina, as cadeias lineares do polissacarídeo são alongadas em direção ao espaço extracelular por adição de N-acetilglucosamina (S´ANCHEZ-VALLET, MESTERS e THOMMA, 2014). As cadeias de quitina com arranjos antiparalelos são subsequentemente ligadas através de ligações de hidrogénio e assim agrupam-se em microfibrilas com alta resistência ao deslocamento conferindo rigidez à parede celular (S´ANCHEZ-VALLET, MESTERS e THOMMA, 2014). Segundo Lenardon, Munro e Gow, (2010) a biossíntese de quitina é um processo complicado, devido à indispensabilidade de quitina em vários estágios de desenvolvimento e à complexidade da sua regulação.

A quitosana é um componente importante da parede celular em várias etapas do ciclo de vida de algumas espécies de fungos (CHRISTODOULIDOU et al., 1996, DHILLON et al., 2013) Das poucas espécies de fungos que sintetizam a quitosana, os Mucorales demonstraram produzir quitosana durante

a fase de crescimento (ORLOWSKI, 1991). A biossíntese de quitosana está intimamente ligada a quitina, uma vez que a quitosana é produzida através da desacetilação enzimática (ZAMANI et al., 2010). Considera-se que as enzimas quitina desacetilase estão próximas das regiões onde a quitina atravessa a membrana plasmática (ARAKI e ITO, 1974; KAFETZOPOULOS et al., 1993). À medida que a quitina é sintetizada, a enzima desacetilase converte-a em quitosana (DHILLON et al., 2013). Entretanto, em investigações *in vitro* a quitina desacetilase purificada de *Mucor indicus*, apresentou baixa atividade sobre a quitina cristalina (ARAKI e ITO, 1974, DAVIS e BARTNICKI-GARCIA, 1984; KAFETZOPOULOS et al., 1993). Segundo Karimi e Zamini (2013), a explicação mais plausível é a incapacidade de a enzima penetrar na estrutura cristalina da quitina. Além disso, Davis e Bartnicki-Garcia (1984) observaram que não houve produção significativa de quitosana com adição de quitina sintase e UDP-GlcNAc como substrato. Porém, quando trataram a quitina sintase com digitonina, um tipo de saponina, obtiveram uma elevada taxa de produção de quitosana. Os autores afirmam que a digitonina interagiu com os esteróis quitossomais, levando a desorganização da quitina sintase e formação de subunidades de quitina sintase dispersas.

Vários autores confirmam que as subunidades de quitina-sintase associadas sintetizam microfibrilas de quitina cristalinas que não são vulneráveis à desacetilação enzimática (ARAKI e ITO, 1974, BARTNICKI-GARCIA et al, 1979; BARTNICKI-GARCIA e BRACKER, 1984; DAVIS e BARTNICKI-GARCIA, 1984; KAFETZOPOULOS et al., 1993; RUIZ-HERRERA et al., 1977). Segundo Araki e Ito (1974) e Davis e Bartnicki-Garcia, (1984), a desorganização da quitina sintase promove o retardo da cristalização da quitina, favorecendo a ação da quitina desacetilase.

Em células vivas, a síntese de quitina e quitosana são determinadas pelo grau de organização das subunidades de quitina-sintase. Uma vez que, a quitosana é o polissacarídeo nitrogenado dominante na parede celular de alguns Mucorales, é provável que haja uma fração de quitina sintase dispersa na superfície celular (KARIMI e ZAMINI, 2013). A rota da biossíntese de quitina e quitosana em fungos estão descrita na Figura 7.

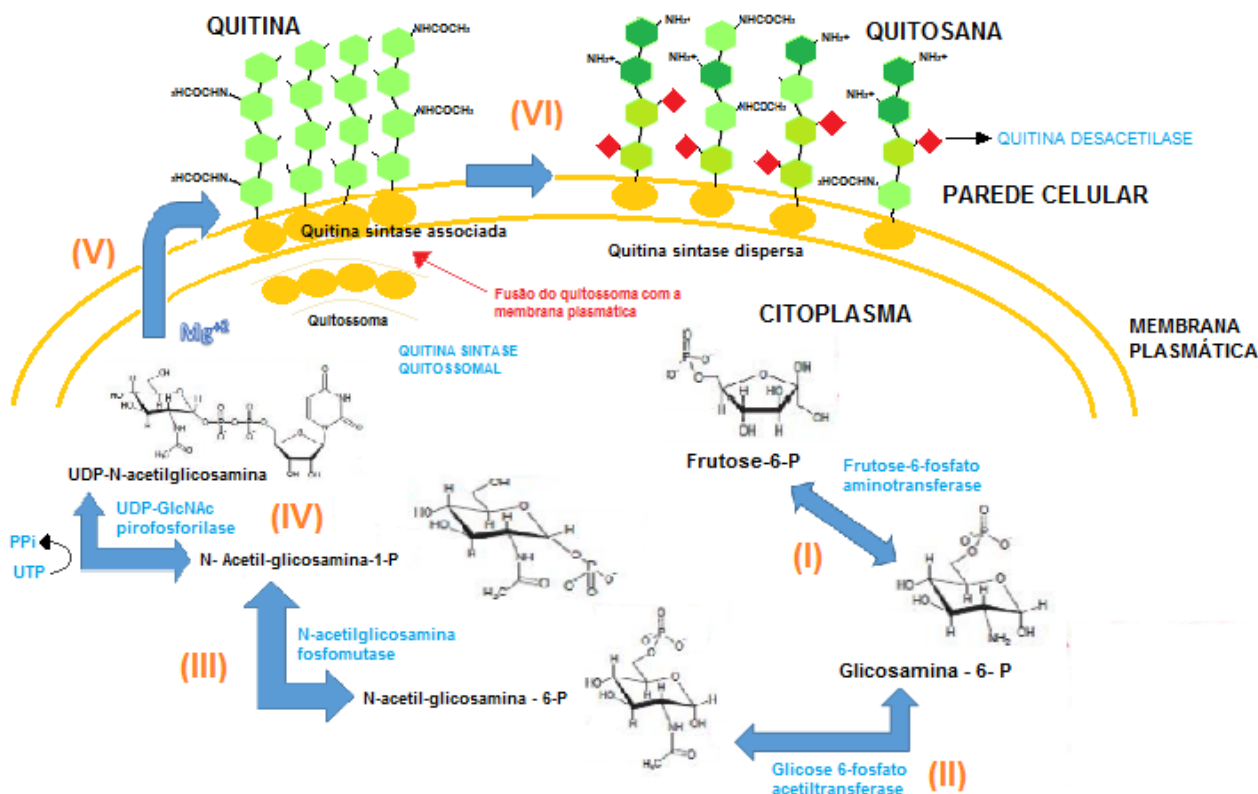


Figura 7. Biossíntese de quitina em fungo por quitina sintase, produção de quitosana através da fusão de quitossomas com membrana plasmática numa forma dispersa e subsequente desacetilação de quitina pela quitina desacetilase na parede celular. Adaptado de Bartnicki-Garcia, (1979).

3.4.2 Cultivo de Mucorales para produção de Quitosana

O potencial de diferentes fungos zigomicetos como fonte comercial de produção de quitosana foi avaliado por muitos pesquisadores. Fungos como *Absidia coerulea* Bainier, *Benjaminiella poitrasii* Arx, *Cunninghamella blakesleeana*, *Cunninghamella elegans* Lendn, *Gongronella butleri* Peyronel & Dal Vesco, *Mortierella isabelina* (nome atual *Umbelopsis isabelina*), *Rhizopus arrhizus var delemar* Boidin ex Wehmer & Hanzawa, *Rhizopus stolonifer* Ehrenb, *Rhizopus arrhizus var arrhizus* A.Fisch e entre outros apresentam de 6% a 11% de quitosana natural em sua parede celular com grau de desacetilações superiores a 87%, cultivados em meios de cultura sintéticos (glicose, extrato de levedura, extrato de malte, por exemplo) (MIYOSHI et al., 1992; DOIPHODE et al., 2009) e em meios alternativos (CARDOSO et al., 2012; BERGER et al., 2014).

Campos-Takaki e colaboradores (2014) ao analisarem a composição bioquímica da parede celular de fungos mucoraleanos, em meio de cultura sintético, como *A. blakesleeana* (nome atual *Lichtheimia hyalospora*), *Gongronella butleri* Peyronel & Dal Vesco, *Rhizopus arrhizus* A.Fisch, *Mucor javanicus* Wehmer, *Cunninghamella elegans* e *Syncephalastrum racemosum* Cohn ex J.Schot, observaram uma concentração de quitina entre 10 a 15,5% e o teor de quitosana variou de 26 a 28,2% nas paredes celulares. A maior produção de quitina e quitosana (43%) foram relatados em *L. hyalospora* Kerst. Hoffm., Walther & K.Voigt e *R. arrhizus*.

Os principais critérios consideráveis para a produção de quitosana a partir de fungos são: a escolha de um zigomiceto, em especial os representantes dos Mucorales, tipo da fermentação, fontes nutricionais para uma produção significativa de biomassa, condições e tempo de incubação e o método de extração (NWE, FURUIKE e TAMURA, 2010; GHORMADE, PATHAN e DESHPANDE, 2017).

Vários estudos voltados à otimização da obtenção de quitosana por fungos mucoraleanos são relatados na literatura (GHORMADE, PATHAN e DESHPANDE, 2017). Muzzarelli et al., (1994) ao cultivar *Absidia coerulea* Bainier em meio otimizado, obteve 6-7g/L de biomassa em 72 horas e 1,8g/L de quitosana com 95% de grau de desacetilação. Mais tarde, Kim et al., (2001), obteve 2,3 g/L de quitosana quando a *A. caerulea* cresceu em condições otimizadas, como pH 4,5 e agitação de 250 rpm. Emekawy et al., (2013) realizaram modelagem estatística e otimização dos nutrientes para a produção de quitosana com *A.caerulea*. A máxima produção de quitosana obtida foi de 0,18 g/L em 72 horas, porém com uma otimização adicional usando método de superfície de resposta e ampliação em um biorreator duplicou a produção dentro de 48 horas.

Nem e colaboradores (2002) estudaram a produção de quitosana por *Gongronella butleri* em fermentação sólida e submersa. Em fermentação sólida

utilizando batata doce e uréia como substratos, foram obtidos 29 g de biomassa seca por kg de substrato e um rendimento 12,7% de quitosana. Na fermentação submersa, a produção de biomassa foi duplicada, porém o rendimento de quitosana foi de 9,2%. O grau de desacetilação foi de 92% para ambos os casos.

Amorim et al, (2006) ao cultivarem *Cunninghamella bertholletiae* Stadel em caldo de cana-de-açúcar, obtiveram 128mg/g de quitosana em 48 horas de fermentação e, quando o fungo foi cultivado em glicose após 72h, obtiveram apenas 5,5% de quitosana. Stamford et al., (2007) ao utilizarem yam bean como substrato para obterem a máxima produção de biomassa de *Cunninghamella elegans*, obtiveram 6,6% de quitosana com 85% de grau de desacetilação. Em estudo anterior, Amorim et al., (2001), ao cultivar a *C. elegans* em meio com glicose, obteve apenas 2% de quitosana com grau de desacetilação em torno de 20% após 24horas de cultivo. Além dos fatores nutricionais, essas variações também podem ser ocasionadas devido aos métodos de extração, que também pode influenciar no grau de desacetilação e peso molecular (KHAN, PEH e CHNG, 2002; GHORMADE, PATHAN e DESHPANDE, 2017). Com o objetivo de obter quitosana de baixo peso molecular da biomassa *A. caerulea*, Niederhofer e MÜller (2004) sugeriram um método para a extração direta de quitosana utilizando pH alcalino e precipitação por etanol.

Em alguns casos a produção de biomassa não está relacionada à produção de quitosana. Cardoso et al., (2012) obteve uma produção significativa de biomassa de *Rhizopus arrhizus* utilizando concentrações maiores de milhocina e mel, porém o rendimento de quitosana foi baixo, cerca de 3% com 86% de desacetilação.

Doiphode et al., (2009) relataram produção de quitosana pelo fungo dimórfico de *Benjaminiella poitrasii*, um rendimento de 83mg/L. Posteriormente, Mane et al., (2017) estimaram parâmetros nutricionais e outros parâmetros de fermentação para a produção de biomassa e a produção de quitosana e aumentaram o rendimento para 510 mg /L.

3.5 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Resíduos são materiais que são descartados em atividades humanas provenientes de comércios, indústrias e residências, dispostos de forma sólida, líquida ou gasosa (LANGANKE, 2011). Com a grande urbanização mundial, as estatísticas do Banco Mundial estimam que a produção de resíduos alcance aproximadamente 2,6 bilhões de toneladas até o ano 2025, e ressaltam que valores expressivos na economia de qualquer país enfrentará cada vez mais problemas na gestão de grandes volumes de resíduos (DIWAN et al., 2018). Segundo o relatório do Banco Mundial, a coleta de lixo gasta em torno de US \$ 20 e 250 por tonelada, contudo os serviços de acondicionamento e descarregamento geralmente desembolsa de US \$ 20-350 por tonelada, distinguindo de países subdesenvolvidos a países desenvolvidos (DIWAN et al., 2018).

Dos resíduos gerados no Brasil, os resíduos agroindústrias somam aproximadamente 286,1 milhões de toneladas por ano, e cerca 1,7 bilhões de tonelada de resíduos oriundos da pecuária (RBRURAL, 2017). As técnicas de acondicionamento, como a queima e aterramentos sanitários, resultam em emissões de gases, como metano e CO₂, ou induzem à geração de resíduos tóxicos, como furanos, gases ácidos, dioxinas e partículas que ameaçam a saúde humana e ao meio ambiente (SCARLAT et al., 2015; RAVINDRAN et al., 2018).

Os resíduos agroindustriais são ricos em componentes nutricionais, como carboidratos, proteínas, vitaminas, fibras e minerais, variando de acordo com fonte (PANESAR e PANESAR, 2015; BHARATHIRAJA et al., 2017; RAVINDRAN et al., 2018). Através de iniciativas de organizações governamentais associadas a agricultores e pesquisadores, os resíduos agroindustriais têm sido destinados como matérias-primas naturais em bioprocessos, como substratos, devido o baixo custo, reduzindo o custo total de produção de 38% a 73%. Assim, a utilização de resíduos agroindústrias em meios de cultura tem sido explorada em vários estudos na geração de produtos de valor agregado, como enzimas, ácidos orgânicos, proteínas, carboidratos e

produtos do metabólito secundário (PANESAR e PANESAR, 2015; RAVINDRAN et al., 2018).

3.5.1 Manipueira

A mandioca (*Manihot esculenta* crantz) é uma planta tropical de raízes tuberosas amiláceas ricas em carboidratos (SRINIVAS e ANANTHARAMAN, 2005; WANG et al., 2016). As plantas da mandioca crescem abundantemente em condições adequadas, porém apresentam capacidade de se adaptarem em ambientes de estresse abiótico e biótico (solos com estresse hídrico e com baixa fertilidade) (WANG et al., 2016; BEZERRA et al., 2017). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mandioca, sendo a maior parte das raízes da mandioca utilizadas no processamento de amido e farinha, que gera uma enorme quantidade de resíduos sólidos e líquido (manipueira) (BEZERRA et al., 2017), uma porção mínima da produção de mandioca é usada para produção de etanol (BEZERRA et al., 2017).

A manipueira ou água de extração da fécula é um resíduo líquido amarelo gerado do processo de fabricação de farinha, pela prensagem da massa da mandioca (CEREDA, 1994, BRITO, SILVA e CEREDA et al., 2015, SILVA et al., 2018). Apresenta uma composição nutricional atrativa para crescimento de microrganismos, devido a presença de carboidratos, nitrogênio e minerais, como fósforo, potássio, magnésio (DUARTE et al., 2012, SILVA et al., 2018), porém dependendo dos cultivares apresenta altos teores de glicosídeos cianogênicos, como a linamarina (CASSONI e CEREDA, 2011).

Vários metabólitos fermentativos são relatados em literatura, como biossurfactantes (NITSCHKE e PASTORE, 2006; COSMANN et al., 2017; MAIA et al., 2018; ARAÚJO et al., 2019), enzimas (RUEDAS et al., 2017; DE OLIVEIRA GUSMÃO et al., 2018), Biogás (JIRAPRASERTWONG, MAITRIWONG e CHAVADEJ, 2019), utilizando a manipueira como substrato e vários estudos investigam o potencial do resíduo na produção de lipídeos por microrganismos. Silva et al. 2018, avaliaram o efeito de diferentes concentrações de manipueira sobre a produção de biomassa e lipídios por *Rhodotorula mucilaginosa*. O microrganismo produziu 4,1, 6,95, 5,77 g.L⁻¹ de

biomassa e 13,33%, 7,71% e 8,47% de lipídios nos cultivos com 50%, 75% e 100% de manipueira, respectivamente. No estudo de Li et al. 2010, a *Rhodotorula mucilaginosa* acumulou um bom rendimento de lipídeos utilizando a manipueira. Foram produzidos 47,9% e 52,9% de lipídeos totais em cultivos em batelada e em batelada alimentada, respectivamente. Montero-Rodríguez et al. (2016) obtiveram rendimentos lipídicos superiores a 40% com *Serratia marcescens* UCP 1549 cultivada em manipueira e óleo residual.

A manipueira foi avaliada por Berger et al. (2014) quanto a produção de biomassa, quitina e quitosana. O maior rendimento de biomassa (9,93 g / L) foi obtida em concentrações de 5% de manipueira e 8% de milhocina, e os maiores rendimentos de quitina e quitosana foram 89,39 mg / g e 57,88 mg / g, respectivamente, na condição com maior concentração de manipueira (10%) e menor concentração de milhocina (4%).

3.5.2 Milhocina

O milho (*Zea mays*) sendo uma das principais culturas agrícolas comerciais, é cultivado em grandes quantidades em todo o mundo (DHILLON e KAUR, 2016). A espiga de milho (núcleo central da espiga de milho) (rendimento: 1,42–1,53 seco tha – 1) e casca de milho (cobertura externa de milho) são os dois principais subprodutos e constituem 20-30% da planta de milho (Samanta et al. al., 2012).

A milhocina é gerada na extração do amido de milho pelo processo de trituração úmida (SINGH e KENNEDY, 2019), após o milho ser descascado, limpo e posteriormente fracionado por flotação e infusão em condições de pH 4 e temperatura entre 45 a 50° C com SO₂, a matéria prima residual (resíduos sólidos) é reaproveitada com o uso da água gerada do processo num fluxo contra-corrente para evitar perdas e minimizar os problemas de descarte de esgoto (LIGGET & KOFFLER, 1948). A existência de fermentações ocorre em muitos pontos do processo, o que explica a existência de ácido láctico (LIGGET & KOFFLER, 1948).

A milhocina é um resíduo líquido viscoso composto por proteínas (40%), aminoácidos (16%), ácido láctico (4,8%), maltotriose (4,0), dextrose (1,2%),

maltobiose (0,64%), glicerol (0,35%), e ácido acético (0,06%)(AMARTEY e JEFFRIES, 1994; MIRZA e MUSHTAQ, 2006). Além de conter vitaminas, em especial do complexo B (exceção da tiamina), tornando-a uma excelente fonte de nitrogênio de baixo custo para processos fermentativos, (LIGGET & KOFFLER, 1948; SHARMA et al., 2013, SINGH e KENNEDY, 2019). O custo da milhocina em comparação a outras fontes de nitrogênio ,como o extrato de levedura, é muitas vezes menor (LIGGET e KOFFLER, 1948). Os aminoácidos predominantes no resíduo consistem em alanina (representada por 1/4 de nitrogênio), arginina, ácido aspártico, cistina, ácido glutâmico, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina e (CARDINAL e HEDRICK; LIGGET e KOFFLER, 1948). Os principais minerais presentes na milhocina são o alumínio, cálcio, cobre, ferro, chumbo, magnésio, manganês, molibdênio, fosforo, potássio e zinco (LIGGET e KOFFLER, 1948).

Uma das aplicações mais importante da milhocina na microbiologia foi descoberta por Moyer e Coghill (1946), em que observaram que a adição do resíduo no meio Czapek-Dox modificado aumentou significadamente os rendimentos de penicilina (GAYNES, 2017). Esta descoberta estimulou a muitos pesquisadores a tentar isolar o componente ativo presente na milhocina que influenciava positivamente na biossíntese da penicilina por *Penicillium chrysogenum* (KOFFLER et al., 1945; GAILEY et al., 1946; STEFANIAK et al., 1946). Tais tentativas não tiveram sucesso, uma vez que vários fatores presentes no resíduo (principalmente minerais e vitaminas), e não apenas um, poderiam influenciar no metabolismo do microrganismo (LIGGET e KOFFLER, 1948).

Vários metabólitos fermentativos são relatados em literatura, como biossurfactantes (SANTOS et al., 2013;), enzimas (EDWINOLIVER et al., 2009; MALDONADO et al., 2014), utilizando glicerol bruto como substratos e vários estudos investigam o potencial desse substrato na produção de lipídeos por fungos. Souza et al., 2016, avaliaram a variação de concentrações de óleo residual e milhocina sobre a produção de biomassa e lipídeos por *C. lipolytica*. A concentração máxima de milhocina (5%) e de óleo residual (8%) influenciaram positivamente sobre a produção de biomassa (12,71 g/L) e no

ácumulo de lipídeos (4,96 g/L). Andrade et al. (2018) ao cultivarem a *Rhodotorula glutinis* em milhocina (6%) e soro de leite (8%), a levedura obteve 34,2 % de lipídeos em sua biomassa seca. Lima et al. (2015) utilizaram soro de leite e milhocina como substratos para produção de lipídeos por *Candida glabrata* e obteve 21,5% de lipídeos rico em ácidos graxos poli-insaturados.

Vários estudos comprovam a influencia positiva da milhocina como fonte de nitrogênio para produção de quitosana por fungos mucorales. No estudo de Berger et al. (2014) , a *Cunninghamella elegans* produziu 57,88 mg / g de quitosana no cultivo com milhocina como fonte de nitrogênio. Berger et al. (2018), mostraram que o suco de cascas de mamão (25%) e milhocina (1%) favoreceram o crescimento e produção de quitosana por vários mucorales. Em destaque, a *C. elegans* produziu 15,63 mg/g de quitosana, em seguida *S. racemosum*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus arrhizus*, *L. hyalospora* com 13,96mg/g, 13,05mg/g, 12,56 mg/g e 12,04 mg/g, respectivamente. Após seleção da *C. elegans* para inclusão em experimentos de otimização, o rendimento de quitosana subiu para 37,25 mg/g usando 9,43 % de milhocina e 42,5% de suco de cascas de mamão.

3.5.3 Glicerol residual do biodiesel

Segundo a Industry Arc, estima-se que o mercado global de Biodiesel ultrapasse US \$ 47 bilhões até 2023, com crescimento estimado de 7,3% entre 2018 e 2023. Koutinas et al., 2014 afirmam que em 2021 a geração global biodiesel seja de até 30×10^6 toneladas, liberando 3×10^6 toneladas de glicerol como subproduto.

O glicerol bruto é uma mistura de glicerina (65-85%), metanol e sabão, além de conter elementos macro, tais como cálcio, potássio, magnésio, sódio e enxofre (ROSSI et al., 2011; NICOL, MARCHAND e LUBITZ, 2012). Vários metabólitos fermentativos são relatados em literatura, como etanol (ITO et al., 2015), amilase (KIM et al. 2000) utilizando glicerol bruto como substratos e vários estudos investigam o potencial desse substrato na produção de lipídeos por fungos. Estudos primórdios foram desenvolvidos por Papanikolaou et al. (2008) em que avaliaram o glicerol bruto como substrato no cultivo de *Y.*

lipolytica e *U. isabellina* na produção de lipídeos. A *U. isabellina* acumulou 51% de lipídeos em sua biomassa, enquanto que a levedura *Y. lipolytica* obteve um bom rendimento de lipídeos insaturados. Rakicka et al., (2015) usando uma cepa modificada de *Y. lipolytica*, cultivada com limitação de nitrogênio e com glicerol como fonte de carbono, acumulou 24,2 g/L de lipídeos que corresponde a uma taxa de produtividade de 0,43 g /L / h de lipídeos.

A disponibilidade do glicerol residual é desprovida de limitações sazonais e geográficas, o que o torna uma fonte de carbono favorável (DIWAN et al., 2018). A bioconversão do glicerol em biomassa microbiana oleaginosa é vantajosa, uma vez que a molécula de três carbonos (triose), apresentando uma via metabólica mais rápida na glicólise, o que requer menos enzimas que a glicose para a conversão em gliceraldeído 3-P, como mostra na Figura 8.

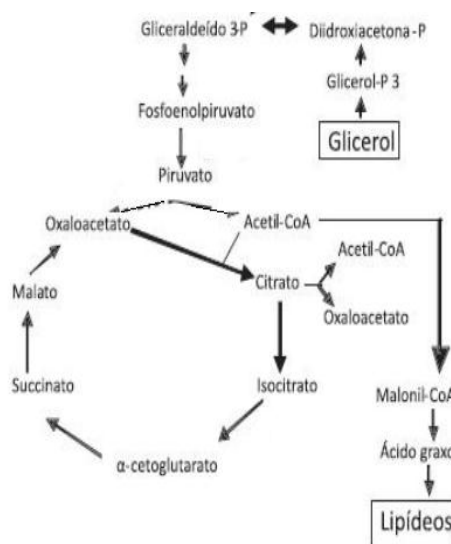


Figura 8. Esquema da produção de lipídeos a partir do glicerol

Fonte:Fontes et al., 2008

De acordo com Fakas et al., (2009), assim que o glicerol entra dentro das células fúngicas, por difusão facilitada ou por transporte ativo, ele é fosforilado ou catabolizado pela via oxidativa. Na via de fosforilação, como mostrado na figura 8, a enzima glicerol quinase fosforila o glicerol, gerando o glicerol-3-fosfato. A enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase então oxida a

triose em di-hidroxiacetona fosfato. Na via oxidativa, o glicerol é convertido em dihidroxiacetona pelo glicerol desidrogenase e posteriormente em di-hidroxiacetona fosfato pela enzima di-hidroxiacetona quinase.

Até o momento, o uso de glicerol residual para produção quitosana fúngica não foi relatada em literatura. No entanto, Roca et al. (2012), foram os primeiros a avaliarem a influencia do glicerol bruto sobre produção de biomassa para extração de quitina-glucana pela levedura *Pichia pastoris*. O rendimento de biomassa foi de 0,55 g de biomassa/g de glicerol e 0,63 g de biomassa/g de glicerol em batelada e em batelada alimentada, respectivamente, e conteúdo de quitina-glucana de 18 e 26% em batelada e em batelada alimentada, respectivamente. Em estudo anterior, Celik et al. (2008), observaram que a *P. pastoris* cultivada em meio contendo glicerol bruto como fonte de carbono (0,57 g de biomassa /g de substrato), e menores rendimentos (0,44 g de biomassa/ g de substrato) foram obtidos com glicerol puro, evidenciando que nutrientes adicionais no glicerol bruto influenciou positivamente sobre o crescimento da levedura.

4. REFERÊNCIAS

ADARME-VEGA, T. Catalina; THOMAS-HALL, Skye R.; SCHENK, Peer M. Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. **Current opinion in biotechnology**, v. 26, p. 14-18, 2014.

AHMAD, Md Faruque. Ganoderma lucidum: A Macro Fungus with Phytochemicals and Their Pharmacological Properties. In: **Plant and Human Health, Volume 2**. Springer, Cham, 2019. p. 491-515.

AKPINAR-BAYIZIT, A. Fungal lipids: the biochemistry of lipid accumulation. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 5, n. 5, p. 409, 2014.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana et al. Antifungal susceptibility profile of human-pathogenic species of *Lichtheimia*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3058-3060, 2010.

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. 1996. Introductory mycology. 4th ed. John Wiley & Sons, New York.

ALVES, MARIA H.; TRUFEM, SANDRA FB; MILANEZ, ADAUTO I. Táxons de *Mucor* Fresen.(Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil. **Rev Bras Bot**, v. 25, n. 2, p. 147-160, 2002.

ALVES, Maria Helena et al. Detection of extracellular protease in *Mucor* species. **Revista iberoamericana de micología**, v. 22, n. 2, p. 114, 2005.

AMARTEY, Samuel; JEFFRIES, Thomas W. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. **Biotechnology letters**, v. 16, n. 2, p. 211-214, 1994.

AMBROSIO, S. T.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. **Bioresource technology**, v. 91, n. 1, p. 69-75, 2004.

ANDRADE, R. F. S. et al. Simultaneous production of surface active agent and lipids by *Rhodotorula glutinis* UCP/WFCC 1556. **Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology**, p. 144, 2018.

ANRAKU, Makoto et al. Antioxidant and renoprotective activity of chitosan in nephrectomized rats. **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 1, p. 302-304, 2012.

ANRAKU, Makoto et al. Antioxidant effects of a dietary supplement: Reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 104-109, 2009.

ANRAKU, Makoto et al. Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. **Carbohydrate polymers**, v. 83, n. 2, p. 501-505, 2011.

ANRAKU, Makoto et al. Effects of chitosan on oxidative stress and related factors in hemodialysis patients. **Carbohydrate polymers**, v. 112, p. 152-157, 2014.

ARAKI, Yoshio; ITO, Eiji. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: enzymatic deacetylation of chitin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 56, n. 3, p. 669-675, 1974.

ARAÚJO, Hélvia WC et al. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial cell factories**, v. 18, n. 1, p. 2, 2019.

ATABANI, Abdelaziz E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012.

ATHENAKI, Maria et al. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. **Journal of applied microbiology**, v. 124, n. 2, p. 336-367, 2018.

BANKS, Isaac R. et al. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 11, p. 1902-1912, 2005.

BANO, Ijaz et al. Preparation, characterization and evaluation of glycerol plasticized chitosan/PVA blends for burn wounds. **International journal of biological macromolecules**, v. 124, p. 155-162, 2019.

BARTNICKI-GARCIA S, BRACKER CE. Unique properties of chitosomes. In: Nombela C, editor. *Microbial cell wall synthesis and autolysis*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1984. p. 101–12.

BARTNICKI-GARCIA, S.; LIPPMAN, Eleanor. Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. **Science**, v. 165, n. 3890, p. 302-304, 1969.

BARTNICKI-GARCIA, S.; RUIZ-HERRERA, J.; BRACKER, C. E. Chitosomes and chitin synthesis. **Fungal walls and hyphal growth**, p. 149-168, 1979.

BARTNICKI-GARCIA, Salomon et al. Chitosomes from the wall-less “slime” mutant of *Neurospora crassa*. **Archives of microbiology**, v. 139, n. 2, p. 105-112, 1984.

BARTNICKI-GARCIA, Salomon. Chitosomes: past, present and future. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 7, p. 957-965, 2006.

BELLOU, Stamatia et al. Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by Zygomycetes grown on glycerol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 1, p. 146-158, 2012.

BELLOU, Stamatia et al. Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. **Current opinion in Biotechnology**, v. 37, p. 24-35, 2016

BELLOU, Stamatia et al. The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by Zygomycetes. **Journal of Biotechnology**, v. 170, p. 50-59, 2014.

BEOPOULOS, Athanasios et al. Identification and characterization of DGA2, an acyltransferase of the DGAT1 acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase family in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. New insights into the storage lipid metabolism of oleaginous yeasts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1523-1537, 2012.

BEOPOULOS, Athanasios; CHARDOT, Thierry; NICAUD, Jean-Marc. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 692-696, 2009

BEOPOULOS, Athanasios; NICAUD, Jean-Marc. Yeast: A new oil producer?. **Oléagineux, Corps gras, Lipides**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2012.

BERGER, Lúcia et al. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2771-2792, 2014.

BERGER, Lúcia Raquel Ramos et al. Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 635-641, 2018.

BEZERRA, Márcio GS et al. Cassava wastewater as organic fertilizer in 'Marandu'grass pasture. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 6, p. 404-409, 2017.

BHARATHIRAJA, S. et al. Production of enzymes from agricultural wastes and their potential industrial applications. In: **Advances in food and nutrition research**. Academic Press, 2017. p. 125-148.

BO, Marzia et al. Isolation and identification of chitin in the black coral *Parantipathes larix* (Anthozoa: Cnidaria). **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 1, p. 129-137, 2012.

BONUGLI-SANTOS, Rafaella C. et al. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 269, 2015.

BOTHA, Alfred et al. An isolation procedure for arachidonic acid producing *Mortierella* species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 75, n. 3, p. 253-256, 1999.

BRACKER, Charles E.; RUIZ-HERRERA, Jose; BARTNICKI-GARCIA, Salomon. Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 12, p. 4570-4574, 1976.

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

BROWN, Mark A.; DAYA, Mohamud R.; WORLEY, Joseph A. Experience with chitosan dressings in a civilian EMS system. **The Journal of emergency medicine**, v. 37, n. 1, p. 1-7, 2009.

BUI, Vu Khac Hoang; PARK, Duckshin; LEE, Young-Chul. Chitosan Combined with ZnO, TiO₂ and Ag Nanoparticles for Antimicrobial Wound Healing Applications: A Mini Review of the Research Trends. **Polymers**, v. 9, n. 1, p. 21, 2017.

BURANASUKHON, Wiphupat et al. Wound healing activity of *Pluchea indica* leaf extract in oral mucosal cell line and oral spray formulation containing nanoparticles of the extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1767-1774, 2017.

BURKUS, Zvonko; TEMELLI, Feral. Determination of the molecular weight of barley β -glucan using intrinsic viscosity measurements. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 1, p. 51-57, 2003.

CAMPOS-GÓNGORA, Eduardo et al. Characterization of chitin synthases from *Entamoeba*. **Protist**, v. 155, n. 3, p. 323-330, 2004..

CARLILE, M. J. The success of the hypha and mycelium. In: **The growing fungus**. Springer Netherlands, 1995. p. 3-19.

CARVALHO, Ana KF et al. Performance of whole-cells lipase derived from *Mucor circinelloides* as a catalyst in the ethanolysis of non-edible vegetable oils under batch and continuous run conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 287-294, 2015.

CASSONI, Vanessa; CEREDA, Marney Pascoli. Avaliação do processo de fermentação acética da manipueira. **Energia na Agricultura**, v. 26, p. 101-113, 2011.

CASTILLO, Natalia A.; VALDEZ, Alejandra L.; FARIÑA, Julia I. Biopolymers of Microbial Origin. **Advances in Physicochemical Properties of Biopolymers (Part 2)**, p. 109, 2017.

CELIK, Eda et al. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 9, p. 2985-2990, 2008.

CEREDA, M.P. (1994), Resíduos da industrialização de mandioca no Brasil. In: Resíduos da Industrialização da mandioca. São Paulo. Editora Paulicéia, p.28-34.

ČERTÍK, M.; BERHAN, S. Sereke; ŠAJBIDOR, J. Lipid production and fatty acid composition of selected strains belonging to Mucorales. **Acta biotechnologica**, v. 13, n. 2, p. 193-196, 1993.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Kinetic analysis of oil biosynthesis by an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 224-230, 2000

CHEN, Po-Yu et al. Structure and mechanical properties of crab exoskeletons. **Acta biomaterialia**, v. 4, n. 3, p. 587-596, 2008.

CHO, Yong-Woo et al. Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. **Biomaterials**, v. 20, n. 22, p. 2139-2145, 1999.

CHOI, Changyong; NAM, Joung-Pyo; NAH, Jae-Woon. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 33, p. 1-10, 2016.

CHRISTODOULIDOU, Anna; BOURIOTIS, Vassilis; THIREOS, George. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 49, p. 31420-31425, 1996.

COSMANN, Natássia Jersak et al. Use of biosurfactant surfactin produced from cassava wastewater for anaerobic treatment of effluent from a poultry slaughterhouse. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 224-231, 2017.

DAVIS, L. L.; BARTNICKI-GARCIA, S. The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*. **Microbiology**, v. 130, n. 8, p. 2095-2102, 1984.

DE ANDRADE SILVA, Cinthia Aparecida et al. Physiology of *Lichtheimia ramosa* obtained by solid-state bioprocess using fruit wastes as substrate. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 4, p. 727-734, 2014.

DE LIMA, Catarina LF et al. DESCRIPTION OF MUCOR PERNAMBUCOENSIS (MUCORALES, MUCOROMYCOTA), A NEW SPECIES ISOLATED FROM THE BRAZILIAN UPLAND RAINFOREST. **Phytotaxa**, v. 350, n. 3, p. 274-282, 2018.

DE OLIVEIRA GUSMÃO, Robert et al. Filamentous fungi producing enzymes under fermentation in cassava liquid waste. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 40, p. e41512, 2018.

DHILLON, Gurpreet S.; KAUR, Surinder (Ed.). **Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production: apply and exploit the emerging and valuable use options of waste biomass**. Academic Press, 2016.

DHILLON, Gurpreet Singh et al. Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 379-403, 2013.

DIWAN, Batul; PARKHEY, Piyush; GUPTA, Pratima. Platform Study on the Development of a Nondetoxified Rice Straw Hydrolysate to Its Application in Lipid Production from *Mortierella alpina*. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 1, p. 1225-1234, 2017.

DOIPHODE, N. et al. Chitosan production using a dimorphic zygomycetous fungus *Benjaminiella poitrasii*: role of chitin deacetylase. **Asian Chitin J**, v. 5, p. 19-26, 2009.

DOMSCH, K.H., W. GAMS; T.H. ANDERSON. Compendium of Soil Fungi. – **IHW-Verlag**, Germany. EICKER, A. 2007.

DUARTE, De S. et al. Uso de diferentes doses de manipueira na cultura da alface em substituição à adubação mineral. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 16, n. 3, 2012.

EDWINOLIVER, N. G. et al. Corn steep liquor as a nutrition adjunct for the production of *Aspergillus niger* lipase and hydrolysis of oils thereof. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10658-10663, 2009.

EGAN, Áine M. et al. Prawn shell chitosan exhibits anti-obesogenic potential through alterations to appetite, affecting feeding behaviour and satiety signals in vivo. **PLoS one**, v. 11, n. 2, p. e0149820, 2016.

ELLIS, J.J., and HESSELTINE, C.W. Species of *Absidia* with ovoid sporangiospores. II. **Sabouraudia** 5: 59-77, 1966.

ELLIS, J.J., and HESSELTINE, C.W. The genus *Absidia*: globose-spored species. **Mycology** 57: 222-235, 1965.

EL-RAHIM, Wafaa M. Abd et al. Identification and characterization of two peroxidases from *Lichtheimia corymbifera*. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 18, p. 100995, 2019.

EROSHIN, V. K. et al. Arachidonic-acid production by species of *Mortierella*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 91-96, 1996.

ESSICK, Eric E.; SAM, Flora. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 3, n. 3, p. 168-177, 2010.

FEOFILOVA, E. P. The fungal cell wall: modern concepts of its composition and biological function. **Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 711-720, 2010.

FERREIRA, Jorge A. et al. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. **Bioresource technology**, v. 135, p. 523-532, 2013.

FINCO, Ana Maria de Oliveira et al. Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 656-671, 2017.

FMI (2016) Market Research Report Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) Market: Rising Demand for Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids Fuelling Market Growth: Global Industry Analysis & Opportunity Assessment, 2018–2023

GADES, Matthew D.; STERN, Judith S. Chitosan supplementation and fat absorption in men and women. **Journal of the American dietetic Association**, v. 105, n. 1, p. 72-77, 2005.

GAILEY, F. B. et al. A Comparison of Penicillin-producing Strains of *Penicillium notatum*-chrysogenum. **Journal of bacteriology**, v. 52, n. 1, p. 129, 1946.

GALLAHER, Daniel D. et al. A glucomannan and chitosan fiber supplement decreases plasma cholesterol and increases cholesterol excretion in overweight normocholesterolemic humans. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 5, p. 428-433, 2002.

GARAY, Luis A.; BOUNDY-MILLS, Kyria L.; GERMAN, J. Bruce. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: a mechanistic approach and future perspectives. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 13, p. 2709-2727, 2014.

GARCIA, Nayara Fernanda Lisboa et al. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. **Industrial crops and products**, v. 122, p. 49-56, 2018.

GAYNES, Robert. The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849, 2017.

GENG, C. et al. Chronic subcutaneous infection due to *Lichtheimia* ramosa. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. 1, p. e26-e29, 2019.

GHORMADE, V.; PATHAN, E. K.; DESHPANDE, M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production?. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. Chitosan Market Size to Exceed \$5.1.BN by 2024. Disponível em < <https://www.gminsights.com/pressrelease/chitosan-market> > Acesso em 10/03/2019

GLOBAL MARKET INTELLIGENCE. Beta-glucan: Global Market Intelligence (2012-2022). Disponível em < <https://www.giiresearch.com/report/spro370882-beta-glucan-global-market-intelligence> > Acesso em 10/03/2019

GOMES, Marisa ZR; LEWIS, Russell E.; KONTOYIANNIS, Dimitrios P. Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-Rhizopus, -Mucor, and *Lichtheimia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 411-445, 2011.

GONÇALVES, Fabiano Avelino et al. Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase-producing *Lichtheimia* ramosa strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 377-384, 2013.

Grand View Research. Omega 3 market analysis and segment forecasts to 2020, pp 1–34. Disponível em: <http://www.grandviewresearch.com>

GROSSI, O. et al. Disseminated mucormycosis due to *Lichtheimia corymbifera* during ibrutinib treatment for relapsed chronic lymphocytic leukaemia: a case report. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 2, p. 261-263, 2019.

GUTIÉRREZ, Tomy J. Chitosan applications for the food industry. **Chitosan: derivatives, composites and applications**. Wiley-Scrivener Publisher, p. 185-232, 2017.

HALL, M. J., & RATLEDGE, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida 107*) growing on glucose under various conditions in a one- and two-stage continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 33, No. 3, pp. 577-584, 1977.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants—quo vadis?. **Trends in pharmacological sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HEJAZI, Radi; AMIJI, Mansoor. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 89, n. 2, p. 151-165, 2003.

HERMET, Antoine et al. Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. **Fungal biology**, v. 116, n. 6, p. 692-705, 2012.

HESELTIME, C. W.; ELLIS, J. J. Mucorales. **The fungi**, v. 4, p. 187-217, 1973.

HESELTIME, C.W., and ELLIS, J. J. The genus *Absidia*: *Gongronella* and cylindrical-spored species of *Absidia*. **Mycology**. 56: 568-601, 1964.

HESELTIME, C.W., and ELLIS, J. J. Species of *Absidia* with ovoid sporangiospores. I. **Mycology**. 58:761-785, 1966.

HESELTIME, C.W., and ELLIS, J.J. Notes on Mucorales, especially *Absidia*. **Mycology**. 53: 406-426, 1961.

HIBBETT, David S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HOFFMANN, K, G. WALTHER, and VOIGT, K. *Mycocladus* vs. *Lichtheimia*: a correction (Lichtheimiaceae fam. nov., Mucorales, Mucoromycotina). **Mycol. Res.** 113: 277-278, 2009.

HOFFMANN, K. et al. The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 30, p. 57, 2013.

HOFFMANN, K.G., DISCHER, S., VOIGT, K. Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, the Mycocladiaceae fam. nov., **Mycological Research** 111: 1169-1183, 2007.

HOLLMANN, M. et al. Detection of 3-nitropropionic acid and cytotoxicity in *Mucor circinelloides*. **Mycotoxin research**, v. 24, n. 3, p. 140, 2008.

HR, Jafari Naveh et al. Both omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids stimulate foot wound healing in chronic diabetic rat. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 14, p. 1713-1717, 2011.

HUANG, Chao et al. 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, Chao et al. 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.

JAMES, Timothy Y. et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 818, 2006.

JANIS, J. E. et al. The basic science of wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 12S-34S, 2006.

JIN, Mingjie et al. Production of High-Value Polyunsaturated Fatty Acids Using Microbial Cultures. In: **Microbial Lipid Production**. Humana, New York, NY, 2019. p. 229-248.

JIRAPRASERTWONG, Achiraya; MAITRIWONG, Kiatchai; CHAVADEJ, Sumaeth. Production of biogas from cassava wastewater using a three-stage upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **Renewable energy**, v. 130, p. 191-205, 2019.

KAATS, Gilbert R.; MICHALEK, Joel E.; PREUSS, Harry G. Evaluating efficacy of a chitosan product using a double-blinded, placebo-controlled protocol. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 25, n. 5, p. 389-394, 2006.

KAFETZOPOULOS, Dimitris; MARTINO, Aggeliki; BOURIOTIS, Vassilis. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 7, p. 2564-2568, 1993.

KARIMI, Keikhosro; ZAMANI, Akram. *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 4, p. 466-481, 2013.

KENDRICK, B. The Fifth Kingdom. **Sidney-by-the-Sea British Columbia, Canada, V8L 1M8**, 3 ed. 2000.

KIETZMANN, M. Improvement and retardation of wound healing: effects of pharmacological agents in laboratory animal studies. **Vet Dermatol**, v. 10, p. 83-88, 1999.

KLINE, Kimberly A.; BOWDISH, Dawn ME. Infection in an aging population. **Current opinion in microbiology**, v. 29, p. 63-67, 2016.

KLIS, Frans M. Cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 7, p. 851-869, 1994.

KOFFLER, H. et al. Chemical changes in submerged penicillin fermentations. **Journal of bacteriology**, v. 50, n. 5, p. 517, 1945.

KOPACIC, Samir et al. Application of Industrially Produced Chitosan in the Surface Treatment of Fibre-Based Material: Effect of Drying Method and Number of Coating Layers on Mechanical and Barrier Properties. **Polymers**, v. 10, n. 11, p. 1232, 2018.

KOSA, Gergely et al. High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low-and high-value lipids. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 66, 2018.

KOSA, Gergely et al. High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low-and high-value lipids. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 66, 2018.

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

LEE, Chia-Jung et al. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. **Food chemistry**, v. 124, n. 3, p. 833-841, 2011.

LEE, Soo Chan et al. Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003625, 2013.

LENARDON, Megan D.; MUNRO, Carol A.; GOW, Neil AR. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 4, p. 416-423, 2010.

LI, Bo et al. New C13 lipids from the marine-derived fungus *Trichoderma harzianum*. **Journal of Asian natural products research**, v. 17, n. 5, p. 468-474, 2015.

LI, Mei et al. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and bioenergy**, v. 34, n. 1, p. 101-107, 2010.

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

LIMA, Diogo Xavier et al. Diversity of basal fungal order Mucorales (Mucoromycota) in a remaining area of the Brazilian Atlantic Rainforest. **Nova Hedwigia**, v. 107, n. 3-4, p. 459-471, 2018.

LIMA, Diogo Xavier et al. Diversity of Mucorales in natural and degraded semi-arid soils. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 4, p. 1127-1133, 2016.

LIMA, Marcos Antonio Barbosa de et al. Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 363-372, 2003.

LIU, Wenguang et al. An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2705-2711, 2005.

LIZARDI-MENDOZA, Jaime; MONAL, Waldo M. Argüelles; VALENCIA, Francisco M. Goycoolea. Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. In: **Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities**. Academic Press, Elsevier London, UK, 2016. p. 3-31.

LÜBBEHÜSEN, Tina Louise; NIELSEN, Jens; MCINTYRE, Mhairi. Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. **Journal of applied microbiology**, v. 95, n. 5, p. 1152-1160, 2003.

MAIA, Patrícia et al. An Efficient Bioemulsifier-Producing *Bacillus subtilis* UCP 0146 Isolated from Mangrove Sediments. **Colloids and Interfaces**, v. 2, n. 4, p. 58, 2018.

MALDONADO, Rafael Resende et al. Production of lipase from *Geotrichum candidum* using corn steep liquor in different bioreactors. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 12, p. 1999-2009, 2014.

MAO, Xiyuan et al. Hydrogel fibrous scaffolds for accelerated wound healing. In: **Electrofluidodynamic Technologies (EFDTs) for Biomaterials and Medical Devices**. Woodhead Publishing, 2018. p. 251-274.

MATSUO, Yasuhiro et al. *cda1+*, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*. **FEBS letters**, v. 579, n. 12, p. 2737-2743, 2005.

MINKE, R. A. M.; BLACKWELL, John. The structure of α -chitin. **Journal of molecular biology**, v. 120, n. 2, p. 167-181, 1978.

MIRZA, M. A. et al. Effect of supplementing different levels of corn steep liquor on the post-weaning growth performance of Pak-Karakul lambs. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 26, n. 3, p. 135-137, 2006.

MIYOSHI, Hiroshi et al. Characterization of some fungal chitosans. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 56, n. 12, p. 1901-1905, 1992.

MORAIS, Tobias Pereira de et al. Catalytic and thermodynamic properties of β -glucosidases produced by *Lichtheimia corymbifera* and *Byssoschlamys spectabilis*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 9, p. 777-786, 2018.

MORARU, Cristina et al. A Meta-Analysis on Randomised Controlled Clinical Trials Evaluating the Effect of the Dietary Supplement Chitosan on Weight Loss, Lipid Parameters and Blood Pressure. **Medicina**, v. 54, n. 6, p. 109, 2018.

MORIN-CRINI, Nadia et al. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-26, 2019.

MORIN-SARDIN, Stéphanie et al. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. **Food microbiology**, v. 56, p. 69-79, 2016.

MOYER, Andrew J.; COGHILL, Robert D. Penicillin: VIII. Production of Penicillin in Surface Cultures 1. **Journal of bacteriology**, v. 51, n. 1, p. 57, 1946

MUÑOZ, Ivan et al. Life cycle assessment of chitosan production in India and Europe. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 23, n. 5, p. 1151-1160, 2018.

MUTHUSAMY, Krishnaswamy et al. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science (00113891)**, v. 94, n. 6, 2008.

MUZZARELLI, Riccardo AA. Chitosan-based dietary foods. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 4, p. 309-316, 1996.

NASCIMENTO, Thiago Pajeú et al. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p. 16-24, 2016.

NASR, Mina Mohammadi et al. The effect of carbon and nitrogen sources on the fatty acids profile of *Mortierella vinacea*. **Biological Journal of Microorganism**, v. 5, n. 20, p. 1-8, 2017.

NAUSS, J. L.; THOMPSON, J. L.; NAGYVARY, J. The binding of micellar lipids to chitosan. **Lipids**, v. 18, n. 10, p. 714-719, 1983.

NEVES, Maria Luiza Carvalho et al. *Lichtheimia blakesleeana* as a new potential producer of phytase and xylanase. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4807-4817, 2011.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Glaucia Maria. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

NWE, Nitar; FURUIKE, Tetsuya; TAMURA, Hiroshi. Production of fungal chitosan by enzymatic method and applications in plant tissue culture and tissue engineering: 11 years of our progress, present situation and future prospects. In: **Biopolymers**. InTech, 2010.

OKAMOTO, Y. et al. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 249-252, 2002.

OLIVEIRA, Ana Paula Agüero et al. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.

ORMROD, Douglas J.; HOLMES, Connor C.; MILLER, Thomas E. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 138, n. 2, p. 329-334, 1998.

PANESAR, Reeba; KAUR, Shubhneet; PANESAR, Parmjit S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 70-76, 2015.

PANITH, Nootchanartch et al. Effect of physical and physicochemical characteristics of chitosan on fat-binding capacities under in vitro gastrointestinal conditions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 71, p. 25-32, 2016.

PAPANIKOLAOU, Seraphim et al. 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**, v. 32, n. 1, p. 60-71, 2008.

PAPANIKOLAOU, Seraphim et al. Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 3, p. 262-281, 2017.

PAPANIKOLAOU, Seraphim et al. Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 11, p. 1060-1070, 2007.

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

PARSAEIMEHR, Ali et al. A chemical approach to manipulate the algal growth, lipid content and high-value alpha-linolenic acid for biodiesel production. **Algal research**, v. 26, p. 312-322, 2017.

PATEL, Seema. Seaweed-Derived Sulfated Polysaccharides: Scopes and Challenges in Implication in Health Care. In: **Bioactive Seaweeds for Food Applications**. Academic Press, 2018. p. 71-93.

PHILIBERT, Tuyishime; LEE, Byong H.; FABIEN, Nsanzabera. Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 181, n. 4, p. 1314-1337, 2017.

PITTLER, M. H. et al. Randomised, double-blind trial of chitosan for body weight reduction. **Focus on Alternative and Complementary Therapies**, v. 3, n. 4, p. 192-192, 1998

PRASHANTH, Keelara V. Harish et al. Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 2, p. 190-195, 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.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos Vol. 2. **da**, 2002.

RATLEDGE, C. Microbial production of gamma-linolenic acid. In: Akoh AA (ed) Handbook of functional lipids. Taylor & Francis, Boca Raton, pp 19–45. 2006.

RATLEDGE, C., WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous micro

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

RATLEDGE, Colin. Microbial production of γ -linolenic acid. In: **Handbook of functional lipids**. CRC press, 2005. p. 30-56.

RATLEDGE, Colin; COHEN, Zvi. Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils?. **Lipid Technology**, v. 20, n. 7, p. 155-160, 2008.

RAVINDRAN, Rajeev et al. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 93, 2018.

RAZOUK, S. et al. The subcutaneous mucormycosis due to *Lichtheimia corymbifera*: a case report in an immunocompetent child. **Journal de mycologie medicale**, v. 22, n. 2, p. 185-188, 2012.

rganisms. **Adv. Appl. Microbiol.** 51 , 1—51, 2002.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, 31, 603–632.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym. Int.* **2008**, 57, 397–430.

RINAUDO, M. Materials based on chitin and chitosan. In *Bio-Based Plastics: Materials and Applications*; Kabasci, S., Ed.; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 2014; pp. 63–80.

RINAUDO, M. Physical properties of chitosan and derivatives in sol and gel states. In *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*; Sarmiento, B., das Neves, J., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 2012; pp. 23–44.

RIZZO, Manfredi et al. Effects of chitosan on plasma lipids and lipoproteins: a 4-month prospective pilot study. **Angiology**, v. 65, n. 6, p. 538-542, 2014.

RØDDE, Ruth Hagen; EINBU, Aslak; VÅRUM, Kjell M. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). **Carbohydrate polymers**, v. 71, n. 3, p. 388-393, 2008.

RODRIGUEZ, Maria Susana; ALBERTENGO, Liliana Elena. Interaction between chitosan and oil under stomach and duodenal digestive chemical conditions. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2057-2062, 2005.

RONCERO, Cesar; SANCHEZ-DIAZ, Alberto; VALDIVIESO, M.-Henar. 9 Chitin Synthesis and Fungal Cell Morphogenesis. In: **Biochemistry and Molecular Biology**. Springer International Publishing, 2016. p. 167-190.

RUEDA, Andrés M. et al. Obtaining and evaluation of enzymatic extract from *Aspergillus* spp. by saccharification of sour cassava starch liqued. **Revista Ion**, v. 30, n. 2, p. 79-86, 2017.

RUIZ-HERRERA, J.; LOPEZ-ROMERO, E.; BARTNICKI-GARCIA, S. Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *Mucor rouxii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 10, p. 3338-3343, 1977.

RUIZ-HERRERA, José. **Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly**. CRC press, 2016.

SAKURADANI, Eiji et al. Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 1-10, 2009.

SAKURADANI, Eiji; SHIMIZU, Sakayu. Single cell oil production by *Mortierella alpina*. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 31-36, 2009.

SAMANTA, A. K. et al. Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. **Food and Bioprocess Processing**, v. 90, n. 3, p. 466-474, 2012.

SÁNCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SÁNCHEZ-MACHADO, Dalia I. et al. Chitosan. In: **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. Academic Press, 2019. p. 485-493.

SÁNCHEZ-VALLET, Andrea; MESTERS, Jeroen R.; THOMMA, Bart PHJ. The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. **FEMS microbiology reviews**, p. fuu003, 2014.

SANDFORD, P. A. Chitosan and Alginate-New Forms of Commercial Interest. In: **ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**. 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036: AMER CHEMICAL SOC, 1990. p. 298-POLY.

SANTOS, Danyelle KF et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43-50, 2013.

SCARDINO, M. E. The effects of omega-3 fatty acid diet enrichment on wound healing. **Vet Dermatol**, v. 10, p. 283-290, 1999.

SCHIPPER, Maria A. A. **On Certain Species of Mucor with a Key to All Accepted Species. On the Genera Rhizomucor and Parasitella**. By MAA Schipper. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1978.

SCHIPPER, Maria A. A. **On Mucor mucedo, Mucor flavus and related species**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1975.

SCHIPPER, Maria A.A. **On Mucor circinelloides, Mucor racemosus and related species**. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1976.

SCHIPPER, Maria AA. Zygosporic stages in heterothallic Mucor. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 35, n. 1, p. 189-208, 1969.

SCHIPPER, Maria Anna Agnes. **A study on variability in *Mucor hiemalis* and related species**. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1973.

SCHMAUDER, H.-P. JD Weete, Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms. XII+ 388 S., 62 Abb., 52 Tab. New York-London 1980. Plenum Press. **Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie**, v. 22, n. 6, p. 428-428, 1982.

ŞENEL, Sevda; MCCLURE, Susan J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 10, p. 1467-1480, 2004.

SHAHIDI, Fereidoon; ABUZAYTOUN, Reem. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. **Advances in food and nutrition research**, v. 49, p. 93-135, 2005.

SHARMA, Nishat; PRASAD, G. S.; CHOUDHURY, Anirban Roy. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 1, p. 95-101, 2013.

SIETSMA, J. Hans et al. The localization of chitin synthase in membranous vesicles (chitosomes) in *Neurospora crassa*. **Microbiology**, v. 142, n. 7, p. 1591-1596, 1996.

SILVA, Josevan da et al. Biomass and lipid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cassava wastewater as the substrate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

SILVA, Josevan da et al. Biomass and lipid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* using cassava wastewater as the substrate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

SINGH, Ram Sarup; KAUR, Navpreet; KENNEDY, John F. Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. **Carbohydrate Polymers**, 2019.

SITEPU, Irnayuli et al. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 7, p. 1061-1070, 2014a.

SITEPU, Irnayuli R. et al. Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 7, p. 1336-1360, 2014b.

SOUZA, Adriana et al. Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1608, 2016.

SOUZA, Paula Monteiro de et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

SPATAFORA, Joseph W. et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. **Mycologia**, v. 108, n. 5, p. 1028-1046, 2016.

SRINIVAS, T.; ANANTHARAMAN, M. **Cassava marketing system in India**. Central Tuber Crops Research Institute, 2005.

STAJICH, Jason E. et al. The fungi. **Current Biology**, v. 19, n. 18, p. R840-R845, 2009.

STEFANIAK, J. J. et al. Pilot plant equipment for submerged production of penicillin. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 666-671, 1946.

SUN, Liqun et al. Enhanced bioremediation of lead-contaminated soil by *Solanum nigrum* L. with *Mucor circinelloides*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 10, p. 9681-9689, 2017.

TANAKA, Yusuke et al. Rhinocerebral Zygomycosis Due to a *Lichtheimia ramosa* Infection in a Calf: Neural Spread Through the Olfactory Nerves. **Mycopathologia**, v. 184, n. 1, p. 141-146, 2019.

TEDERSOO, Leho et al. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal diversity**, v. 90, n. 1, p. 135-159, 2018.

THIELEN, Beth K. et al. Widespread *Lichtheimia* Infection in a Patient with Extensive Burns: Opportunities for Novel Antifungal Agents. **Mycopathologia**, v. 184, n. 1, p. 121-128, 2019.

TIAN, Mengmeng et al. Production of Endoglucanase and Xylanase Using Food Waste by Solid-State Fermentation. **Waste and biomass valorization**, v. 9, n. 12, p. 2391-2398, 2018.

TRUFEM, S. F. B. Mucorales do Estado de São Paulo. 3. Gêneros *Circinella* van Tieghem & Le Monnier e *Cunninghamella* Matruchot. **Rickia**, 1981.

TZIMOROTAS, Dimitrios et al. Pretreatment of different food rest materials for bioconversion into fungal lipid-rich biomass. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 41, n. 7, p. 1039-1049, 2018.

VALA, Anjana K.; SACHANIYA, Bhumi K.; DAVE, Bharti P. Marine Fungal White Biotechnology: An Ecological and Industrial Perspective. In: **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**. Springer, Cham, 2019. p. 483-503.

VAN LEEUWEN, Johannes et al. **Processes for isolating chitin and chitosan from fungal biomass**. U.S. Patent n. 9,249,235, 2 fev. 2016.

VORAPREEDA, Tayvich et al. Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 217-228, 2012.

WALTHER, G. et al. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 30, p. 11, 2013.

WANG, Xuchu et al. Proteomics profiling reveals carbohydrate metabolic enzymes and 14-3-3 proteins play important roles for starch accumulation during cassava root tuberization. **Scientific reports**, v. 6, p. 19643, 2016.

WEETE, J. D.; SHEWMAKER, F.; GANDHI, S. R. γ -Linolenic acid in zygomycetous fungi: *Syzygites megalocarpus*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 10, p. 1367-1372, 1998.

WEI, Hou et al. Influence of *Mucor mucedo* immobilized to corncob in remediation of pyrene contaminated agricultural soil. **Environmental Engineering Research**, v. 20, n. 2, p. 149-154, 2015.

WU, S., HU, C., JIN, G., ZHAO, X., & ZHAO, Z.K. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**. Vol. 101, No. 15, pp. 6124-6129, 2010.

XIE, Pu-jun et al. Skin-care effects of dandelion leaf extract and stem extract: Antioxidant properties, tyrosinase inhibitory and molecular docking simulations. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 238-246, 2018.

YADAV, Ajar Nath. **Recent advancement in white biotechnology through fungi: Volume 2: Perspective for value-added products and environments**. Springer, 2019.

Yamada, K. Development of multifunctional foods. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.81, p. 849-853, 2017.

YAZDI, Mojtaba Tabatabaei et al. *Mucor hiemalis*: a new source for uricase production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 325-330, 2006.

YOUNES, Islem; RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015.

ZAMANI, Akram et al. Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell walls. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8314-8318, 2008.

ZAMANI, Akram et al. Temperature shifts for extraction and purification of zygomycetes chitosan with dilute sulfuric acid. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 8, p. 2976-2987, 2010.

ZHANG, Qing et al. A Rare Case of Pulmonary Coinfection by *Lichtheimia ramosa* and *Aspergillus fumigatus* in a Patient With Delayed Graft Function After Renal Transplantation. In: **Transplantation proceedings**. Elsevier, 2019. p. 551-555.

ZHAO, Lina et al. 13 C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Bioresource technology**, v. 197, p. 23-29, 2015.

ZIKAKIS, John (Ed.). **Chitin, chitosan, and related enzymes**. Elsevier, 2012.

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

ZYCHA, H. SIEPMANN, R. LINNEMAN, G. Mucorales. **J. Cramer. Keys** (A revision of Zycha. 355 p., 155 pl.) 1969.

Capítulo II

(PRIMEIRO ARTIGO)

**Produção Ecológica de Ácidos Graxos Nutracêuticos pelo Fungo
Oleaginoso *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 usando substratos
renováveis**

Trabalho submetido como artigo no periódico *Microbial Cell Factories* (ISSN:
1475-2859)

Fator de Impacto: 3,831

Eco-friendly nutraceutical fatty acids production by oleaginous fungus *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 using renewable substrates

Adriana Ferreira de Souza^{1,5}, Hugo Marques Galindo², Manuela Cristina Mota Lins⁵, Rosileide F. Silva Andrade^{3,5}, Norma Buarque Gusmão⁴, Galba Maria de Campos-Takaki^{5*}

¹Biotechnology Post-Graduation Program, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife-PE, Brazil. E-mail: adrife.souza@gmail.com(A.F.S.)

²Fungal Biology Post-Graduation Program, Federal University of Pernambuco, 50670-420 Recife-PE, Brazil. E-mail: hugo.galindo21@gmail.com (H.M.G.)

³Post-Doctorate National Program-CAPES, Catholic University of Pernambuco, 50050-900 Recife-PE, Brazil. E-mail: rosileide_fontenele@yahoo.com.br(R.F.S.A.)

⁴Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife-PE, Brazil. E-mail: normagusmao@gmail.com(N.B.G.)

⁵Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590, Pernambuco, Brazil. E-mails: motalinsmr@gmail.com (M.C.M.L.); carlos.alves@unicap.br (C.A.A.S.); galba_takaki@yahoo.com.br(G.M.C.T.)

ABSTRACT

Background: Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are essential for human function; however they have to be provided through the diet, considering their production from fish oil is environmentally unsustainable. A strategy for cost reduction of PUFAs production is the use of raw materials for the fermentation medium, which can represent between 10–30% for growing microorganism producer's microbial oil nutritionally import omega-3 PUFAS. The crude glycerol, a co-product of the biodiesel industry production may be a suitable raw material for the production of high added-value compounds by the microorganisms. The study aimed to use the glycerol obtained from the biodiesel production process as the main carbon source to production of fatty acids from agro-industrial wastes and corn steep liquor by *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266. The production was performed by culturing in control medium (Synthetic Medium for Mucorales) and production in the medium containing glycerol and corn steep liquor according with factorial design of 2². The biomass yield was calculated gravimetrically and the fatty acids were methylated and identified and quantified by gas chromatography.

Results: The results showed that the *L. hyalospora* UCP 1266 achieved the best biomass yield (15.5 g/L) in medium containing crude glycerol (8%) and corn steep liquor (8%) and corresponding of total lipids was 82.4% obtained in the same assay. According to the results the fatty acid predominant were the

Oleic acid (C18:1 – ω -9) with 45.31%, followed by α -Linolenic acid (C18:3– ω -3) with 17.9% and γ -Linolenic acid (C18:3– ω -6) 0.24%, respectively.

Conclusions: The promising conversion of the residues crude glycerol (8%) and corn steep liquor (8%) by *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 had shown higher potential of lipids accumulation as PUFAs production of the Omega-3 Alfa-Linolenic acid, Omega-6 family, which includes Linoleic Acid, Arachidonic Acid, and Gamma Linolenic Acid, and Omega-9 Oleic acid, respectively.

Key words: Mucoralean fungus; PUFAs; Oleaginous biomass; Agroindustrial wastes; Bioconversion; crude glycerol; corn steep liquor

1. BACKGROUND

The term, single cell oils (SCOs), also named microbial lipids or microbial oils, was created by Ratledge and Wynn [1] since 1974, to identify those lipids of single-cell organisms – microorganisms – that would be suitable for consumption by human and animal. Ratledge described the nature of the hydrocarbonated chain the fatty acids can be saturated, monounsaturated, or polyunsaturated [2]. However, many fatty acids can be synthesized by humans, but, not some polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as omega-3 (n-3) and omega-6 (n-6) fatty acids [3].

The term SCO is nowadays mainly restricted to describe the lipids produced by a limited number of organisms, named oleaginous microorganisms, which are those species able to accumulate 20–80% of lipids per dry biomass as a reserve storage material [4].

The SCO included all types of fatty acid (FA) containing lipids, and includes not only free fatty acids and triacylglycerol (TAGs), but also other complex lipids such as glycosylated as well as sulfur containing lipids [5]. More recently, SCO has been considered as possible source of biofuels opening new perspectives for the energy and transport industrial sectors [6].

In the last decade, biodiesel has been used as an alternative to the exhaustion of fossil fuels. However, its production on a large scale have resulted in huge quantities of residual glycerol, which is generated at 10% of total

biodiesel produced and subsequent cost of glycerol [7]. Facing this situation this waste has been used by many researchers as a raw material for obtaining value-added products [8,9].

Currently, the population, especially the elderly, has been reducing fiber consumption and increasing consumption of foods rich in saturated fats, which causes harmful effects on health [10,11]. Thus, ingestion of polyunsaturated fatty acids has been widely disseminated because of its positive effects on human health [12,13].

According to the World Health Organization (WHO) the essential fatty acids are linoleic (C18:2 ω -6), α -linolenic (C18:3 ω -3), γ -linolenic acid (GLA, C18:3 ω -6) and arachidonic acid (AA, 20: 4 ω -6) [14,15]. The α -linolenic acid, though it is synthesized from linoleic acid, but there is evidence of loss of this biosynthetic capability with aging [16].

Cold-water fish such as salmon, sardines, and mackerel are among the main sources of essential fatty acids for human consumption, especially omega-3 [14]. However, the increase in consumption of these animals in some countries resulted in environmental problems, besides the possibility of extinction of these fish [17]. It should be considered that fish suffer variations in seasonality, seasons and location, are susceptible to contamination by metals and pesticides, and the difficulty of adding in diets of long periods, due to the taste of low acceptability [18,19].

In recent years, microbial oils have been of interest to many researchers as a source of obtaining polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially γ -linolenic acid (ω -6), α -linolenic acid (ω -3) and linoleic acid, precursors of docosahexaenoic acid (DHA), gamma-linolenic acid (GLA), eicosapentaenoic acid (EPA) and arachidonic acid (ARA), and the application of biofuels in response to rising oil prices [20-22]. Usually, oleaginous microorganisms are those that can accumulate over 20% of lipids in the biomass and can reach the capacity to accumulate up to 70% during metabolic stress period [20, 23-26].

Filamentous fungi of Mucorales and Mortieralles orders, such as *Mortierella* sp., *Mortierella alpina*, *Umbelopsis isabellina*, *Cunninghamella echinulata*, *Mucor rouxii*, *M. circinelloides* and *M. hiemalis*, are more intensively studied for the production of essential fatty acids [22, 28-30]. According to [31], some

industrial services use the cultivation of filamentous fungi in solid and submerged bioprocesses using agroindustrial wastes as an alternative in culture media to produce biomasses with high yields of fatty acids.

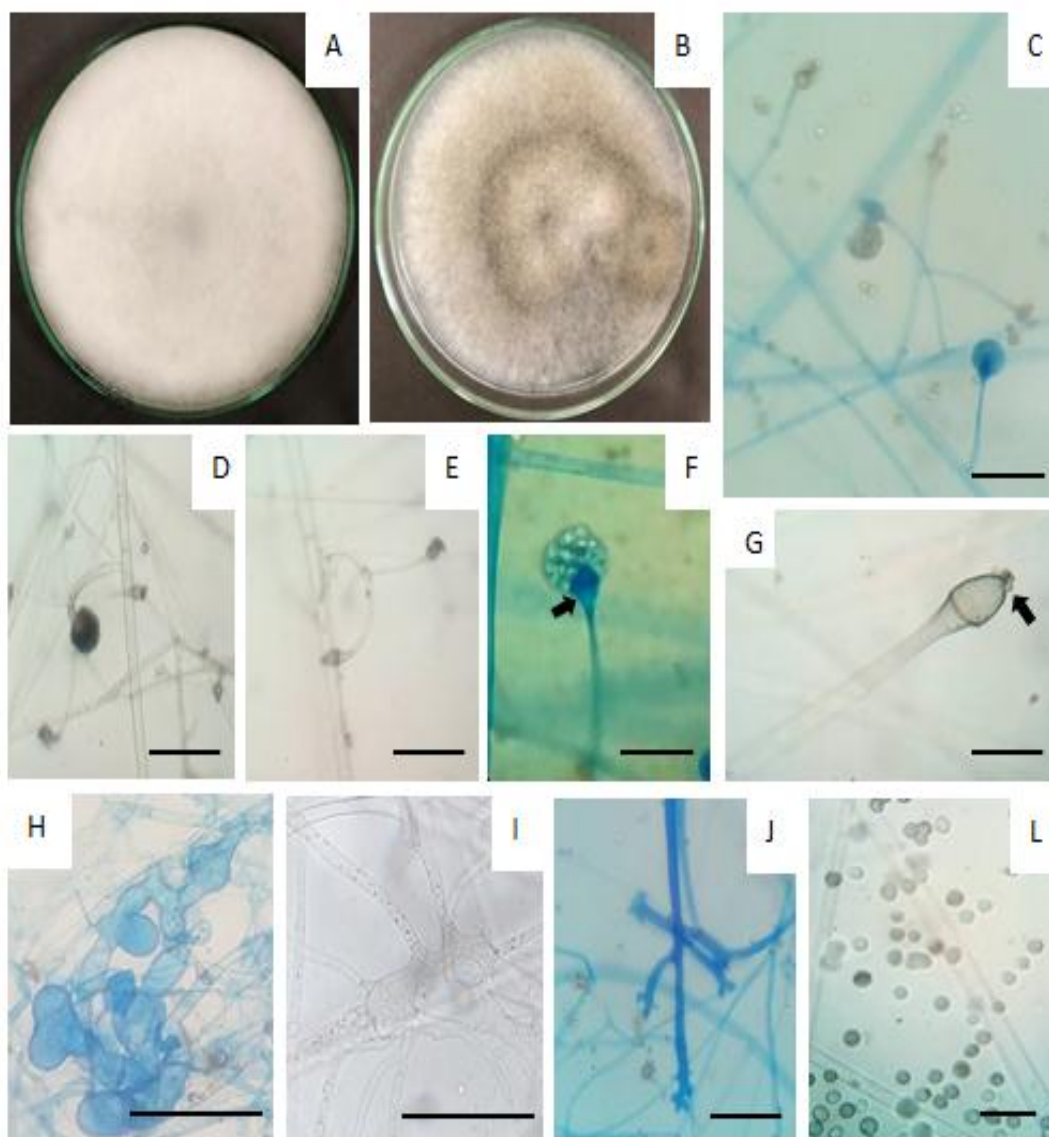
In addition, the high cost associated with organic carbon sources is a major bottleneck for the commercialization of the fatty acids bioprocesses. The use of non-edible lignocellulosic materials and industrial waste as glycerol source from biodiesel production could reduce overall production costs, thereby aiding the transition to large-scale lipid production [33]. To the best of our knowledge, this is the first report to lipid accumulation biomass produced by culture media using crude glycerol from biodiesel manufacturing and corn steep liquor as agroindustrial substrates for the production of nutraceutical fatty acids from *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266.

2. Results

2.1. Isolation and morphological identification of *Lichtheimia*

Initially white colonies then turning greyish, grey dark in the central portion (Fig. 1 A,B). At 30 °C faster growth (9 cm in 72 h) (Fig.1 A) with reverse yellow. Colonies rapidly-growing mainly at optimum temperatures observed between 37°C (9 cm/120h), high level of sporulation (Fig.1 B). At 43°C slower growth (2,4 cm/72h; 4,2 cm/120h), poor sporulation. Sporophores simple, erect or circinate (Fig 1 C, D), few brached (Fig.1E). Yellowish sporangia, when young, turning dark brown or dark grey when mature (Fig.1D), multispored, pyriforme or subglobose ,20–30 µm diam, apophysate, conical apophysis (Fig.1F). Columella usually with a apical projection, 2–3,5µm diam. (Fig 1.G). The presence of projections in the columellae has been cited to all known species of *Lichtheimia*. Hesseltine and Ellis [34] reported projection up to 3.5 µm diam. Presence of giant-cells in hypha-like, simple (Fig. 1H) to strongly branched (Fig.I). Presence of rhizoids branched, occasionally with dilation in the extremities (Fig.1J). Mature sporangiospores smooth and rough, hyaline and brownish reaching 4-7.5 (8) µm diameter (Fig.1L).

Figure 1. *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266. (A) Colony surface (25°C); (B) Colony surface (37°C); (C) Sporophores, columella and sporangia; (D) Simple sporangiophore and terminated in sporangia with prominent dome-shaped apophysis (arrow); (E) Circinate sporangiophore; (F) Columella with a apical projection (arrow); (G) Giant cells with finger-like; (H) Rhizoids; (I) Sporangiospores. Bars: C, E, H = 50 µm; D= 30 µm; F = 20 µm; G= 100 µm; I =10 µm



2.2. Production of biomass and lipids content by *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 using crude glycerol and corn steep liquor

The lipid contents varied among different assays and ranged from 41.0% to 82.4% of dry cell weight (DCW). *L. hyalospora* UCP 1266 was obtained in assay 4 containing maximum concentrations of residual glycerol (8%) and corn

steep liquor (8%). The condition 4, showed the best lipid yield 12.8g/L and lipid productivity was 2.56g/L/d (Table 1). However, in medium used as control (Synthetic Medium for Mucorales - SMM)[34] resulted in the yield of 2.1 g.L⁻¹ of biomass and 27% of total lipids. This suggests a culture medium with a greater concentration of crude glycerol and corn steep liquor could favor growth by *L. hyalospora* UCP 1266.

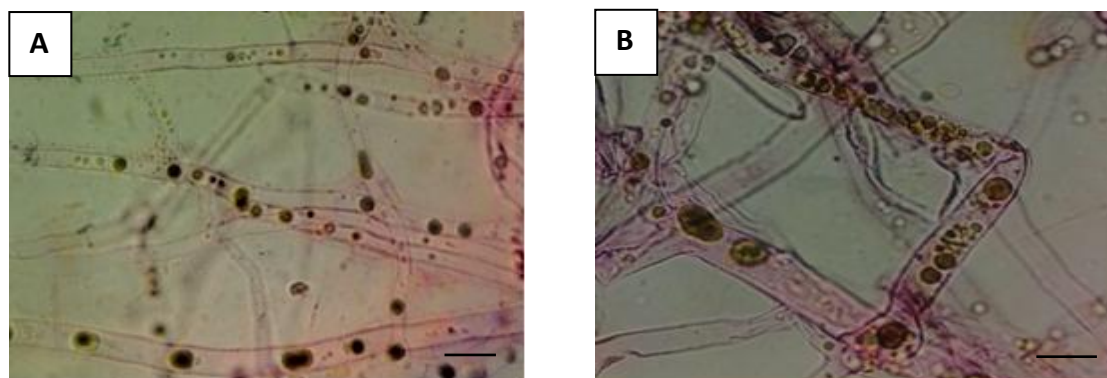
Table 1. Production of biomass and total lipids by *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 according 2² factorial design using corn steep liquor (CSL) and crude glycerol (CG) during 120h

Assay	CSL (%)	CG (%)	Dry cell weight (DCW) (g/L)	Biomass Productivity # (g/L/d)	Lipid yield (g/L)	Total lipic (% w/w)	Lipid Productivity # (g/L/d)
1	2	2	12.8	2.56	5.7	44.5	1.14
2	8	2	14.2	2.84	5.8	41.0	1.16
3	2	8	10.6	2.12	4.5	42.3	0.90
4	8	8	15.5	3.10	12.8	82.4	2.56
5	5	5	13.1	2.62	6.8	51.6	1.36
6	5	5	12.8	2.56	6.4	50.3	1.28
7	5	5	13.3	2.66	6.9	52.4	1.38
8	5	5	12.1	2.42	6.1	50.6	1.22
*SMM			2.1	0.42	0.6	27.0	0.12

The total biomass productivity and lipid productivity were calculated when the cell dry weight reached its highest value. * SMM= Synthetic Medium for Mucorales [34]

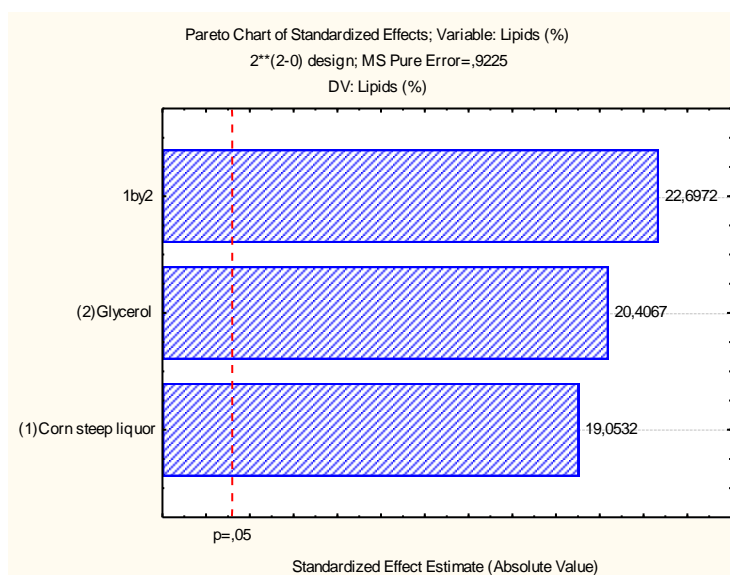
A Figure 1 shows lipid bodies in hyphae in Assay 4 and SMM [34] by cytochemical analysis using Sudan Black staining, thereby revealing the presence of lipids of dark color. The results obtained a significant accumulation of lipids in most *L. hyalospora* UCP 1266 hyphae occurred in SMM (Figure 2A). However, the maximum accumulation of lipids occurred in residual glycerol 8% and corn steep liquor (Figure 2B).

Figure 2. Cytochemistry staining of cells of *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 by Sudan Black method. (A) Synthetic Medium for Mucorales (SMM)[34]. (B) Assay 4 of 2² factorial design



The Figure 3, represent the Pareto diagram, which shows that higher concentrations of crude glycerol and corn steep liquor are significant for the production of total lipids, as well as the interaction of agro-industrial wastes influenced positively (synergistic interaction) promoting the increase of production of lipids by *L. hyalospora* UCP 1266.

Figure 3. Pareto chart for 2² factorial design of culture, where (1) corn steep liquor and (2) glycerol are the independent variables and lipids is the response variable. The point at which the estimates of the effect were statistically significant (p = 0.05) is indicated by the dotted red



Pareto chart for 2² factorial design of culture, where (1) corn steep liquor and (2) glycerol are the independent variables and lipids production were the response variable. The point at which the estimates of the effect were statistically significant ($p = 0.05$) is indicated by the dotted red.

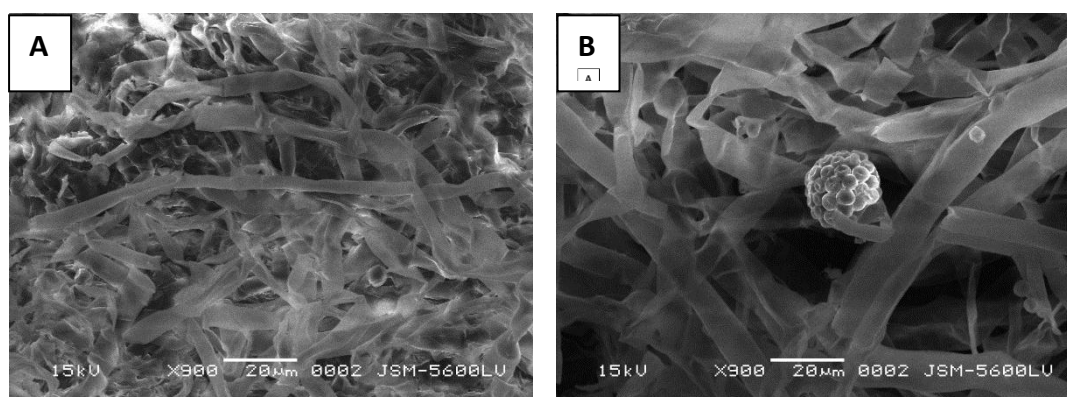
2.3. Influence of medium on the ultrastructural morphology of *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266

Scanning electron micrographs were performed by investigates the influence of residual glycerin and corn steep liquor as carbon and nitrogen sources on ultrastructural morphology of *L. hyalospora* UCP 1266 (Figure 4).

The result showed that in the medium selected for production of biomass and total lipids (assay 4 factorial designs) induced in the mycelium compact and electro dense hyphae with a thickness thinner, tubular, contorted and branched. But it was observed the presence of chlamydospores (Figure 4A).

The structures of the fungus hyphae growth in control medium [34] showed to be smoother and lax, with high transparency and with presence of spores (Figure 4B).

Figure 4. Scanning electron micrograph of mycelium of *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266. (a) mycelium after culture in assay 4 of the factorial design (glycerol 8% and corn steep liquor 8%) and (b) mycelium after culture synthetic medium for Mucorales (SMM)[34]



2.4. Fatty Acid Profile of Total Lipids of *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266

The fatty acid profiles were analyzed for assay 4 with higher production of lipids in medium containing 8% glycerol and 8% corn steep liquor.

According to the results obtained the fatty acid predominant were the Oleic acid (C18:1 ω -9) with 45.31%, followed by α -Linolenic acid (C18:3 ω -3) with 17.9% and γ -Linolenic acid (C18:3 ω -6) 0.24%.

L. hyalospora cultivated in synthetic medium for Mucorales - SMM[34] showed highest peaks to oleic acid (C18:1) followed by palmitic acid (C16:0) with yield of 41.8% and 28.4%, respectively, only had no significant production of polliunsaturated fatty acids (Table 2).

Table 2 . Fatty acid profile of total lipids from biomass of *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 cultured in crude glycerol added corn steep liquor by 120h and cultured in synthetic medium for Mucorales (SMM)[34] by 120h.

Fatty Acid Methyl Esters	CG 8% and CSL 8% (%)	Synthetic Medium for Mucorales (SMM) [34] (%)
Capric acid (C10:0)	0.16	-
Myristic acid (C14:0)	0.36	0.54
Palmitic acid (C16:0)	19.24	27.60
Palmitoleic acid (C16:1)	0.68	0.57
Stearic acid (C18:0)	2.92	11.80
Oleic acid (C18:1 ω -9)	45.31	40.61
Linoleic acid (C18:2)	0.64	9.30
α -Linolenic acid (C18:3 ω -3)	17.9	2.04
γ -Linolenic acid (C18:3 ω -6)	0.24	6.09
Arachidic acid (C20:0)	0.35	0.77
Gadoleic acid (C20:1)	0.10	-
Behenic acid (C22:0)	12.10	0.59

The results showed in this study using glycerin obtained from biodiesel manufacturing is an excellent carbon source with potential application as culture media for the growth of *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 .Also, the chemical

composition of corn steep liquor presents nutrients essential for growth and production of the fungal metabolites. Finally, the filamentous fungus *L. hyalospora* UCP 1266 presents promising and innovative results in the production of lipids, especially essential fatty acids α -linolenic acid (ω -3).

3. Discussion

The distinction of *Lichtheimia* species depends on morphology and physiology, as in the growth temperature, giant cell and the sporangiospore morphology [35-38], and with optima growth around 37°C, all species be capable to parasitize endothermic organisms [38]. The growth capacity at 37 °C, or at 55°C, distinguish of group mesophilic (*Absidia*) [35,39]. Giant cells are common in all species of *Lichtheimia*, but their size and complexity depend on the medium and the growth temperature [37], irregularly shaped (pleomorphic) with finger-like projections [39].

Fungi of the order Mucorales have attracted considerable interest as industrial lipid producers as alternative source of biodiesel and good sources of high value omega-3 and omega-6 long-chain polyunsaturated fatty acids [23,30]. However, to obtain sustainable and economical oleaginous biomass, these microorganisms must be grown on low-cost substrates such as food rest materials, waste glycerol and lignocellulosic materials and curiously are able to grow and accumulate lipids on such substrates [30].

The glycerol is a three-carbon carbohydrate (triosis) in an aerobic catabolism this substrate enters microbial cell by facilitated diffusion and / or active transport, contributing to a faster metabolism in glycolysis, requiring less enzymes than glucose for conversion to glyceraldehyde 3-P. The glycerol it was observed that impurities (salts, methanol, etc.) of crude glycerol do not affect the growth of fungi zygomycetes, presenting significant production of biomass and lipids [31, 32].

According to [41] the corn steep liquor consists in is an waste agro-industrial rich in amino acids and carbohydrates which favor the growth of zygomycetes. The results in this study were higher than the obtained by [41] for biomass production by *Cunninghamella elegans* UCP 542 (9.93 g.L-1) after culture in medium containing cassava wastewater flour (5%) and corn steep

liquor (8%). A similar study was performed by Cardoso et al.[42] with the fungal *Rhizopus arrhizus* UCP 402, using corn steep liquor and honey and [20] with yeast *Candida lipolytica* UCP 988, using corn steep liquor and residual soybean oil as wastes agroindustrial as independent variables in experiments factorial. These studies, the highest concentration of corn steep liquor corn favored biomass production by microorganisms.

Species of the phylum Mucoromycota are considered promising sources of oil, because they accumulate large amounts of lipids, mainly *Mortierella isabelina* (Current name *Umbelopsis isabelina*), which may accumulate up to 86% lipids in dry biomass [22]. The genus *Lichtheimia* is less investigated in a recent study with the genus [38], the authors evaluated the production of lipids in three strains *L. corymbifera* CCM-8077, *L. corymbifera* VKMF-507 and *L. corymbifera* VKMF-513 in compound medium by Glucose and yeast extract, obtaining 27%, 28% and 29% of lipids in dry biomass respectively.

The study on lipid production by cultures of Mucoromycota in crude glycerol is quite limited in the literature [31,32,39, 42], and lipid production by *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 has not been reported. In study Bellou et al., [48] *Cunninghamella echinulata* achieved 25.6% lipids in 340h of incubation and *Umbelopsis isabellina* achieved 53.2% lipids in 264h of incubation, cultured on crude glycerol. [32] demonstrated that crude glycerol is a suitable substrate for lipid production by *Cunninghamella echinulata*, *Mortierella isabelina*, *Mortierella ramanniana*, *Mucor* sp. *Thamnidium elegans* and *Zygorhynchus moelleri* (Current name *Mucor moelleri*) in submerged crops, however *T. elegans* was the most promising species, reaching a remarkable amount of 11.6 g / L corresponding to 71% of total lipids in their biomass. Papanikolaou et al.[35] and Bellou et al.[36] were analyzed when some Mucoromycota growing in the medium containing glycerol, oleic acid was the main fatty acid produced, followed by palmitic and linoleic acid. However, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are significantly produced in Mucorales, some studies are tabulated in Table 3.

Table 3. Comparison of Mucoralean fungi growing on different substrates for lipids and fatty acids (SAT, MUFA and PUFA) production by the literature with *Lichtheimia hyalospora* UCP1266.

Mucoralean fungi	Substrates	Total lipids (%)	SAT (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	References
<i>Lichtheimia hyalospora</i> UCP1266	Crude Glycerol and corn steep liquor	82.4	35.23	46.09	18.14	Present study
<i>L. hyalospora</i> UCP1266	Glucose and L-asparagine	27	42.63	42.39	17.97	Present study
<i>L. corymbifera</i> CCM 8077	Glucose and yeast extract	27	31	50	15	[38]
<i>Amylomyces rouxii</i> CCM F-220	Glucose and yeast extract	26	33	34	24	[38]
<i>Absidia glauca</i> CCM 451	Glucose and yeast extract	47	28	41	27	[38]
<i>Mucor circinelloides</i> V104473	Potato hydrolysate and yeast extract	41,6	19.26	39.94	40.65	[44]
<i>Mortierella vinacea</i> PTCC 5262	Glucose and yeast extract	14.76	29.28	44.1	-	[45]
<i>M. vinacea</i> PTCC 5262	Lactose and peptone	18.70	26.47	13.64	52.76	[45]
<i>Mucor circinelloides</i> URM4182	Glucose and glutamic acid	44.0	35.8	41.3	20.5	[46]
<i>Thamnidium elegans</i>	Olive mill wastewater	64.1	30.5	58.1	11.3	[43]
<i>T. elegans</i>	Glucose	81.7	31.1	55.5	13.1	[43]
<i>T. elegans</i> CCF-1465	Pure glycerol	37.2	33.4	41.1	23.4	[47]
<i>Zygorhynchus moelleri</i> MUCL 143	Pure glycerol	25.7	27.4	41.7	28.5	[47]
<i>Mortierella isabellina</i> ATHUM 2935	Glucose and (NH ₄) ₂ SO ₄	48.0	27.6	52.9	16.7	[48]
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATHUM 4411	Glucose and (NH ₄) ₂ SO ₄	35.0	30.6	30.0	28.2	[48]
<i>M. racemosus</i> CCF - 86	Glucose and com-steep	13.9	31.2	43.5	22.3	[49]
<i>Gongronella butleri</i> CCF - 413	Glucose and com-steep	30.4	41.1	45.7	11.4	[49]
<i>Rhizopus arrhizus</i> CCF - 465	Glucose and com-steep	18.0	28.0	49.7	21.9	[49]

*Saturated fatty acids (SAT), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA)

Oleic acid (C18:1) is a monounsaturated fatty acid with a double bond in position 9, not essential. Oleic acid is found in olive oil and is known for its effectiveness in reducing cholesterol levels [50-51]. The α -linolenic acid (C18: 3) is an essential fatty acid precursor of other ω -3 fatty acids in humans, including eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) [52]. We should emphasize that this is the first report of significant production of α -linolenic acid in *L. hyalospora* UCP 1266.

The production of lipids and evaluation of the fatty acid profile produced by *Cunninghamella echinulata*, *Mortierella rammaniana* and *Mucor* sp. Using as carbon source was crude glycerol, and was observed that *Mucor* sp. as the most promising Zygomycetes for production of linolenic acid (C18:3), with 16.5% at 76 hours of cultivation. However, *M. rammaniana* and *C. echinulata* were produced 5.9% and 5.6% of fatty acid linolenic acid, at 93 and 94 hours of cultivation, respectively [53-56].

4. Materials and Methods

4.1. Microorganism and growth conditions

Lichtheimia hyalospora UCP 1266 was isolated from Caatinga soil, Serra Talhada-PE, Brazil, collected at 7o59'31" S, 38o17'54" W, and after identification was deposited to the Culture Collection UCP (Universidade Católica Pernambuco) and registered in 927 -World Federation for Culture Collections (WFCC). *L. hyalospora* UCP 1266 was grown in synthetic medium for Mucorales (SMM) described by [34] and incubated at 28°C during 3 days. After this period aliquots of 1 mL containing 10^7 spores/mL were used as pre-inoculum.

4.2. Substrates

The substrates used were corn steep liquor kindly provided by Corn Products Ltd. and residual glycerol from the biodiesel manufacturing using cotton oil, kindly supplied by the Experimental Plant of Biodiesel Production of Northeastern Center of Strategic Technologies (CETENE, Recife-PE, Brazil).

4.3. Isolation and identification of *Lichtheimia* UCP 1266

The fungi from the soil were isolated by serial dilution and plating on Sabouraud dextrose agar (10.0g peptone, 40.0g glucose, 15.0g agar, 1000 ml distilled water), amended with chloramphenicol (100 mg.L⁻¹). The plates were incubated at 28°C. After growth, the colonies were transferred to test tubes with Potato Dextrose Agar (BDA) and preserved at 5°C. Pure cultures from specimen were cultured in triplicate, in MEA and PDA, and incubated at 20, 25, 30, 37, 40 and 43 °C, during 7 days. The fungal material was mounted in steril water and lactic acid with cotton blue and observed under a light microscope. The fungal were identified by analyzing the color, appearance and diameter of colony and microstructures as described por Hoffmann et al. [35-37].

4.4. Cultural biomass production

The culture for production of biomass by *L. hyalospora* UCP 1266 was in Erlenmeyers flasks of 250mL containing concentrations different of corn steep liquor and residual glycerin according with 2² factorial design and the data were analyzed performed using the STATISTIC software version 7.0 (StatSoft Inc., USA) (Table 1). The Synthetic Medium for Mucoralean (SMM) described by [34] was used as control for Mucorales with the following composition: D-glucose 40 g; L-asparagine 2 g; chloridrate of thiamine 0.5 mg; potassium phosphate 0.50 g and magnesium sulphate 0.25 g per litre of distilled water, pH 5.2. The flasks were incubated during 120 h at 28 °C, under orbital shaker at 150 rpm. The biomass was obtained from the metabolic liquid by vacuum filtration, washed with ice distilled water, filtered on filter paper, lyophilized and then kept in a desiccator until constant weight. The biomass production was determined by gravimetry.

4.5. Cytochemical Analysis of Lipids

A cytochemical analysis of lipids present in *L.hyalospora* UCP 1266 was performed in accordance with modifications to the method of [57]. The cell samples were fixed in glutaraldehyde and then washed in phosphate buffered saline (PBS). They were then immersed in Sudan Black B stain for 10 min in the dark. After this step, the samples were rinsed in 70% alcohol to remove excess dye, and then washed with distilled water, counter-stained

with safranin for 30 s and washed again with PBS. The slides were viewed under an optical microscope. The oil droplets present in the yeast cells were stained in black or dark blue.

4.6. Morphological analysis in Scanning Electron Microscopy (SEM)

The biomass was washed in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 and fixed with glutaraldehyde 2.5% in cacodylate buffer, 0.1M, pH 7.4 for 1 h at room temperature. In the post-fixation malachite green 0.05% was used in cacodylate buffer for 1h at room temperature in dark conditions. They were then subjected to the dehydration process with ethanol in proportions of 50, 70, 90 and 100%. Samples were then placed on aluminum supports and analyzed by Scanning Electron Microscopy (LSM JEOL 5600 LV).

4.7. Extraction and Quantification of Total Lipids

Total lipids were obtained according to the method described by [58] using lyophilized biomass (1.0 g) by successive extractions with chloroform/methanol. The percentage of total lipids was determined by gravimetric method using Eq. 1.

$$Total\ lipids\ (\%) = \frac{Lipids}{Dried\ biomass} \times 100 \quad (Eq. 1)$$

4.8. Methylation of fatty acids

The metilation of fatty acids was based on the methodology described by [59] using 10.0 mg of dried biomass. The methylation was performed using boron trifluoride methane at 14% solution and benzene. The fatty acids methyl esters (FAMES) were resuspended in n-hexane and analyzed by gas chromatography (GC). The composition of fatty acids was carried for identification of the components was made by comparison of the retention times corresponding to the peaks of the standard. Varian gas chromatograph automatic injector was equipped with a flame ionization detector and a capillary column HP-5 of fused silica (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane) 30 m x 0.25 mm. In the column, an initial temperature of 150°C was maintained for 4 min, increased to 250°C at 4°C per min and maintained for 20 min. The temperature on the injector and the detector was 280°C and helium (1cm.3 min⁻¹) was used as carrier gas.

5. Conclusions

The present study shows that the use of crude glycerol obtained from biodiesel manufacturing is an excellent carbon source with potential application as culture media for the growth of *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266. Also, the chemical composition of corn steep liquor presents nutrients essential for growth and production of the fungus metabolites. Finally, the promising oleaginous fungus *L. hyalospora* UCP 1266 presents innovative lipids production, especially essential fatty acids α -linolenic acid (ω -3), precursor of eicosapentaenoic acid (EPA), oleic acid (C18:1 ω -9) and γ -Linolenic acid (C18:3 ω -6), respectively. To the best of our knowledge, this is the first report where forest biomass is used for *L. hyalospora* growth and production of nutraceutical lipids. In addition, the biomass can serve as low-cost renewable resource for saturated fatty acids (SAT), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA).

Declarations

Ethics approval and consent to participate: Not applicable.

Consent for publication: Not applicable.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Funding: This work was financially supported by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) Process No. 311373/2014-3, FACEPE (Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco) Process No. APQ-0291-2.12/15, and Coordination Unit for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES).

Authors' contributions: AFS, NBG and GMCT conceived and designed the experiments; AFS performed the experiments; AFS,HMG, RFSA and MCMLL analyzed the data; GMCT contributed reagents/materials/analysis tools; AFS,HBG and GMCT wrote the paper.

Acknowledgments: The authors are grateful to the Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, Brazil, for the use of laboratories.

References

1. Ratledge, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie.* 2004; 86: 807-815. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.017>
2. Lands, B. Historical perspectives on the impact of n-3 and n-6 nutrients on health. *Prog. Lipid Res.* 2014; 55: 17–29. doi: 10.1016/j.plipres.2014.04.002
3. Shahidi, F.; Wanasundara, U.N. Omega-3 fatty acid concentrates: Nutritional aspects and production technologies. *Trends Food Sci. Technol.* 1998, 9: 230–240. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00044-2)
4. Shang, T.; Liu, L.; Zhou, J.; Zhang, M.; Hu, Q.; Fang, M.; Wu, Y.; Yao, P.; Gong, Z. Protective effects of various ratios of DHA/EPA supplementation on high-fat diet-induced liver damage in mice. *Lipids Health Dis.* 2017; 16: 1–13. doi: 10.1186/s12944-017-0639-7
5. Rubio-Rodríguez, N.; Beltrán, S.; Jaime, I.; de Diego, S.M.; Sanz, M.T.; Carballido, J.R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innov. Food Sci Emerg Technol.* 2010; 11: 1–12. DOI: 10.1016/j.ifset.2009.10.006
6. Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 2008; 54(4):621-39. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.
7. Singh, N., Roy, R., Srivastava, S. K., and Choudhury, B. Potential Role of Halophile in Crude Glycerol Based Biorefinery. In *Biorefining of Biomass to Biofuels*, Springer, Cham. **2018**. 4,167-186.
8. Moustogianni, A., A. Bellou, I. Triantaphyllidou and Aggelis, G. Feasibility of Raw Glycerol Conversion into Single Cell Oil by Zygomycetes Under Non-Aseptic Conditions. *Biotechnology and Bioengineering.* **2015**. 112(4): 827-831. <https://doi.org/10.1002/bit.25482>
9. McNutt, J., and Yang, J. Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* **2017**. 71, 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.110>
10. Santos, R. D., A.C.M. Gagliardi, H.T. Xavier, C.D. Magnoni, R. Cassani, A.M.O. Lottenberg and Fenelon, G. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* **2013**. 100(1), 1-40.
11. Yannakoulia, M., Mamalaki, E., Anastasiou, C. A., Mourtzi, N., Lambrinouadaki, I., & Scarmeas, N. Eating habits and behaviors of older people: where are we now and where should we go?. *Maturitas.* **2018** .114: 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.05.001>

12. Garneau, V., Rudkowska, I., Paradis, A. M., Godin, G., Julien, P., Pérusse, L., & Vohl, M. C. Omega-3 fatty acids status in human subjects estimated using a food frequency questionnaire and plasma phospholipids levels. *Nutrition Journal*, **2012**. 11(1), -11-46. <https://doi.org/10.1186/1475-2891>
13. Francisco, M. R., Saldanha, T., & Fraga, M. E. Fungi as an alternative to produce essential fatty acids. *Científica*. **2017**. 45(2), 123-129. <http://dx.doi.org/10.15361/1984-5529.2017v45n2p123-129>
14. Alonso, D. L., & Maroto, F. G. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*. **2000**. 18(6), 481-497. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00048-3)
15. Ferreira, S. P., Souza-Soares, L. D., & Costa, J. A. V. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. *Revista de Ciências Agrárias*. **2013**. 36(3), 275-287.
16. Lenihan-Geels, G., Bishop, K. S., & Ferguson, L. R. Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish?. *Nutrients*. 2013; 5(4): 1301-1315. <https://doi.org/10.3390/nu5041301>
17. Martins, M. B., Suaiden, A. S., Piotto, R. F., & Barbosa, M. Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados–Omega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça Properties of Omega-3 polyunsaturated fatty acids obtained of fish oil and flaxseed oil. *Inst Ciência Saúde*. 2008; 26(2): 153-156.
18. Domingo, J. L., Bocio, A., Falcó, G., & Llobet, J. M. Benefits and risks of fish consumption: Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*. 2007; 230(2-3): 219-226. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.054>
19. Sitepu, I., Selby, T., Lin, T., Zhu, S., & Boundy-Mills, K. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2014; 41(7): 1061-1070.
20. Souza, A. F., Rodriguez, D. M., Ribeaux, D. R., Luna, M. A., Lima e Silva, T. A., Andrade, R. F. S., Campos-Takaki, G. M. (2016). Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998. *International journal of molecular sciences*. 2016: 17(10):1608. <https://doi.org/10.3390/ijms17101608>
21. Kikukawa, H., Sakuradani, E., Ando, A., Shimizu, S., Ogawa, J. Arachidonic acid production by the oleaginous fungus *Mortierella alpina* 1S-4. 2018. *J. adv res*. 2018; 11:15-22. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.02.003>
22. Liu, B., & Zhao, Z. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*. 2007; 82(8): 775-780. <https://doi.org/10.1002/jctb.1744>

23. Rossi, M., A. Amaretti, Raimond, S. , Leonard, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. *Biodiesel-Feedstocks and Processing Technologies*. 2011; 1: 72-74.
24. 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(1): 50. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-50>
25. Bharathiraja, B., Sridharan, S., Sowmya, V., Yuvaraj, D., & Praveenkumar, R. Microbial oil—a plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresource technol.* 2017; 233: 423-432. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.006>
26. Čertík, M., Sláviková, L., Masrnová, S., & Šjbidor, J. Enhancement of Nutritional Value of Cereals with γ -Linolenic Acid by Fungal Solid-State Fermentations. *Food Technol and Biotechnol.* 2006; 44(1):
27. Li, X., Lin, Y., Chang, M., Jin, Q., & Wang, X. Efficient production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* through integrating fed-batch culture with a two-stage pH control strategy. *Bioresource technology*. 2015; 181: 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.009>
28. Zhao, L., Zhang, H., Wang, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., & Song, Y. ¹³C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Bioresource technology*. 2015; 197: 23-29.
29. Mendoza-López, M. R., Velez-Martínez, D., Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., García-Barradas, O., Sánchez-Viveros, G., & Ferrera-Cerrato, R. Lipid extraction from the biomass of *Trichoderma koningiopsis* MX1 produced in a non-stirring culture for potential biodiesel production. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017; 24(33): 25627-25633.
30. Diwan, B., Parkhey, P., & Gupta, P. From agro-industrial wastes to single cell oils: a step towards prospective biorefinery. *Folia microbiologica*. 2018; 1-22. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0602-7>
31. Fakas, S., Makri, A., Bellou, S., & Aggelis, G. Pathways to aerobic glycerol catabolism and their regulation. *Microbial conversions of raw glycerol*. 2009; 9: 18.
32. Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*. 2011; 36(2): 1097-1108. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.11.040>
33. Chung, Y.S.; Lee, J.W.; Chung, C.H. Molecular challenges in microalgae towards cost-effective production of quality biodiesel. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2017; 74: 139–144.
34. Hesseltine, C.W and Anderson, R.F. 1957. Microbiological Production of Carotenóides I. Zygosporé and Carotene produced by Intraspecific and crosses of Choanephoraceae in Liquid Media. *Mycology*. 49; 449-452.

35. Hoffmann, K, Discher, S, Voigt, K. Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, the *Mycocladiaceae* fam. nov. *Mycol Res.* 2007; 111: 1169–1183. doi:10.1016/j.mycres.2007.07.002
36. Hoffmann K, Walther G, Voigt K (2009) *Mycocladius* vs. *Lichtheimia*: a correction (*Lichtheimiaceae* fam. nov., Mucorales, Mucoromycotina). *Mycol Res* 113:277–278
37. Alastruey-Izquierdo A1, Hoffmann K, de Hoog GS, Rodriguez-Tudela JL, Voigt K, Bibashi E, Walther G. Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia* pro parte, *Mycocladius*). *J. Clinical Microbiol.*, 2010; 48: 2154-2170, 2010.
38. Hoffmann, K., and K. Voigt. *Absidia parricida* plays a dominant role in biotrophic fusion parasitism among mucoralean fungi (Zygomycetes): *Lentamyces*, a new genus for *A. parricida* and *A. zychae*. *Plant Biol.* 2009;11:537-554
39. Further, Thorn et al. *Mycological Research News. Journal of the Linnean Society*, 2009; 155: 449-456.
40. Lins, C. I. M., Cardoso, A., Silva, M. C. F., Batista, A. C. L., Jara, A. M. A. T., Berger, L. R. R., Campos-Takaki, G. M. (2010). Evaluation of chitin and chitosan by different extraction methods from mucoralean fungi biomass. *Asian Chitin J.* 2010; 6: 5-8.
41. Berger, L. R. R., Stamford, T. C. M., Stamford-Arnaud, T. M., de Oliveira Franco, L., do Nascimento, A. E., Cavalcante, H. M. D. M., ... & de Campos-Takaki, G. M. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. *Molecules.* 2014; 19(3): 2771-2792.
42. Cardoso, A., Lins, C. I. M., dos Santos, E. R., Silva, M. C. F., & Campos-Takaki, G. M. . Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules.* 2012; 17(5): 4904-4914. <https://doi.org/10.3390/molecules17054904>
43. Kosa, G., Zimmermann, B., Kohler, A., Ekeberg, D., Afseth, N. K., Mounier, J., Shapaval, V. High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low-and high-value lipids. *Biotechnology for biofuels.* 2018; 11(1): 66. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1070-7>
44. Sajbidor, J., Certik, M., & Dobroňová, S. Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to Mucorales. *Biotechnology letters.* 1988; 10(5): 347-350.

45. Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., 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(1): 60-71.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.06.007>
46. 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*. 2009; 33(4): 573-580.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.09.006>
47. Papanikolaou, S., Rontou, M., Belka, A., Athenaki, M., Gardeli, C., Mallouchos, A., ... & Aggelis, G. Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Engineering in Life Sciences*. 2017; 17(3); 262-281.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201500191>
48. Bellou, S., Makri, A., Sarris, D., Michos, K., Rentoumi, P., Celik, A., Aggelis, G. The olive mill wastewater as substrate for single cell oil production by *Zygomycetes*. *Journal of Biotechnology*. 2014; 170: 50-59.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.11.015>
49. Tzimirotas, D., Afseth, N. K., Lindberg, D., Kjølraug, O., Axelsson, L., Shapaval, V. Pretreatment of different food rest materials for bioconversion into fungal lipid-rich biomass. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2018; 41(7): 1039-1049.
50. Nasr, M. M., Nahvi, I., Keyhanfar, M., & Mirbagheri, M. The effect of carbon and nitrogen sources on the fatty acids profile of *Mortierella vinacea*. *Biological Journal of Microorganism*. 2017. 5(20), 1-8.
51. Carvalho, A. K., Rivaldi, J. D., Barbosa, J. C., & de Castro, H. F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides*—A sustainable pathway for biofuel production. *Bioresource technology*. 2015. 181, 47-53.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.110>
52. Bellou, S.A., A. Moustogianni, A. Makri and Aggelis, G. Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by *Zygomycetes* grown on glycerol. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2012. 166: 146 -158.
<https://doi.org/10.1007/s12010-011-9411-z>
53. Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. Lipid production by oleaginous *Mucorales* cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2007. 109(11), 1060-1070.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200700169>

54. Čertík, M., Berhan, S. S., & Šajbidor, J. Lipid production and fatty acid composition of selected strains belonging to Mucorales. *Engineering in Life Sciences*. **1993**. 13(2), 193-196.
55. Dimitrijevic, M. V., Mitic, V. D., Jovanovic, O. P., Stankov Jovanovic, V. P., Nikolic, J. S., Petrovic, G. M., & Stojanovic, G. S. Comparative Study of Fatty Acids Profile in Eleven Wild Mushrooms of Boletacea and Russulaceae Families. *Chemistry & biodiversity*. **2018**. 15(1), e1700434. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700434>
56. Puiggros, C., Chacon, P., Armadans, L. I., Clapes, J., & Planas, M. Effects of oleic-rich and omega-3-rich diets on serum lipid pattern and lipid oxidation in mildly hypercholesterolemic patients. *Clinical Nutrition*, **2002**. 21(1), 79-87. <https://doi.org/10.1054/clnu.2001.0511>
57. Sheehan, H.L.; Storey, G.W. An improved method of staining leukocyte granules with Sudan Black B. *J. Pathol. Bacteriol.* **1947**, 59, 336
58. Manocha, M.S., G. San-Blas and Centeno, S. 1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *Microbiology*, 117: 147-154.
59. Durham, D. R., and Kloos, W. E. 1978. Comparative Study of the Total Cellular Fatty Acids of Staphylococcus Species of Human Origin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28 (2): 223-228. <https://dx.doi.org/10.1099/00207713-28-2-223>

CAPÍTULO III

(SEGUNDO ARTIGO)

**Síntese verde para produção otimizada de quitosana por fungos
Mucorales usando subprodutos agroindustriais**

Trabalho submetido como artigo no periódico: International Journal Molecular
Sciences (ISSN: 1422-0067)

Fator de Impacto: 4,183

Green Synthesis for Optimized Chitosan Production by Mucorales Fungi Using Agroindustrial by-products

Adriana Ferreira de Souza ^{1,7}, Hugo Marques Galindo ², Marcos Antônio Barbosa de Lima ³, Daylin Rubio Ribeaux ⁴, Dayana Montero Rodríguez ^{5,7}, Rosileide Fontenele da Silva Andrade ^{5,7}, Norma Buarque Gusmão ⁶ and Galba Maria de Campos-Takaki ^{7,*}

¹ Biotechnology Post-Graduation Program, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900, Recife-PE, Brazil; adrife.souza@gmail.com

² Fungal Biology Post-Graduation Program, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brazil; hugo.galindo21@gmail.com

³ Department of Microbiology, Federal Rural University of Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brazil; mablma33@yahoo.com.br

⁴ Biological Sciences Post-Graduation Program, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brazil; drubioribeaux@gmail.com

⁵ Post-Doctorate National Program-CAPES, Catholic University of Pernambuco, 50050-900; Recife-PE, Brazil; dayanamontero87@gmail.com; rosileide_fontenele@yahoo.com.br

⁶ Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, 50670-901; Recife-PE, Brazil; normagusmao@gmail.com

⁷ Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590, Pernambuco, Brazil; galba_takaki@yahoo.com.br

* Correspondence: galba_takaki@yahoo.com.br, Phone: +51-81-21194044; Fax: +55-81-21194043.

Abstract: This study investigated the influence of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CWW) as carbon and nitrogen sources on the morphology and production of biomass and chitosan by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 and *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266. The highest biomass yields of 4.832 g/L (*M. subtilissimus* UCP 1262) and 6.345 g/L (*L. hyalospora* UCP 1266) were produced in assay 2 of the 2² factorial design (culture medium containing 6% CSL and 4% CWW). This condition also favored higher chitosan production (32.471 mg/g) for *M. subtilissimus* UCP 1262. The highest chitosan production (44.91 mg/g) by *L. hyalospora* UCP 1266 was obtained at the central point of the factorial design (4% of CWW and 6% of CSL). According to the statistical analysis, the higher concentration of CSL and lower concentration of CWW contribute significantly to the growth of fungi. The infrared peaks confirmed a deacetylation degree of 80.29% and 83.61% of the chitosans produced by *M. subtilissimus* UCP 1262 and *L. hyalospora* UCP 1266, respectively. Chitosan production of *L. hyalospora* UCP 1266 was optimized using a central composite rotational design, and the highest yield (63.18 mg/g) was obtained in medium containing 8.82% CSL and 7% CWW. Experimental data obtained suggest that utilization of CSL and CWW is a promising way to improve fungal chitosan production.

Keywords: Agro-industrial wastes, biopolymer, Mucorales, dimorphism, pellets.

1. Introduction

In recent times, chitosan is one of the most important polymers on the market. However, special attention has been paid to the development of new processes and sustainable methods of synthesis of this polysaccharide [1].

The chitosan is a heterogeneous polysaccharide containing 2-amino-2-deoxy-D-glucose linked by β 1-4 bonds (glycosamine) and N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucose (N-acetyl glycosamine) , consisting of more than 60% of glycosamine [1,2]. Its cationic nature, chelating ion-binding capacity, protein immobilization, film and gel formation characteristics, chemical reactivity, modifiability, biocompatibility and antimicrobial activity are all warranted due to their heterogeneous structure and presence of ammonium groups of glycosamine [3-5].

Commercial chitosan is derived from the deacetylation of chitin from crustacean residues, where the process requires a strong alkaline treatment with high temperature due to the complex organization of chitin with other components in the exoskeleton crustacean, and is a slow process, high cost and causing environmental pollution due to chemical treatments [6]. In addition, this raw material is seasonally and geographically limited and has highly variable characteristics, which may interfere with product yield and molecular product characteristics [5].

Filamentous fungi, mainly Mucoromycota, formerly belonging to a polyphyletic phylum Zigomycota [7], are known to synthesize natural chitosan in their cell wall, produced by enzymatic deacetylation of the chitin chain, a modification of sugar chains [6,8-14].

Obtaining chitosan from the fungal cell wall presents advantages over the traditional process for deacetylation of shrimp residues, in the process of chitosan extraction does not require high temperatures and strong alkaline solutions by simple chemical procedures, besides the low fungal biomass, content of inorganic materials compared to crustacean residues, not requiring the demineralization process, no heavy metals such as nickel and copper, and most chitosan-producing fungal species have approximately the same deacetylation of degree and lower viscosity and molecular weight than that chitosan obtained from the deacetylation of chitosan from crustaceans [5-6, 11,15]. In addition, fungal chitosan is produced in a controlled and seasonally independent environment [1,5,16].

Given the value of the fungal cell wall as a sustainable route for chitosan production using agroindustrial residues. This article evaluated chitosan

production by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 and *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 cultivated in submerged fermentation using two agroindustrial residues, manipulative and millocin, alternative sources of carbon and nitrogen. In addition, the chitosans produced were characterized in terms of their acetylation degree and viscosity, and their properties compared with those of a commercial chitosan.

2. Results and Discussion

2.1. Effect of substrates concentrations on fungal morphology

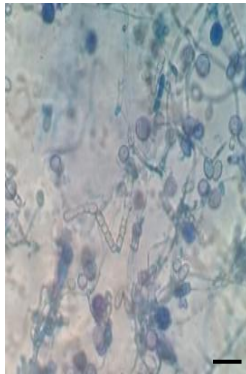
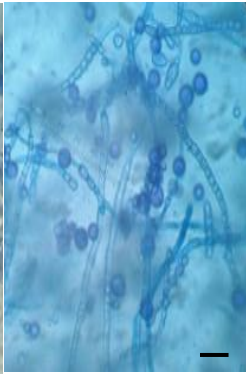
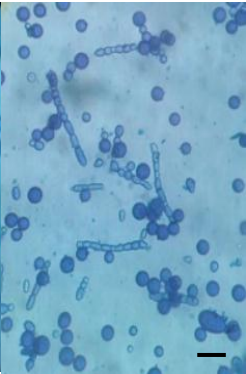
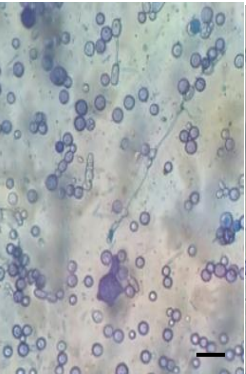
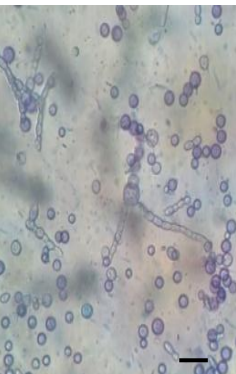


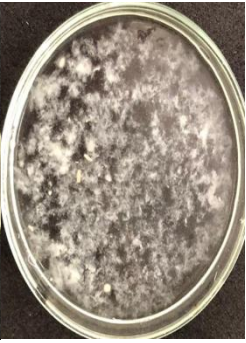


In this study, the effect of the concentrations of CSL and CWW used in 2² factorial design (Table 1) on fungal morphology was evaluated. Microscopic and macroscopic images showed cellular differentiation in *M. subtilissimus* UCP 1266 (Table 2) and *L. hyalospora* UCP 1266 (Table 3).

Table 1. Variables and levels used in the 2² full-factorial design.

Variables	Levels		
	-1	0	+1
CSL (% v/v)	2	4	6
CWW (% v/v)	4	6	8

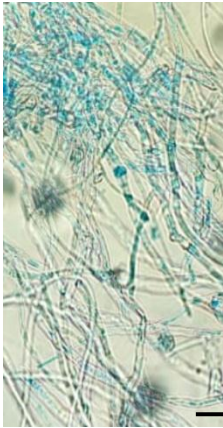

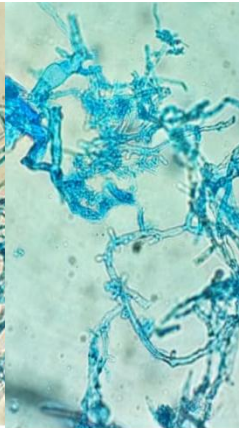
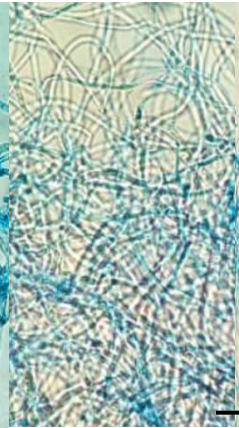



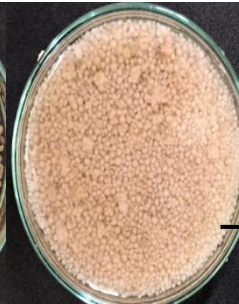


For *M. subtilissimus* the yeast phase was evident in assays 3 and 4 (higher concentrations of CWW, 8%). In the remaining assays, the transition phase (presence of globose cells and short and arthrospores hyphae) was observed (Table 2). In addition to mycelium formation, different filamentous fungal species can grow in yeast, depending on environmental conditions. This transition is called dimorphism [17]. [18] stated that in addition to factors and mechanisms such as initial spore concentration, sugar concentration, and atmospheric factors evaluated in several studies [18-22], the addition of some chemical compounds may affect the fungal morphology. Among them, cyanide, acriflavine and cycloheximide induce yeast morphology due to the inhibition of synthesis or action of cytochrome oxidase. This can be corroborated in current study, considering that CWW presents high cyanide concentrations (444.0 milligrams of cyanide per liter of CWW) [23-24]

Table 2. Morphological aspects of *Mucor subtilissimus* UCP 1262 cultivated in different concentrations of CSL and CWW according to 2² factorial design during 120 h. * Assay 1: 2% CSL and 4% CWW; Assay 2: 6% CSL and 4% CWW; Assay 3: 2% CSL and 8% CWW; Assay 4: 6% CSL and 8% CWW; Central point: 4% CSL and 6% CWW. Bars: 10 µm

Assays				
1	2	3	4	Central point
				
Presence of yeast-like cells and fragments of long and short arthrosporous hyphae	Presence of yeast cells and long and short arthrosporous hyphae.	Predominant presence of yeast-like cells and short arthrospore hyphae.	Dominant presence of budding yeast cells	Dominant presence of yeast-like cells and arthropod short hyphae
				
Predominance of granular mycelium, few areas of differentiation/fragmentation	Predominance of granular mycelium, few areas of differentiation	Presence of scattered mycelia with significant presence of areas of differentiation. Viscous liquid.	Granular mycelium with fragmentation areas	Granular mycelium with fragmentation areas

In submerged cultivation with constant agitation, filamentous fungi exhibit three macroscopic morphologies such as scattered mycelia, clumps (small pellets) and pellets (spherical masses of hyphae) [25-26]. However, due to the predominance of the yeast and transition phase, for *M. subtilissimus* the granular aspect was observed under experimental conditions (Table 3).

Table 3. Morphological aspects of *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266cultivated in different concentrations of CSL and CWW according to the 2² factorial design during 120 h. * Assay 1: 2% CSL and 4% CWW; Assay 2: 6% CSL and 4% CWW; Assay 3: 2% CSL and 8% CWW; Assay 4: 6% CSL and 8% CWW; Central point: 4% CSL and 6% CWW. Bars: 10 μm

Assays				
1	2	3	4	Central point
				
Presence of hyphae without cell lysis	Presence of hyphae without cell lysis	Presence of fragmented hyphae	Presence of hyphae without cell lysis	Presence of hyphae without cell lysis
				
Pellets (2-4 mm) with hollow center and smooth outer zone	Pellets (3-5 mm) with hollow center and loose outer zone	Pellets (1-2mm) with smooth and compact center	Pellets (3-4 mm) with hollow center and loose outer zone	Pellets (4-5 mm) with hollow center and loose outer zone

Unlike *M. subtilissimus* UCP 1262, *L. hyalospora* UCP 1266 showed no dimorphism. No microscopically relevant differences in agro-industrial waste

concentrations were observed (Table 3). *L. hyalospora* UCP 1266 produced different sizes and shapes of pellets that differed with agro-industrial waste concentrations. Hollow pellets over 2 mm in diameter were predominant in all assays except assay 3 (highest CWW level and lower CSL level) with compact and smooth pellets ranging from 1 to 2 mm in diameter. Large and hollow pellets have been observed in several studies [12,27-29] where they suggested that autolysis in the center of these clusters of hyphae is caused by difficulties in oxygen transfer.

According to [25], the composition of the medium can influence the pellet structure, as high concentrations of nitrogen that induce pellet formation. Our results differ from those obtained by [30], who showed that CSL did not influence pellet formation in *Penicillium chrysogenum*. However, METZ and KOSSEN [25] reported that the type of fungal strain is an important factor influencing pellet formation.

2.2. Effect of substrates on biomass and chitosan production by *M. subtilissimus* UCP 1262 and *L. hyalospora* UCP 1266.

Although both fungi showed different patterns in macro-morphology, both showed high potentials in the assimilation of alternative sources of carbon and nitrogen.

Table 4 presents the comparative analysis of the results obtained for biomass and chitosan production in each 2² factorial design. The highest biomass yield produced by *M. subtilissimus* UCP 1262 (4.832 mg/L) and *L. hyalospora* UCP 1266 (6.540 mg/L) was in the culture medium supplemented with CSL 6% and CWW 4%, in which *M. subtilissimus* UCP 1262 presented predominance of long and arthrosporous hyphae and *L. hyalospora* UCP 1266 formed pellets of 4 to 5 mm in diameter. The result suggests that media with higher concentrations of CSL favor the growth of the fungi studied. Similar results were reported by Berger et al. (2014), when using the CSL and CWW in the culture medium for growth by *Cunninghamella elegans*. CSL is a carbohydrate and amino acid rich residue that favors the growth of filamentous and unicellular fungi [23;31,33].

An increase in pH from 6.0 (beginning of fermentation) to 7.1-6.2 was observed in *M. subtilissimus* UCP 1262 cultivation, a result similar to that of [23,32,34]. Lower pH resulted in higher biomass yields, in line with that described by [23].

However, at the end of *L. hyalospora* UCP 1266 cultivation there was a decrease in pH from 6.0 (initial pH) to 5.1. Similar results were observed by [35-36]. Just as low pH favors fungal growth, it also favors chitin deacetylase activity, increasing chitin deacetylation in chitosan [37-38].

Table 4. Factorial design applied to production of biomass and chitosan by *Mucor subtilissimus* and *L. hyalospora* UCP 1266 using CSL and CWW as alternatives substrates.

Assays	Substrates		<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262			<i>Lichtheimia hyalospora</i> UCP 1266		
	CSL	CWW	pH	Biomass (g/L)	Chitosan (mg/g)	pH	Biomass (g/L)	Chitosan (mg/g)
1	2	4	7.1	1.725	18.87	5.8	2.675	23.31
2	6	4	6.2	4.832	32.41	5.2	6.540	29.84
3	2	8	6.9	2.963	13.87	5.8	3.661	23.49
4	6	8	6.9	2.14	14.96	5.6	4.982	42.56
5	4	6	6.4	4.752	19.36	5.1	6.345	44.60
6	4	6	6.2	4.527	19.02	5.2	6.298	44.91
7	4	6	6.4	4.269	18.92	5.2	6.291	44.86
8	4	6	6.4	4.582	19.18	5.1	6.319	45.03

As for biomass production, condition 2 provided the best chitosan yields by *M. subtilissimus* (32.47mg/g), unlike [23] which obtained the best chitosan yield by *C. elegans* in higher concentration of CWW and lower concentration of CSL. [39] when cultivating *C. elegans* in medium added with higher concentration of CSL (7%) obtained the best chitosan yield. [40], when cultivating *Syncephalastrum racemosum* in higher concentrations of CSL (8%), obtained the highest yield of biomass and chitosan.

Similar to *M. subtilissimus* UCP 1262, condition 2 (6% CSL and 4% CWW) provided the highest biomass production (6.540 g/L) by *L. hyalospora* UCP 1266. However, it obtained the highest chitosan production (45.03 mg/g) at the central point of the FFD (4% of CSL and 6% of CWW). Previously, *Rhizopus arrhizus* obtained higher production of the biopolymer also using 4% of CSL [41].

Higher concentrations of cassava wastewater, influenced negatively the chitosan production by *M. subtilissimus*, as well as the fungal morphology, predominantly forming individual spherical cells and budding multiplication. Probably this yeast phase contributed negatively to chitosan production. This assumption is shown in Figure 3 A in condition 3 (2% corn steep liquor and 8% cassava wastewater) and condition 4 (6% of corn steep liquor and 8% cassava wastewater). The influence of dimorphism on chitosan yield was also observed by [20], who detected in the cell wall of *M. rouxii* (now *Rhizopus arrhizus*) in the filament form had higher chitosan yields (9.4%), compared to the yeast phase, which had lower chitosan contents (8.4%).

The same condition that stimulated the *M. subtilissimus* UCP 1262 yeast phase, resulting in low chitosan yields, influenced the formation of compact and smooth pellets by *L. hyalospora* UCP 1266, also causing low biomass and chitosan yields. The best pellet diameter range for chitosan production was 4 to 5 mm, with a content of 45.03 g/kg of dry biomass. In the study of [42], the highest production of glycosamine (107 g/kg), chitosan deacetylated monomer, by *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 was achieved with 16-35 mm pellet formation. [43] analyzed that pellet size affected *R. oryzae* ATCC 20344 glycosamine production. In addition, high glycosamine content (0.19 g / g) was obtained with pellet formation of 5.0 mm and reduction to 1 Mm has negatively influenced glycosamine yield to 0.15 g/g.

Ultrastructural aspects of biomasses with higher chitosan yields were also observed by Scanning electron microscopy. Figure 1 shows the mycelial branches of the *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (6%CSL/4%CWW) with loose mycelium and hyphae with a thickness thinner, tubular, contorted and presence of yeast cells (Fig1a) and *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 (assay central point - 4%CSL/6%CWW) with compact mycelium hyphae with a thickness thinner, tubular, contorted and brittle (Fig1b). This study suggests that *L. hyalospora* UCP 1266 mycelium fragmentation is a result of pellet formation. As other genera of the order Mucorales, they grow rapidly and have tubular-shaped hyphae and no septation. [44] observed morphological aspects of *Rhizopus oryzae* by SEM grown in agroindustrial wastes (soybean meal, wheat and rice) to understand the relationship between morphology and production of glycosamine, lipids and amino acids. According to [45], the culture medium composition and culture conditions influence the metabolic regulation and, consequently, the morphology. The increase in biomass and chitosan is a reliable indicator of the development of the studied fungi.

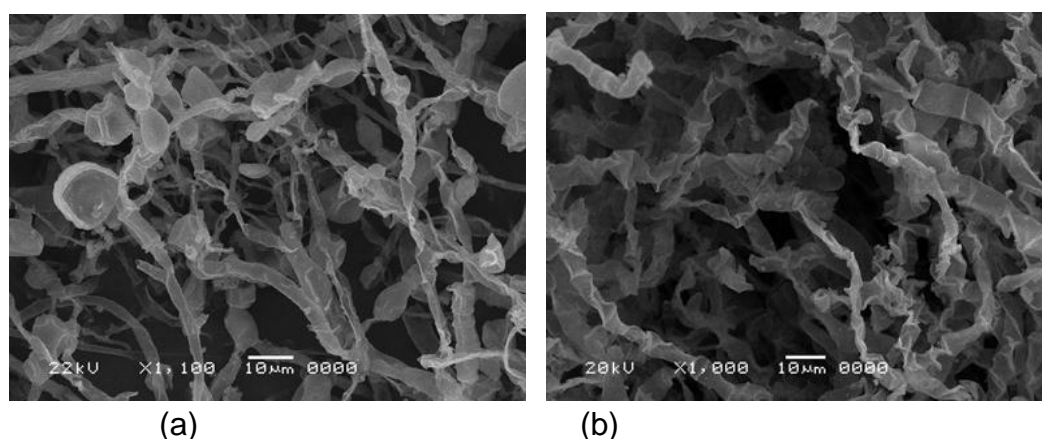


Figure 1. Scanning electron micrograph of mycelium of *Mucor subtilissimus* UCP 1262 and *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266. (a) *Mucor subtilissimus* after culture in assay 2 of the factorial design (CSL 6% and CWW 4%) and (b) *L. hyalospora* after culture in assay central point of the factorial design (CSL 4% and 6% CWW).

The table 5, presents the best results from various studies for biomass and chitosan production by Mucoralean fungi, which suggests that the chitosan content of the fungi depends on the fermentation time, culture medium and cultivation conditions.

Table 5. Biomass and chitosan production by *M. subtilissimus* UCP 1262 and *L. hyalospora* UCP 1266 cultivated in agro-industrial medium compared with the results obtained in the literature by other Mucoralean fungi.

Fungal strain	Production medium	Cultivation conditions	Biomass (g/L)	Chitosan (mg/g)	References
<i>Mucor subtilissimus</i> (UCP 1262)	6% CSL and 4% CWW	SmF, Erlenmeyer, 28°C, 150 rpm, 120 h	4.83	32.41	Present study
<i>Lichtheimia hyalospora</i> (UCP 1266)	4% CSL and 6% CWW	SmF, Erlenmeyer, 28°C, 150 rpm, 120 h	6.298	44.91	Present study
<i>L. hyalospora</i>	1% CSL and 25% papaya peel juice	SmF, Erlenmeyer, 28°C, 150 rpm, 96 h	-	12.04	[46]
<i>Cunninghamella elegans</i> (UCP 542)	9.43% CSL and 42.5% papaya peel juice	SmF, Erlenmeyer, 28°C, 150 rpm, 96 h	-	37.25	[46]
<i>C. elegans</i> (UCP 542)	10% CWW and 4% CSL	SmF, Erlenmeyer, 28°C, 150 rpm, 72 h	5.67	57.82	[23]
<i>Rhizopus arrhizus</i> (UCP 402)	6% CSL and 13.24% honey	SmF, Erlenmeyer, 28°C, 150 rpm, 96 h	11.71	29.30	[32]
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (UCP 1302)	8% CSL and 2% sugarcane bagasse	SSF, Erlenmeyer, 28°C, 96 h	32.0	25.0	[40]
<i>Mucor circinelloides</i> (UCP 050)	Yam bean medium	SmF, Erlenmeyer, 28°C, 150 rpm, 96 h	20.7	64.00	[47]

Continuação					
Fungal strain	Production medium	Cultivation conditions	Biomass (g/L)	Chitosan (mg/g)	References
<i>Mucor rouxii</i> (ATCC 24905) - atual <i>Rhizopus arrhizus</i>	Soybean meal	SSF, Erlenmeyer, 25°C, 144 h	-	34.40	[5]
<i>Rhizomucor miehei</i> (ATCC 26282)	Sabouraud broth	SmF, Erlenmeyer, 28°C, 120 rpm, 168 h	4.1	13.67	[48]
<i>Mucor racemosus</i>	Sabouraud broth	SmF, Erlenmeyer, 28°C, 120 rpm, 168 h	3.8	11.72	[48]

* SmF: Submerged fermentation; SSF: solid-state fermentation.

The figure 2, presents the influence of the independent variables, CSL (1), CWW (2) and the interaction between these variables (1x2) on biomass production by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 and *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266, using factorial design, with statistical significance ($p < 0.05$).

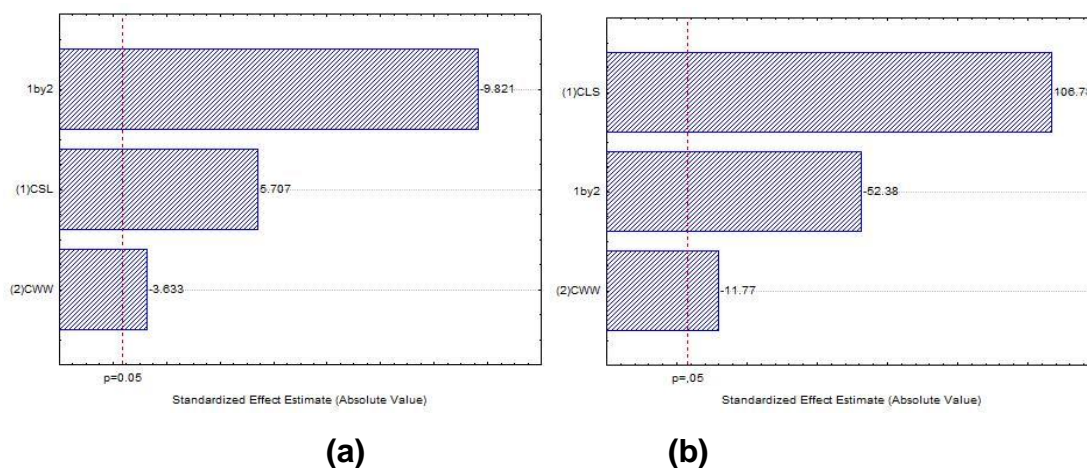


Figure 2. Pareto chart of standardized effects of CSL (1) and CWW (2) on the biomass production by *M. subtilissimus* UCP 1262 (A) e *L. hyalospora* UCP 1266 (B).

The Pareto chart illustrates that the increase in the concentration of CSL (1) positively influenced the growth of the microorganisms. However, lower levels of CWW (2) are suggested for biomass production (FIG.2 A and B). The interaction of the independent variables (1x2) showed that the maximum level of CSL (1) and the minimum level of CWW (2), had an antagonistic interaction,

with significant influence on the biomass production in both microorganisms (FIG.2 A and B).

The Pareto graph (figure 3A) proves that higher levels of the independent variable CSL (1) significantly influenced the chitosan production. However, lower levels of the CWW (2) significantly influenced the production of chitosan by *M. subtilissimus* UCP 1262. The interaction of the independent variables (1x2) significantly influenced, antagonistically, the chitosan production by *M. subtilissimus*.

Figure 3B shows that higher concentrations of both independent variables CSL and CWW, exhibited a significant influence on the chitosan production by *L. hyalospora* UCP 1266. Consequently, the interaction of the variables (1x2) was significant suggesting that the synergic effect of these substrates stimulated the biopolymer production.

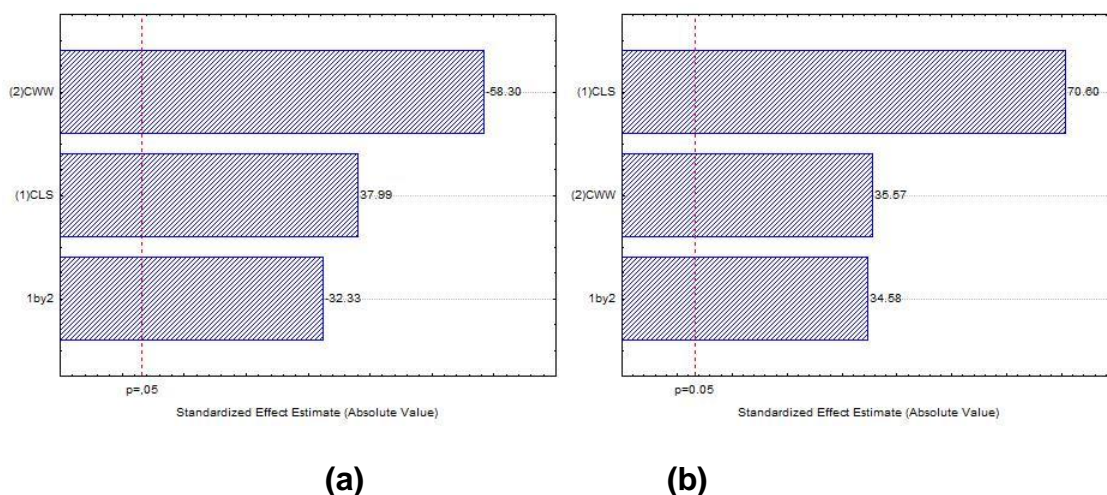


Figure 3. Pareto chart of standardized effects of CSL (1) and CWW (2) on the chitosan production by *M. subtilissimus* UCP 1262 (A) e *L. hyalospora* UCP 1266 (B).

2.3. Characterization of chitosan extracted from *M. subtilissimus* UCP 1262 and *L. hyalospora* UCP 1266

2.3.1. Degree of deacetylation

Chitosan extracted from the fungal biomass of *M. subtilissimus* UCP 1262 and *L. hyalospora* UCP 1266 were characterized by FTIR spectroscopy. The data obtained allowed the identification of extracted chitosan as well as the estimation of the degree of deacetylation (DD%), a fundamental parameter that influences the biological and physicochemical properties of the biopolymer. The degree of deacetylation of the fungal chitosan is shown in Table 7 and Figure 5. The amide I and amine bands of chitosans extracted from *M. subtilissimus* UCP 1262 were found adsorption band 1642-1545 cm^{-1} . In the case chitosan obtained from *L. hyalospora* UCP 1266, the analysis from the FTIR spectrum

showed showed a broad adsorption band at 1649 cm^{-1} attributed the amide I, and the amine band was 1556 cm^{-1} .

Table 6. Characterization of chitosan samples produced by *M. subtilissimus* UCP 1262 and *L. hyalospora* UCP 1266 in CWW and CSL.

Biopolymers	Degree of deacetylation (DD%)	Viscosity (cP)
Chitosan from <i>L. hyalospora</i> UCP 1266	83.61	2.78
Chitosan from <i>M. subtilissimus</i> UCP1262	80.28	3.06

As shown in figure 4, the bands at 1545 cm^{-1} (*M. subtilissimus* UCP 1262) and 1556 cm^{-1} (*L. hyalospora* UCP 1266) show significant intensities, suggesting stable deacetylation in the chitosan of microorganisms. When chitin deacetylation occurs, the amide I band (C = O-NHR) decreases while amide II growth occurs, indicating the prevalence of NH_2 groups [49]. According to [50], when the range of $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ is stressed, it suggests an intensification of deacetylation

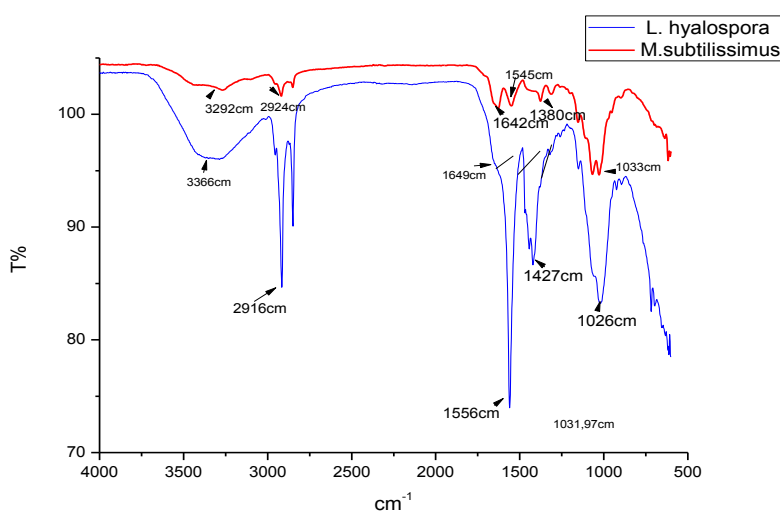


Figure 4. Infrared spectra of chitosan produced by by *M. subtilissimus* UCP 1262 (—) and *L. hyalospora* UCP 1266 (—)

The higher DD% fungal chitosan more appropriate for food industrial application, principally when it was used as an antimicrobial [51].

The viscosity of chitosan from the *M. subtilissimus* UCP 1262 (3.06cP) and *L. hyalospora* UCP 1266 (2.78cP), which was considerably lower. Similar results were obtained in the studies to the viscosity of fungal chitosan to the

viscosity of fungal chitosan ranged from 1.02–2.67cP [52-54]. The commercial chitosan, extracted from natural shellfish exoskeleton, may have deacetylation degree 80.0% –95.0% and viscosity 20–500 cP [54].

2.3. Optimization of Chitosan production by *L. hyalospora* UCP 1266

Due to the results obtained from the previous factorial design *L. hyalospora* UCP 1266 was selected for a further DCCR 2², as it presented the highest chitosan productivity in the culture media with CSL and CWW. For this, the levels of CSL were increased and the higher levels of CWW around the central point of the previous factorial design were maintained. Since the studied concentrations may have allowed a higher activity of chitin deacetylase, enzyme responsible for the deacetylation of chitin in cell wall [55].

The results of the experiments that evaluated the influence of different concentrations of CSL and CWW on the production of biomass and chitosan by *L. hyalospora* UCP 1266 are shown in Table 7.

Table 7. Central composite rotatable design applied to the production of biomass and chitosan by *L. hyalospora* UCP 1266 using CSL and CWW as alternatives substrates.

Assays	CSL (%)	CWW (%)	pH	Biomass (g/L)	Chitosan (mg/g)	Chitosan (mg/L)
1	4	6	5.4	6.32	44.88	283.64
2	4	8	5.6	5.59	46.83	261.78
3	8	6	5.4	9.34	51.98	485.49
4	8	8	5.4	8.79	54.03	474.92
5	3.17	7	5.8	5.48	46.89	256.96
6	8.82	7	4.8	11.87	63.18	749.95
7	6	5.58	5.4	7.81	48.09	375.58
8	6	8.41	5.4	7.26	57.81	437.04
9	6	7	4.8	9.14	58.46	534.32
10	6	7	5.1	9.09	58.71	533.67
11	6	7	5.2	8.91	58.42	520.52
12	6	7	4.8	9.19	58.90	541.29

From the calculation of the coefficients it was obtained an equation adjusted to the experimental data, with the effects of the two independent variables (CSL and CWW) on the production of chitosan (Eq. (1)).

$$Z_{\text{Chitosan}} (\text{mg/g}) = -191,65 + 11,04 \cdot x - 0,73 \cdot x^2 + 57,81 \cdot y - 3,97 \cdot y^2 + 0,012 \cdot x \cdot y$$

According to the response surface graph (Fig. 5) and Eq. (1), the highest chitosan production by *L. hyalospora* UCP 1266 (63.18 mg / g) was achieved in medium containing the highest concentration of CSL (+1.41) and center point of the CWW (Test 6). The coefficient of determination (R^2) of the obtained model was 0.85, showing good suitability of the experimental data.

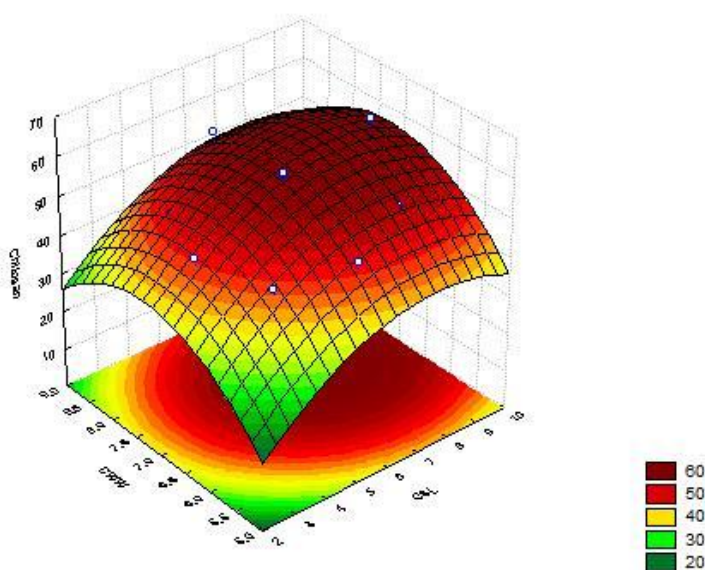


Figure 5. Response surface graphs of the chitosan production by *L. hyalospora* grown in medium formulated with CSL and CWW for 120 h at 28 °C.

4. Materials and Methods

4.1. Microorganisms

Two strains of fungi belonging to the order Mucorales were used in assays for chitosan production: *M. subtilissimus* UCP 1262 and *L. hyalospora* UCP 1266. These strains were originally isolated from soil from Caantiga, (Pernambuco, Brazil) and were kindly provided by the Culture Collection of the Catholic University of Pernambuco (Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil). The strains were kept in Sabouraud Agar medium (consisting of agar 20 g, peptone 10 g, glucose 40 g, distilled water 1000 ml, and pH adjusted to 6.0), at 5 °C.

4.2. Substrates

The substrates used for lipid and chitosan production were cassava wastewater (CWW), kindly provided by the cassava processing plant located in the municipality of Carnaíba, Pernambuco, and corn steep liquor, obtained from Corn Products do Brasil Ltda. (Cabo de Santo Agostino, Pernambuco, Brazil). Aliquots of CSL were subjected to elemental analysis to determine the amounts of carbon, hydrogen and nitrogen (%) using the EA 1110 analyzer (Carlo Erba Instruments). Table 1 shows the chemical composition of the cassava wastewater [23] e CSL.

4.3. *Conditions of culture and biomass production*

The fungi were grown in Petri dishes (9 cm in diameter) containing Sabouraud Agar medium, incubated at 28 °C for 5 days until sporulation. Then, the spores were transferred to Erlenmeyer flasks (250 mL) containing sterile distilled water to prepare a suspension of 10^7 spores/mL. Aliquots (1 mL) of these spore suspensions were used as inoculum and transferred to Erlenmeyer flasks (250 mL) with 100 mL of the media containing CSL and CWW, according to the factorial design (Table 1).

The flasks were incubated at 28 °C on an orbital shaker at 150 rpm for 120 h. At the end of this period, the pH of the media was analyzed using a potentiometer. The biomass was centrifuged and washed with distilled water. For morphological analysis, small mycelium fragments were removed from the biomass, stained with blue cotton dye and observed under the optical microscope. The remaining biomass was lyophilized and kept in a desiccator to determine the constant weight by gravimetry.

4.4. *Morphological analysis in Scanning Electron Microscopy (SEM)*

The biomass was washed in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 and fixed with glutaraldehyde 2.5% in phosphate buffer, 0.1M, pH 7.4 for 1 h at room temperature. In the post-fixation malachite green 0.05% was used in phosphate buffer for 1h at room temperature in dark conditions. They were then subjected to the dehydration process with ethanol in proportions of 50, 70, 90 and 100%. Samples were then placed on aluminum supports and analyzed by Scanning Electron Microscopy (LSM JEOL 5600 LV).

4.5. *Extraction chitosan*

Chitosan was extracted as described by [56]. Briefly, the biomass was deproteinized with the addition of sodium hydroxide solution (1 M, 30 mL, v/v) and subjected to 121 °C for 15 min. The insoluble alkali fraction was separated by centrifugation (4000 rpm, 15 min). The remaining biomass was washed several times with saline solution (0.85%) and cold distilled water to reach pH 7.0. The obtained residue was treated with acetic acid (2%, 30 mL, v/v) for 15 min, 100 °C), centrifuged (4000 rpm) and filtered. The supernatant was alkalized to pH 9.0, stored at 4 °C for 24 h and centrifuged (4000 rpm, 15 min) until chitosan precipitated. The chitosan was washed with cold distilled water and saline solution at pH 7.0 and then lyophilized.

4.6. Characterization of chitosan

4.6.1. Infrared Spectroscopy (FTIR)

The chitosan was previously dried overnight at 60 °C under reduced pressure and homogenized with 100 mg potassium bromide (KBr). Discs prepared with potassium bromide were placed to dry for 24 h at 110 °C under reduced pressure. Infrared ray spectroscopy was performed using a Fourier Transform (FTIR) BRUKER Mod. IFS. Discs with only potassium bromide were used as reference. The maximum intensity of the absorption bands was measured by the base line.

4.6.2. Deacetylation degree

The absorbance bands 1320 cm⁻¹ and 1420 cm⁻¹ were used to measure the degree of acetylation according to [57], to later obtain the deacetylation degree of chitosan, as shown in the equation:

$$DD \% = A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133$$

4.6.3. Viscosity Determination

The viscosity of 1% chitosan in 1% acetic acid solution was determined using the automatic viscometer (Brookfield - Middleboro, MA, USA; TC 500).

4.7. Selection of waste concentrations in culture using factory design.

To study the effect of the independent variables (CSL and CWW) and their interaction on the response variables (biomass and chitosan), was performed a 2² factorial design, consisting of 8 assays, with 4 central points (Table 2).

4.8. Central composite rotational design (CCRD) for optimization of chitosan production by *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266

To establish the optimal conditions for chitosan production by *Lichtheimia hyalospora* a CCRD 2² was performed to analyze the effects of CWW (5.58-8.41%; v/v) and CSL (3.58-6.41%; v/v) (independent variables). The experimental design consisted of 12 runs that included four repetitions at the center point. The 12 assays were prepared in standard order. In each experiment were calculated the biomass and chitosan production. Inoculum, incubation period and biomass yield are described in Section 4.3.

5. Conclusions

The results of this study showed the potential of *M. subtilissimus* UCP 1262 and *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 to convert agro-industrial residues (CWW and CSL) for biomass and chitosan production.

Mixtures of CSL and CWW are promising substrates that reduce the cost of chitosan production from Mucorales fungi.

Dimorphism influenced negatively biomass and chitosan production by *M. subtilissimus* UCP 1262

Larger pellet diameter ranges provided higher chitosan yields by *L. hyalospora* UCP 1266

The studied strains can be a quality source for chitosan production, due to the degree of deacetylation and its ease of manipulation in the laboratory.

Acknowledgments: This work was financially supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES) and Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE). Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, Brazil, and Center of Strategic Technologies of the Northeast (CETENE), Brazil, for use of laboratories.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tyliszczak, B., Drabczyk, A., Kudłacik-Kramarczyk, S., & Sobczak-Kupiec, A. Sustainable Production of Chitosan. In *Sustainable Production: Novel Trends in Energy, Environment and Material Systems*. Springer, Cham. **2020**. 45-60.
2. Kaur, S., Dhillon, G. S. The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. *Critical reviews in Microbiology*. **2014**. 40, 155-175.
3. Dutta, P. K., Dutta, J.,; Tripathi, V.S.,. *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications*. **2004**.
4. Badawy, M. E., Rabea, E. I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, **2011**. 2011.
5. Mondala, A., Al-Mubarak, R., Atkinson, J., Shields, S., Young, B., Senger, Y. D. S., Pekarovic, J. Direct Solid-State Fermentation of Soybean Processing Residues for the Production of Fungal Chitosan by *Mucor rouxii*. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*. **2015**. 3. 11.
6. Vaingankar, P. N., Juvekar, A. R. Fermentative production of mycelial chitosan from zygomycetes: media optimization and physico-chemical characterization. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. **2014**. 5(12), 940.

7. Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., James, T. Y. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. **2016**. 108(5), 1028-1046.
8. Cardoso, A., Lins, C. I. M., dos Santos, E. R., Silva, M. C. F., Campos-Takaki, G. M. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules*. **2012**. 17(5), 4904-4914.
9. Santos, E., da Silva, M., de Souza, P., da Silva, A., de Paiva, S., Albuquerque, C., Campos-Takaki, G. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. *Molecules*, **2013**. 18(9), 10095-10107.
10. Berger, L., Stamford, T., Stamford-Arnaud, T., de Oliveira Franco, L., do Nascimento, A., Cavalcante, H., Campos-Takaki, G. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. *Molecules*, **2014**. 19(3), 2771-2792.
11. Akila, R. M. Fermentative production of fungal Chitosan, a versatile biopolymer (perspectives and its applications). *Adv Appl Sci Res*. **2014** v. 5, n. 4, p. 157-170, 2014.
12. Satari, B., Karimi, K., & Zamani, A. Oil, chitosan, and ethanol production by dimorphic fungus *Mucor indicus* from different lignocelluloses. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. **2016**. 91(6), 1835-1843.
13. Zininga, J. T., Puri, A. K., Govender, A., Singh, S., Permaul, K. Concomitant production of chitosan and lipids from a newly isolated *Mucor circinelloides* ZSKP for biodiesel production. *Bioresource technology*. **2019**. 272, 545-551.
14. Saini, S., Dhania, G. Cadmium as an Environmental Pollutant: Ecotoxicological Effects, Health Hazards, and Bioremediation Approaches for Its Detoxification from Contaminated Sites. In *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*. Springer, Singapore. **2020**. 357-387.
15. Tan, S. C., Tan, T. K., Wong, S. M., Khor, E. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydrate Polymers*. **1996**. 30(4), 239-242.
16. White, S. A., Farina, P. R., Fulton, I. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1979**. 38(2), 323-328.
17. Ruiz-Herrera, J. *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. CRC press. **2016**.
18. Karimi, K., & Zamani, A. *Mucor indicus*: biology and industrial application perspectives: a review. *Biotechnology advances*. **2013**. 31(4), 466-481.
19. Bartnicki-Garcia, S., & Nickerson, W. J. Induction of yeastlike development in *Mucor* by carbon dioxide. *Journal of Bacteriology*. **1962**. 84(4), 829-840.
20. Bartnicki-Garcia, S., & Nickerson, W. J. Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochimica et biophysica acta*. **1962**. 58(1), 102-119.
21. Bartnicki-Garcia, S. (1968). Control of dimorphism in *Mucor* by hexoses: inhibition of hyphal morphogenesis. *Journal of bacteriology*. **1968**. 96(5), 1586-1594.

22. Sharifia, M., Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. **2008**. 35(11), 1253-1259.
23. Berger, L., Stamford, T., Stamford-Arnaud, T., de Oliveira Franco, L., do Nascimento, A., Cavalcante, H., de Campos-Takaki, G. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. *Molecules*. **2014**. 19(3), 2771-2792.
24. Araújo, N. C. D., Lima, V. L. A., Ramos, J. G., Andrade, E. M. G., Lima, G. S. D. Oliveira, S. J. C. (2019). Contents of macronutrients and growth of 'BRS Marataoã' cowpea fertigated with yellow water and cassava wastewater. *Environment and Water* **2019**. 14(3).
25. Metz, B., & Kossen, N. W. F. The growth of molds in the form of pellets—a literature review. *Biotechnology and bioengineering*, 19(6), **1977**. 781-799.
26. Papagianni, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology advances*, **2004**. 22(3), 189-259
27. Kim, W. J., Lee, W. G., Theodore, K., & Chang, H. N. Optimization of culture conditions and continuous production of chitosan by the fungi, *Absidia coerulea*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **2001**. 6(1), 6-10.
28. Gow, N. A., & Gadd, G. M. (Eds.). *Growing fungus*. Springer Science & Business Media. **2007**.
29. Sitanggang, A. B., Wu, H. S., Wang, S. S., & Ho, Y. C. Effect of pellet size and stimulating factor on the glucosamine production using *Aspergillus* sp. BCRC 31742. *Bioresource technology*, **2010**. 101(10), 3595-3601.
30. Pirt, S. J., & Callow, D. S. Continuous-flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology. *Nature*, **1959**. 184(4683), 307-310.
31. Berger, L. R. R., Cardoso, A., Stamford, T. C. M., Cavalcante, H. M. M., Macedo, R. O., Campos-Takaki, G. M. Agroindustrial waste as alternative medium in the production of chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus*—A factorial design. *Asian Chitin J*, **2011**. 7, 83-90.
32. Cardoso, A., Lins, C. I. M., dos Santos, E. R., Silva, M. C. F., & Campos-Takaki, G. M. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules*. **2012**. 17(5), 4904-4914.
33. Souza, A., Rodriguez, D., Ribeaux, D., Luna, M., Lima e Silva, T., Andrade, R., Campos-Takaki, G. Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998. *International journal of molecular sciences*. **2016**. 17(10), 1608.
34. Cardoso, A., Marques, A., Campos Marinho, P. H., Shiosaki, R. K., Campos Takaki, G. M. Influence of the heavy metals on chitosan production by *Absidia corymbifera* UCP 0134. In *Microorganisms In Industry And Environment: From Scientific and Industrial Research to Consumer Products* . **2011**. 176-180.

35. Santos, E., da Silva, M., de Souza, P., da Silva, A., de Paiva, S., Albuquerque, C., Campos-Takaki, G. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 biomass and chitosan with amino acid supply. *Molecules*, **2013**. 18(9), 10095-10107.
36. Berger, L., Stamford, T., Stamford-Arnaud, T., de Alcântara, S., da Silva, A., da Silva, A., Campos-Takaki, G. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* strains. *International journal of molecular sciences*, **2014**. 15(5), 9082-9102.
37. Nwe, N., Chandkrachang, S., Stevens, W. F., Maw, T., Tan, T. K., Khor, E., & Wong, S. M. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. *Carbohydrate Polymers*, **2002**. 49(2), 235-237.
38. Zhao, Y., Park, R. D., & Muzzarelli, R. A. Chitin deacetylases: properties and applications. *Marine drugs*, **2010**. 8(1), 24-46.
39. de Oliveira, C. E. V., Magnani, M., de Sales, C. V., de Souza Pontes, A. L., Campos-Takaki, G. M., Stamford, T. C. M., & de Souza, E. L. (2014). Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). *International journal of food microbiology*, **2014**. 171, 54-61.
40. Leite, M. V., Stamford, T. C., Stamford-Arnaud, T. M., Lima, J. M. N., Silva, A. M., Okada, K., Campos-Takaki, G. M. Conversion of agro-industrial wastes to chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. **2008**. 8 (4), 5-11.
41. Lins, C. I. M., Cardoso, A., Silva, M. C. F., Batista, A. C. L., Jara, A. M. A. T., Berger, L. R. R., Campos-Takaki, G. M. Evaluation of chitin and chitosan by different extraction methods from mucoralean fungi biomass. *Asian Chitin J*, **2010**. 6, 5-8.
42. Sparringa, R. A., & Owens, J. D. Glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Microbiology*. **1999**. 47(1-2), 153-157.
43. Liao, W., Liu, Y., Frear, C., & Chen, S. Co-production of fumaric acid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material–dairy manure–using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Bioresource technology*, 99(13), **2008**. 5859-5866.
44. Denardi-Souza, T., Massarolo, K. C., Tralamazza, S. M., & Badiale-Furlong, E. Monitoring of fungal biomass changed by *Rhizopus oryzae* in relation to amino acid and essential fatty acids profile in soybean meal, wheat and rice. *CyTA-Journal of Food*. **2018**. 16(1), 156-164.
45. Kroll, K., Paehtz, V., & Kniemeyer, O. Elucidating the fungal stress response by proteomics. *Journal of proteomics*, **2014**. 97, 151-163.
46. Berger, L. R. R., Stamford, T. C. M., de Oliveira, K. Á. R., Pessoa, A. D. M. P., de Lima, M. A. B., Pintado, M. M. E., ... & de Souza, E. L. Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. *International journal of biological macromolecules*, **2018**. 108, 635-641.
47. Fai, A. E. C., Stamford, T., Stamford-Arnaud, T. M., Santa-Cruz, P. D., Silva, M. C., Campos-Takaki, G. M., & Stamford, T. L. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced

- by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. *Molecules*, **2011**. 16(8), 7143-7154.
48. Tajdini, F., Amini, M. A., Nafissi-Varcheh, N., & Faramarzi, M. A. (2010). Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. *International journal of biological macromolecules*, 47(2), 180-183.
49. Kumari, S., & Rath, P. K. Extraction and characterization of chitin and chitosan from (*Labeo rohita*) fish scales. *Procedia Materials Science*, **2014** .6, 482-489.
50. Zvezdova, D. Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in Black Sea. *Annual Proceedings, "Angel Kanchev" University of Ruse*, **2010**. 49(9.1), 65-69.
51. Dakia, P. A., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., Paquot, M. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pretreatment. *Food Hydrocolloids*, **2008**. 22(5), 807-818.
52. Tayel, A. A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., Nickisch-Hartfiel, A. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *International journal of biological macromolecules*, **2010**. 47(1), 10-14.
53. Dhillon, G. S., Kaur, S., Sarma, S. J., Brar, S. K. Integrated process for fungal citric acid fermentation using apple processing wastes and sequential extraction of chitosan from waste stream. *Industrial crops and products*, **2013**. 50, 346-351.
54. Yang, L., Li, X., Lai, C., Fan, Y., Ouyang, J., & Yong, Q. Fungal chitosan production using xylose rich of corn stover prehydrolysate by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **2017**. 31(6), 1160-1166.
55. Latha, S., & Suresh, G. Studies on chitosan production from different fungal mycelium. *Growth*, **2013**. 564(327), 189.
56. Hu, K. J., Hu, J. L., Ho, K. P., & Yeung, K. W. Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydrate Polymers*, **2004**. 58(1), 45-52.
57. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, **2001**. 42(8), 3569-3580.

CAPÍTULO IV

(TERCEIRO ARTIGO)

Produção simultânea e sustentável de lipídeos e quitosana por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 isolado do solo da Caatinga-Brasil para produção de ácidos graxos essenciais

Trabalho a ser submetido ao periódico: : International Journal Molecular Sciences (ISSN: 1422-0067)

Fator de impacto: 4,183

Produção concomitante e sustentável de lipídeos e quitosana por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 isolado do solo da Caatinga-Brasil para produção de ácidos graxos essenciais

Adriana Ferreira de Souza^{1,6}, Hugo Marques Galindo^{2,6}, Davi de Lima Cavalcanti^{3,6}, Rosileide F. Silva Andrade^{4,6}, Norma Buarque Gusmão⁵, Galba Maria de Campos-Takaki^{6,*}

¹ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife-PE, Brasil; adrife.souza@gmail.com

² Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife-PE, Brasil.

³ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Recife-PE, Brazil.

⁴Pós- doutorado - CAPES, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900 Recife-PE, Brasil.

⁵Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife-PE, Brasil

⁶Núcleo de Pesquisa em Ciências ambientais e Biotecnologia, universidade Católica de Pernambuco, 50050-900 Recife-PE, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a produção simultânea de quitosana e de lipídeos por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em glicerol bruto do biodiesel e milhocina como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, de acordo com planejamento fatorial. As biomassas liofilizadas foram submetidas à extração de lipídeos totais por solventes orgânicos e posteriormente lavadas e submetidas à extração de quitosana através de tratamento álcali-ácido. Os maiores rendimentos de lipídeos totais (44,27%) e quitosana (44,89mg/g) foram obtidos no ponto central do planejamento fatorial (5% de glicerol bruto e 5% de milhocina). De acordo com dados estatísticos o alto nível de milhocina influenciou significadamente sobre a produção de biomassa e quitosana. A maior concentração de glicerol residual contribuiu significadamente no acúmulo de lipídeos totais. Os picos de infravermelho confirmaram um grau de 80,25%, valores superiores ao valor mínimo de GD% (isto é, 50%) considerados característicos para a molécula de quitosana. Os dados experimentais sugerem que a capacidade do *M. subtilissimus* UCP 1262 metabolizar esses resíduos agroindustriais a torna uma fonte alternativa de lipídeos e quitosana.

PALAVRAS-CHAVE: Ácidos graxos poli-insaturados; Resíduos agroindustriais; Biopolímero; Mucorales; Glicerol; Milhocina.

1. INTRODUÇÃO

Fungos Mucorales são reconhecidos por produzirem quitina e quitosana em suas paredes celulares, uma fonte alternativa para esses biopolímeros, substituindo as fontes tradicionais, resíduos de carcinicultura, em que a produção é afetada por variações sazonais (GHOMARDE et al., 2017; ZININGA et al., 2019). Os mucoraleanos sintetizam naturalmente a quitosana em sua parede celular, através da produção da enzima desacetilase, que por sua vez pode ser obtida por métodos químicos simples, não requer altas temperaturas e nem necessita do processo de desmineralização, além de não apresentar metais pesados e um alto grau de pureza e de desacetilação (BERGUER et al., 2014; GHOMARDE et al., 2017).

A quitosana é um copolímero contido por glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicose) e N-acetilglucosamina (N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicose) (GHOMARDE et al., 2017, AHMAD et al., 2019), apresenta propriedades como alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-toxicidade, atividade antimicrobiana e capacidade quelante que colaboram pelo seu interesse de produção e aplicação como materiais funcionais na medicina, farmácia, alimentação e entre outras áreas (BUI, PARK e LEE, 2017).

A capacidade de mucorales oleaginosos em produzir ácidos graxos poli-insaturados como os gêneros *Umbelopsis*, *Cunninghamella*, *Mucor* (KOSA et al., 2018) torna-os não apenas uma fonte de ácidos graxos essenciais, mas também como fonte de produção simultânea de diversos produtos, como produção de enzimas (SANTIAGO et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2016) quitosana (BERGUER et al., 2014, SILVA et al., 2016; BERGUER et al., 2018; ZININGA et al., 2018), biossurfactantes (ANDRADE SILVA et al., 2014; ANDRADE et al., 2018; PELE et al., 2018) e bioetanol (SATARI e KARIMI, 2018). Além das vantagens relativas à capacidade de produção de quantidades significativas de lipídeos, são facilmente cultivados em meios de cultura com fontes nutricionais alternativas e serem independentemente das condições climáticas, esses microrganismos requerem menos espaço para ser produzido e apresentam maior produtividade (HUANG et al., 2013; ADARME-VEGA et al., 2014).

Assim como a quitosana, os lipídios naturais simples, como ácidos graxos, exibem propriedades antimicrobianas e são capazes de matar bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, vírus envelopados e fungos, sendo dignos de pesquisas na era pós-antibiótico (THOMAR, 2011; CHURCHWARD, ALANY e SNYDER, 2018). As propriedades antifúngicas e bactericidas dos ácidos graxos são bem conhecidos há mais de 100 anos (LAMAR, 1911, CHATTAWAY, THOMPSON e BARLOW, 1956; KABARA et al., 1972; THOMAR, 2011; JACKMAN et al., 2016).

Este estudo focaliza na produção simultânea de quitosana e de lipídeos por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em glicerol bruto do biodiesel e milhocina, sendo as biomoléculas produzidas destinadas a atividade antimicrobiana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MICRORGANISMO

O fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 foi isolado do solo da Caatinga, Serra Talhada-PE, Brasil (7o59'31 "S, 38o17'54" W) e após identificação foi depositado na UCP (Universidade Católica Pernambuco) e registrado n° 927 no World Federação de Coleções Culturais (WFCC).

2.1.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

O fungo do solo foi isolado por diluição seriada e semeado em ágar Sabouraud dextrose (10,0g de peptona, 40,0g de glicose, 15,0g de ágar, 1000ml de água destilada), com cloranfenicol (100 mg.L⁻¹). As placas foram incubadas a 28 ° C. Após o crescimento, a colônia purificada foi transferida para tubos de ensaio com Agar de Dextrose de Batata (BDA) e preservada a 5 ° C. Lâminas com fragmentos do fungo foram montadas em água esterilizada e corante azul de algodão e observado ao microscópio óptico. O fungo foi identificado através da análise da cor, aparência e diâmetro das colônias e microestruturas, conforme descrito por Schipper e Samson (1979), Trufem (1981), Alves et al. (2000), Souza et al., (2016).

2.2. SUBSTRATOS

Os substratos utilizados foram a milhocina gentilmente cedida pela Corn Products Ltda e o glicerol bruto da fabricação de biodiesel utilizando óleo de algodão, gentilmente cedido pela Unidade Experimental de Produção de Biodiesel do Centro Nordeste de Tecnologias Estratégicas (CETENE, Recife-PE, Brasil). Alíquotas de milhocina e manípueira foram submetidas à análise elementar para determinar as quantidades de carbono, hidrogênio e nitrogênio (%) utilizando o analisador modelo EA 1110 (Carlo Erba Instruments). Para avaliar qualitativamente o percentual de gorduras e ácidos graxos do glicerol bruto foi realizada uma separação de fases dos constituintes presentes no resíduo. O glicerol foi previamente aquecido a 60 °C, acidificado com H₂SO₄, 6N, agitado manualmente e colocado em repouso por 48h.

2.3. PRODUÇÃO DE BIOMASSA

O cultivo para produção de biomassa por *M. subtilissimus* UCP 1262 foi em frascos de Erlenmeyers de 250mL contendo 50mL com concentrações diferentes milhocina e glicerol residual de acordo com o planejamento fatorial 2² e os dados foram analisados utilizando o software STATISTIC versão 7.0 (StatSoft Inc., EUA) (Tabela 1).

Os frascos foram incubados durante 120 h a 28 °C, sob agitador orbital a 150 rpm (rotação por minuto). A biomassa foi obtida a partir do líquido metabólico por filtração a vácuo, lavada com água destilada gelada, filtrada em papel de filtro, liofilizada e em seguida mantida em dessecador até peso constante. A produção de biomassa foi determinada por gravimetria.

Tabela 1. Matriz para o planejamento fatorial utilizado para avaliar a influência dos dois resíduos agroindustriais na produção de lipídios por *Mucor subtilissimus* UCP 1262.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Milhocina (%)	2	5	8
Glicerol bruto (%)	2	5	8

2,5 ANÁLISE CITOQUÍMICA DE LIPÍDEOS

Uma análise citoquímica dos lipídios produzidos por *M. subtilissimus* UCP 1262 foi realizada de acordo com as modificações do método de Sheehan and Storey [64]. As amostras de células foram fixadas em glutaraldeído (2%) e depois lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Eles foram então imersos no corante Sudan Black B por 10 min no escuro. Após esta etapa, as amostras foram lavadas em álcool a 70% para remover o excesso de corante e depois lavadas com PBS, contrastadas com fucsina (0,05%) durante 30 s e em seguida lavadas com PBS. As lâminas foram vistas sob um microscópio óptico usando uma lente de 100X. As gotículas de óleo presentes nas células de levedura foram coradas em preto ou azul escuro.

2,6 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS E QUITOSANA

A biomassa liofilizada foi submetida ao processo de extração de lipídeos de acordo com o método de Manocha et al. (1980). A biomassa obtida após a extração lipídica foi lavada com água destilada e utilizada para extração de quitosana. A percentagem de lipídeos totais foi determinada por método gravimétrico usando a Eq. 1

$$\text{Lipídeos totais (\%)} = \frac{\text{Lipídeos}}{\text{Biomassa}} \times 100$$

Eq.1

A quitosana foi extraída usando ácido acético de acordo com um método de Hu et al., (2004).

2.7 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

2.7.1 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A quitosana foi previamente seca de um dia para o outro a 60 ° C sob pressão reduzida e homogeneizada com 100 mg de brometo de potássio (KBr). Os discos preparados com brometo de potássio foram colocados para secar durante 24 h a 110 ° C sob pressão reduzida. A espectroscopia de raios

infravermelhos foi realizada utilizando em uma Fourier Transform (FTIR) BRUKER Mod. IFS. Discos com apenas o brometo de potássio foi utilizado como referência. A intensidade máxima das bandas de absorção foi medida pela linha de base.

2.7.2 Grau de desacetilação

As bandas das absorvâncias 1320 cm⁻¹ e 1420 cm⁻¹ foram utilizadas para medir o grau de acetilação de acordo com Brugnerotto et al. (2001), para posteriormente obter o grau de desacetilação da quitosana, como mostrado na equação:

$$DA \% = A_{1320}/A_{1420} = 0,3822 + 0,03133$$

2.7.3 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE

A viscosidade de 1% da quitosana em 1% da solução de ácido acético foi determinada usando o viscosímetro automático (Brookfield – Middleboro, MA, USA; TC 500).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.7 Isolamento e identificação morfológica de *Mucor*

Inicialmente as colônias brancas e delicadas, de aspecto sedoso com tonalidades aczentadas (devido aos esporângios) (Fig. 1 A), fototropismo positivo. Esporóforos simples, não ramificados ou esparsamente ramificados. Esporângios globosos a subglobosos (35- 55 µm diam) de coloração castanha, sem apófise (Figura 1, B). Columela globosa a subglosa (Fig 1.C), atingindo até 40 µm diâmetro. Esporangiosporos elipsoidais com grânulos nas extremidades, atingindo 5-10 (15) × 2-4 µm de diâmetro (Fig.1D).

A colônia da espécie *M. subtilissimus* geralmente prostar-se imediatamente com abertura da Placa de Petri (Alves et al., 2000), característica não observada em nossa cepa. No estudo de Alves et al., (2000) os esporangiosporos alcançavam até 10 µm de diâmetro. No entanto, no

estudo de Souza et al., (2016) os esporangióporos alcançaram até 15 µm de diâmetro, correlacionando com nosso estudo. Estes fungos apresentam variações na forma e nas dimensões das microestruturas, não sendo assim, significativo. No entanto, é imprevisível a análise molecular.

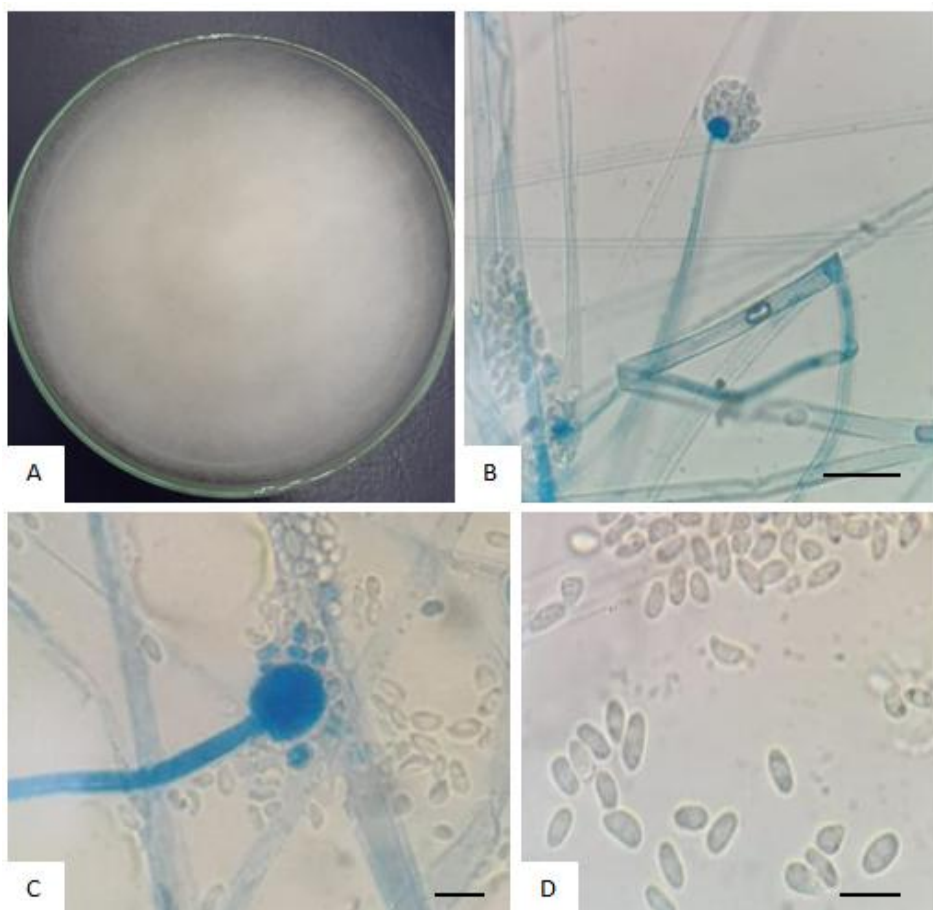


Figura 1. *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (A) Superfície da colônia (25°C);(B) Esporângio globoso multiesporado; (C) Columela subglosa (D) esporangiósoros. Barras: B = 30 µm; C e D = 10 µm

3.8 PRODUÇÃO DE BIOMASSA, LIPÍDEOS E QUITOSANA

O rendimento simultâneo obtido a partir da biomassa fúngica após a extração foi de 44,27% de lipídeos e 44,87mg/g de quitosana (Tabela 2).

Tabela 2. Planejamento fatorial 2² aplicado à produção de biomassa, lipídeos e quitosana por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 utilizando glicerol bruto e milhocina como substratos alternativos.bruto

Ensaio	Milhocina (%)	Glicerol (%)	Biomassa g/L	Lipídeos (%)	Lipídeos g/L	Quitosana mg/g	Quitosana mg/L
1	2	2	7,307	33,57	2,45	12,78	94,84
2	8	2	12,24	24,65	3,02	38,62	472,70
3	2	8	9,78	36,78	3,39	18,08	176,82
4	8	8	13,57	36,14	4,90	30,14	408,99
5	5	5	13,98	44,27	6,18	44,38	620,43
6	5	5	13,63	43,03	5,86	43,76	596,44
7	5	5	12,41	42,49	5,27	42,98	533,38
8	5	5	13,01	44,23	5,75	44,89	584,02

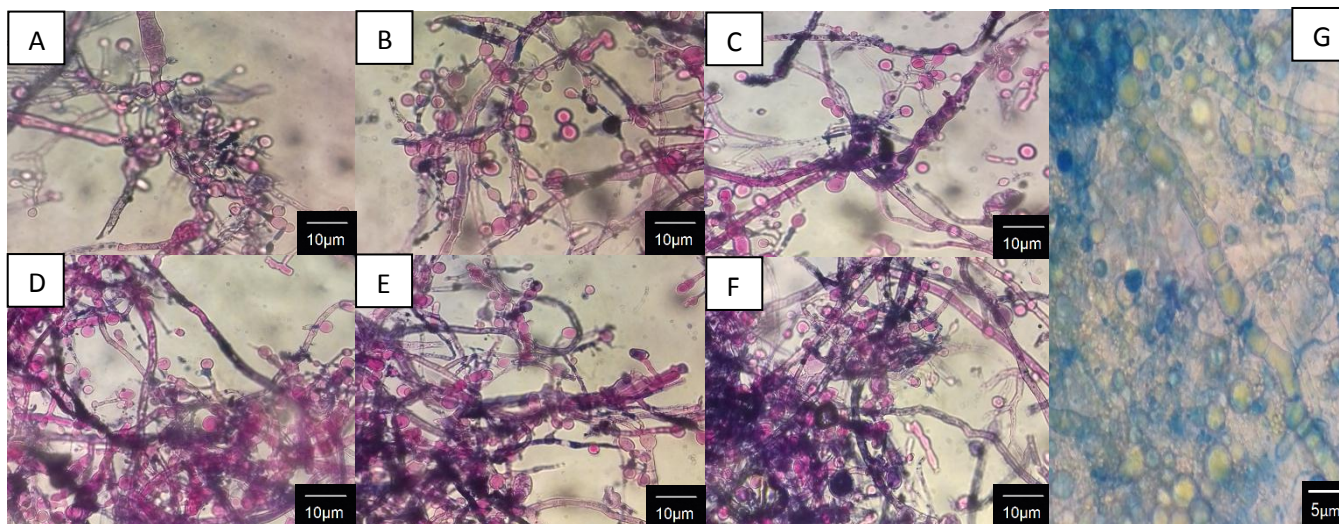
Várias espécies do gênero *Mucor* tem sido relatadas como oleaginosas por vários estudos (VICENTE et al., 2010; KOSA et al., 2018; ZININGA et al., 2019), assim a possibilidade de produzir simultaneamente quitosana e lipídios foi explorada.

Estudos sobre a produção de lipídeos por *M. subtilissimus* são escassos, Roux et al., (1994) analisaram 28 espécies do gênero cultivadas em glicose quanto a produção de lipídeos e ácidos graxos poli-insaturados. O *M. subtilissimus*, assim como o *M. plumbeus*, *M. sinensis*, *M. mousenensis* e o *M. amphibiorum*, não alcançou 6% de lipídeos totais. No estudo de Da Costa Silva et al., (2017) a espécie *M. subtilissimus*, assim como a espécie *Rhizopus microsporus*, não apresentaram resultados satisfatórios para produção de biomassa e lipídeos em melão de cana (10%) e milhocina (5%).

Para comprovar o acúmulo de lipídeos pelo fungo cultivado no ponto central do planejamento fatorial (5% de milhocina e 5% de glicerol residual), os corpos lipídicos nas hifas foram analisados pelo método Sudan Black, no período de 0 a 120 h. O método citoquímico com Sudan Black, um corante solúvel em gordura (Sonowal et al., 2019), foi utilizado em vários estudos que analisaram cineticamente o acúmulo de corpos lipídicos (Kamisaka e Nakahara 1994; Souza et al., 2016) e para seleção de microrganismos oleaginosos (Cheirsilp e Kittha, 2015, Jiru et al., 2016; Fu et al., 2016). Em nosso estudo,

as gotas de óleo aumentaram quantitativamente com o passar do tempo de cultivo (FIGURA 2). Células jovens de *M. subtilissimus* UCP 1262 (Figura 2A) foram utilizadas como controles para identificar o acúmulo de lipídeos. Os resultados obtidos nas primeiras 24 horas de cultivo (Figura 2B) mostrou que não houve acúmulo significativo de lipídeos. Após 48 h (Figura 2C) e 72 h (Figura 2D), foram observados um acúmulo significativo de corpos lipídicos na maioria das hifas de *M. subtilissimus* UCP 1262. Contudo, o acúmulo máximo de lipídeos ocorreu às 96 h (Figura 2E) e 120h (Figura 2F). Além disso, foi observado maiores acúmulos de lipídeos em hifas do que em formas leveduriformes do fungo. Em nosso estudo foram observados corpos lipídicos que variaram de 1-2 μ m nas primeiras 24h e com a maturação alcançaram até 6 μ m, sem mencionar corpos lipídicos agrupados, em que suas limitações são apenas visíveis sem adição do corante (Figura 1G).

Figura 2. Coloração citoquímica de hifas de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 pelo método do Sudan Black. Condição do ponto central do planejamento fatorial 2²: (A) 0 e (B) 24 h com baixo acúmulo de lipídeos; (C) 48 h e (D) 72 h de acúmulo relevante de lipídeos; e (E) 96h e (F)120h com maiores acúmulos de lipídeos. (G) presença de corpos lipídicos sem adição de corante Sudan Black.



Kamisaka e Nakahara (1994), ao utilizar o corante Sudan Black em *Mortierella ramanniana*, também observaram que o número de corpos lipídicos aumentou quantitativamente com o tempo de cultura, correlacionando com o aumento de produção de lipídeos com o passar do tempo de cultura. No

estudo de Kamisaka et al., (1999) os corpos lipídicos não ultrapassaram 3 com a maturação após 48h, sugerindo que o aumento do teor de lipídeos está relacionado a quantidades de corpos lipídicos e que alguns mecanismos impedem a coalescência entre eles e controlam seus tamanhos.

Um planejamento fatorial é fundamental para avaliar fatores independentes, nesse caso, concentrações de glicerol bruto e milhocina sobre a produção de quitosana e lipídios para demonstrar um bioprocessos acessível. Portanto os efeitos das concentrações dos resíduos agroindustriais sobre a produção das biomoléculas foram investigados. Um planejamento fatorial 2^2 foi implementado com cada variável assumindo um alto nível e baixo nível. Oito ensaios foram considerados. Nos pontos centrais (Ensaio 4-8), especificamente o ensaio 5 foi alcançado o maior acúmulo de lipídeos (44,87 %) e o ensaio 8 para a produção de quitosana (4,48%) (Tabela 2).

A Figura 3 apresenta a influência da variável independente - milhocina (1), e a variável independente - glicerol bruto (2) e a interação entre essas variáveis (1x2) sobre a produção de biomassa por *Mucor subtilissimus* UCP 1262, utilizando-se o planejamento fatorial, com significância estatística ($p < 0,05$). O gráfico de Pareto mostra que altos níveis das variáveis independentes influenciam significadamente sobre o crescimento do fungo.

A Figura 4, apresenta a influência das variáveis independentes (milhocina-1 e glicerol bruto-2) e a interação entre elas(1x2) sobre o acúmulo de lipídeos por *Mucor subtilissimus* UCP 1262, mostrando que níveis maiores de glicerol (2) influenciaram significadamente, em quanto níveis menores de milhocina (1) parecem favorecer o acúmulo de lipídeos por *M.subtilissimus* UCP 1262. A interação entre as variáveis independentes mostraram influencia significativa sobre a variável dependente. Devido a influencia significativa das interações dos resíduos agroindustriais sobre o acúmulo de lipídeos foi plotado o quadrado (Figura 5), constando a interação antagônica das duas variáveis independentes (milhocina-1 e glicerol residual-2) uma vez que, é possível verificar que os melhores rendimentos em relação ao acúmulo da biomolécula foi com o nível mínimo de milhocina e nível máximo de glicerol, em que os

valores axiais representam os valores médios das quatro replicações (ponto central).

Figura 3. Pareto referente à produção de biomassa de *M. subtilissimus* UCP 1262 utilizando milhocina (1) e glicerol bruto (2) como substratos.

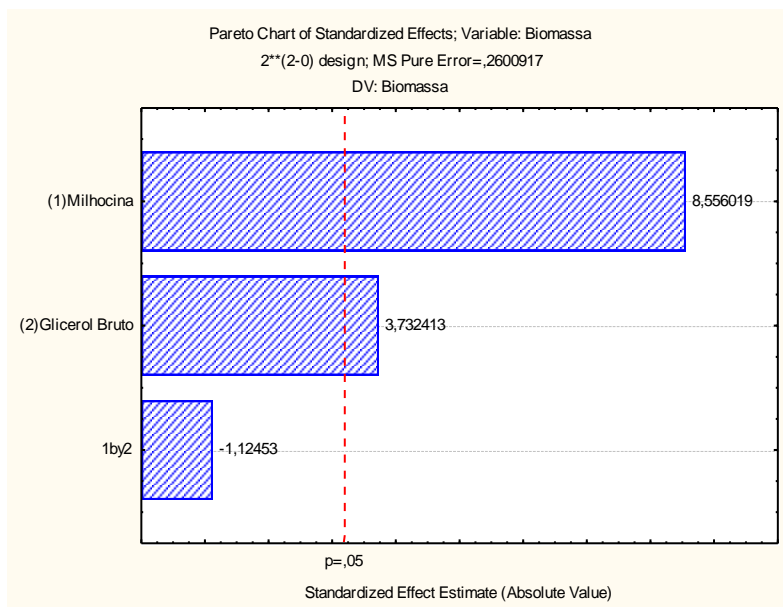


Figura 4. Gráfico Pareto referente ao acumulo de lipídeos de *M. subtilissimus* UCP 1262, utilizando milhocina (1) e glicerol bruto (2) como substratos.

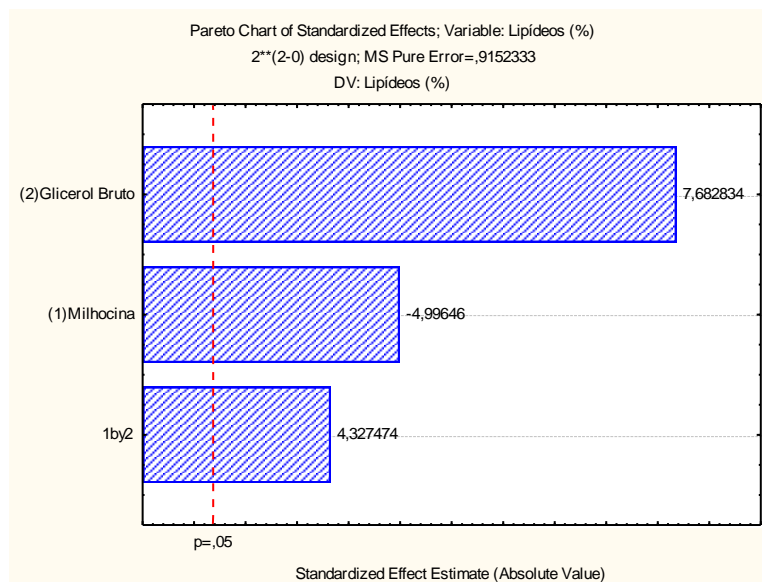
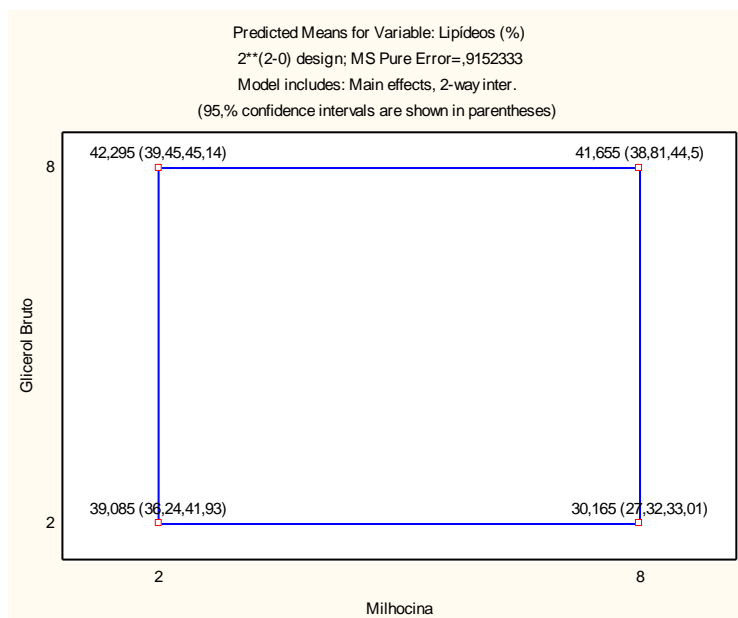


Figura 5. Quadrado referente aos efeitos médios da interação das duas vias de interação (milhocina e glicerol bruto) no acúmulo de lipídeos.



Os dados estatísticos mostram que concentrações menores de milhocina, fonte de nitrogênio, são significativas para otimização do acúmulo de lipídeos pelo fungo mucoraleano. Estudos anteriores comprovam a importância da suplementação de fonte de nitrogênio para a produção de biomassa e lipídeos utilizando glicerol (BOTHÁ et al., 1997; CARVALHO et al., 2018). No estudo de Botha et al., (1997) o *M. circinelloides* CBS108 não assimilou o glicerol na ausência de vitaminas e sem qualquer outra suplementação. Carvalho et al., (2018) cultivou o *M. circinelloides* URM 4182 em várias fontes de carbono com suplementação de fonte de nitrogênio e vitaminas. No entanto obteve baixo rendimento lipídico (14%) e baixo crescimento (2,0 g/L) com o poliácido. Segundo Klein et al. (2017) a assimilação de glicerol em condições aeróbicas só é bem sucedida com a síntese das enzimas, glicerol quinase (EC 2.7.1.30) dependente de ATP e das glicerol desidrogenase dependente NAD⁺ (EC 1.1.1.6) e a glicerol desidrogenase dependente NADP⁺ (EC 1.1.1.72), enzimas expressas por vários microrganismos, incluindo os fungos, e além de requerem de fontes de nitrogênio e vitaminas, necessitam de fosforo, magnésio e manganês para expressão dessas proteínas. A milhocina é rica em

vitaminas e aminoácidos (principalmente em alanina) e composta por vários minerais, incluindo o magnésio, o manganês e o fósforo (LIGGET e KOFFLER, 1948), fatores necessários que contribuíram para que o fungo assimilasse o resíduo do biodiesel. Vale destacar que o glicerol bruto apresenta em sua composição apenas o cálcio, potássio, magnésio, sódio e enxofre (NICOL, MARCHAND e LUBITZ, 2012) e não apresenta vitaminas e aminoácidos.

O gráfico de Pareto referente à produção de quitosana (Figura 6) demonstra a influencia significativa da milhocina sobre a produção de quitosana, assim como a influencia significativa da interação da milhocina com o glicerol. O quadrado (Figura 7) mostra a interação antagônica desses resíduos sobre a produção de quitosana.

Os problemas ambientais gerados por resíduos agroindustriais são questões difíceis para as indústrias agrícolas. No entanto, estes resíduos podem ser utilizados como substratos de baixo custo para a produção de materiais de valor agregado. Portanto, o uso dessas fontes alternativas de nutrientes para o cultivo de fungos abre varias oportunidades para aplicações industriais, reduzindo as preocupações ambientais, assim como a melhora econômica nessas industriais.

Figura 6. Pareto referente a produção de quitosana por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em milhocina e glicerol bruto.

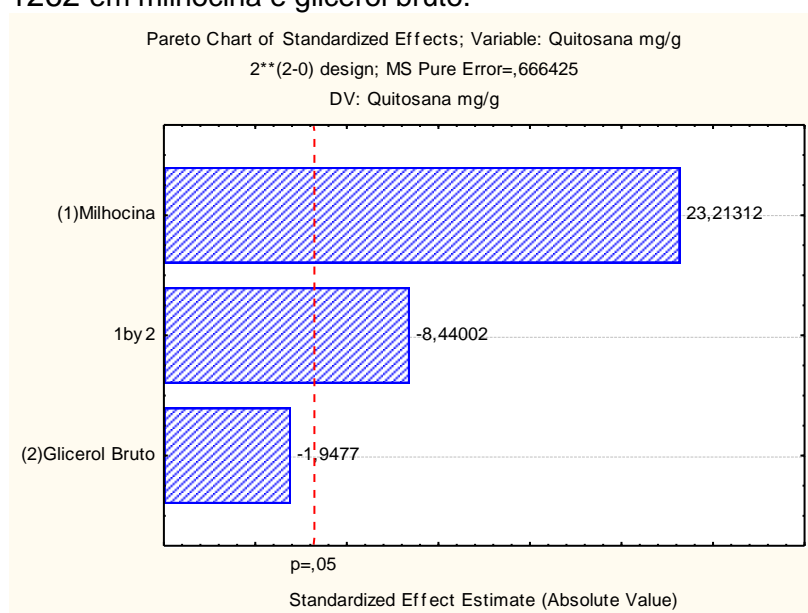
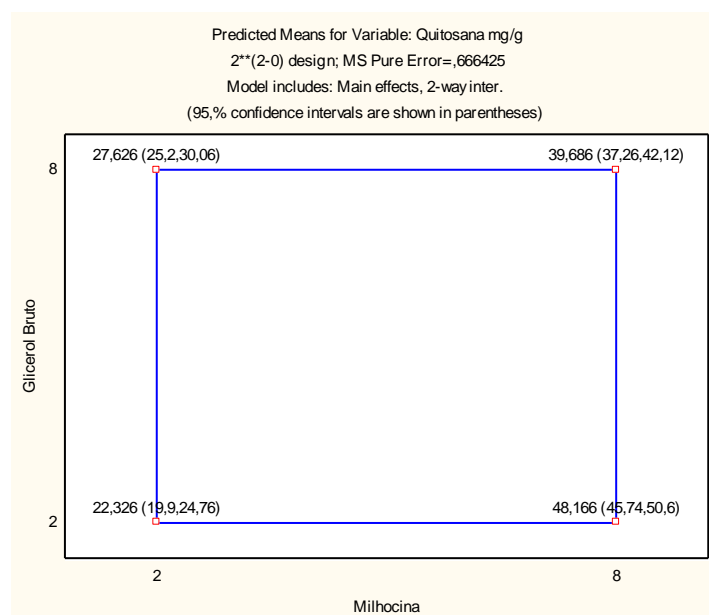


Figura 7. Quadrado plotado referente aos efeitos médios da interação das duas vias de interação na produção de quitosana.



Em nosso estudo, a milhocina foi um substrato promissor na produção de biomassa e quitosana por *M. subtilissimus* UCP 1262, principalmente devido ao seu alto teor de nitrogênio (7,06%) e carbono (34,84%), conforme determinado pela análise elementar. A milhocina é a única fonte de nitrogênio, isso explica o porque de maiores concentrações do glicerol bruto no meio de cultivo, que não apresenta nitrogênio em sua composição (65,18% de carbono, 0% de nitrogênio) não resultou no aumento de produção de quitosana. A milhocina é reconhecida como excelente fonte de azoto para o crescimento de fungos mucoraleanos e produção de quitosana (CARDOSO et al., 2012; BERGUER et al., 2014).

No entanto, como mostrado nos resultados o glicerol residual como fonte alternativa de carbono apresentou influencia positiva sobre a produção de lipídeos, e a literatura comprova resultados promissores com o uso desse resíduo agroindustrial como fonte de carbono para produção de lipídeos por fungos filamentosos e unicelulares (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de lipídeos por fungos filamentosos e leveduras cultivadas em glicerol bruto como fonte de carbono

Fungos	Lipídeos g/L	Lipídeos (%)	Referências
<i>Cunninghamella echinulata</i>	7,8	25,6	Fakas et al. (2009)
<i>Umbelopsis isabellina</i>	6,2	53,2	Fakas et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	5,4	57,4	André et al. (2010)
<i>U. isabellina</i>	5,4	66,7	Papanikolaou et al. (2017)
<i>Mucor sp.</i>	2,93	43,1	Papanikolaou et al. (2017)
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	16,2	54,3	Tchakouteu et al. (2015)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	22,0	49,0	Cue et al., (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	3,2	30,7	Papanikolaou et al. (2013)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	44,8	62,1	Yen et al. (2015)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	18,2	37,0	Tchakouteu et al. (2015)

Os métodos extrativos para a obtenção de ambas as biomoléculas comprovaram ser eficientes. A forma harmônica de obtenção de lipídeos e quitosana estaria de acordo com as considerações sobre a utilização de lipídeos fúngicos como uma alternativa ao uso de óleos vegetais (ZININGA et al., 2019), que necessitariam de grandes áreas de extensão de terras aráveis para serem produzidas (VICENTE et al., 2010).

As vias bioquímicas para a produção de lipídios e quitosana são dependentes de fonte de carbono e, assim a acumulação de ambos pode não ser diretamente proporcional, além de não compartilharem diretamente de enzimas e intermediários (ZININGA et al., 2019). A biossíntese de quitosana está intimamente ligada à quitina, uma vez que a quitosana é produzida através da desacetilação enzimática. A síntese de quitina inicia com a frutose-6-fosfato, gerada da glicólise (ZAMANI et al., 2010), enquanto o acúmulo de lipídeos só começa mais tarde devido à acetil coenzima A que inicia o ciclo do ácido cítrico (Síntese *de novo*) ou com a captação de ácidos graxos, óleos e triacilglicerídeos (TAG) do substrato hidrofóbico em que o microrganismo é cultivado e o acúmulo dos lipídeos intracelular sofre modificações ou não (síntese *ex novo*) (BEOPOULOS e NICAUD, 2011; BEOPOULOS et al., 2012).

Nesse estudo, a síntese *ex novo* se aplica para produção de lipídeos, uma vez que o glicerol bruto apresenta em sua composição óleos vegetais que não foram transesterificados (40% gorduras saturadas e ácidos graxos livres e 60% glicerol propriamente dito). Segundo Dou et al. (2009) o glicerol bruto apresenta em sua composição lipídeos que não reagiram durante o processo de transesterificação do biodiesel.

3.9 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

A quitosana extraída da biomassa fúngica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 cultivada em glicerol bruto (5%) e milho (5%) foi caracterizada em espectroscopia de infravermelho com o objetivo de estimar o grau de desacetilação (GD%) da quitosana fúngica, um parâmetro fundamental que influencia nas propriedades biológicas e físico-químicas da quitosana para aplicações. As bandas amida I e amina da quitosana extraída de *M. subtilissimus* UCP 1262 foram encontradas em 1642-1549 cm^{-1} . (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização da quitosana produzida por *M. subtilissimus* UCP 1262

Biopolímeros	Grau de desacetilação (GD%)	Viscosidade (cP)
Quitosana fúngica	80,25	2,24

A análise espectroscópica do FTIR da quitosana é mostrada na figura 6. Diferentes bandas de vibração de estiramento foram observadas na faixa 3665-2997 cm^{-1} relacionada a ν (N-H) em ν (NH_2) associados a amins primárias (DILYANAZ, 2010). A presença do grupo metila no grupo NHCOCH_3 , metileno no grupo CH_2OH e no grupo metino no anel piranose foi comprovada pelas correspondentes vibrações de estiramento desses grupos na faixa 2969-2846 cm^{-1} . A faixa a 1549 cm^{-1} tem uma intensidade maior que a 1642 cm^{-1} , o que sugere desacetilação efetiva. A prevalência de grupos NH_2 é indicada quando a banda 1642 cm^{-1} diminui, enquanto a 1549 cresce (DILYANAZ, 2010). O teor relativamente alto de glicosamina mostra que o biopolímero contém principalmente amino-açúcares.

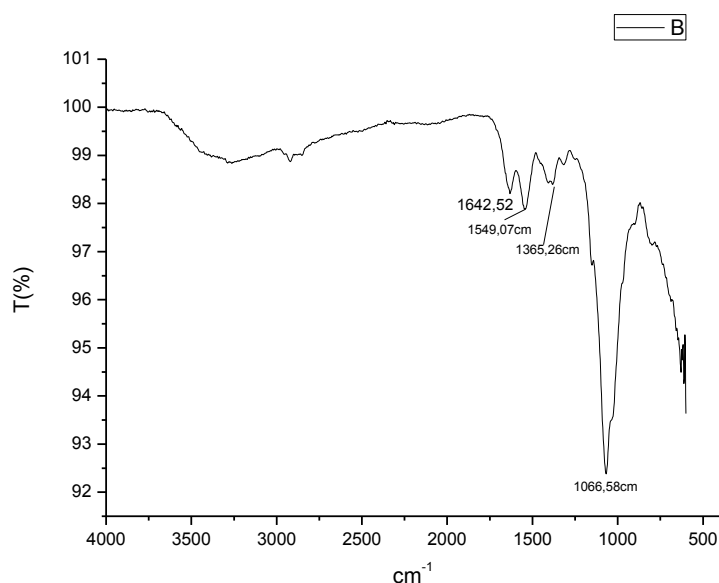


Figura 8. Espectro de infravermelho de quitosana produzido por *M. subtilissimus* em milho e glicerol bruto

A baixa viscosidade da quitosana produzida por *M. subtilissimus* corresponde a estudos com a literatura (Tabela 5)

Tabela 5. Viscosidade da quitosana produzida por diferentes fungos

Fungo	Viscosidade (cP)	Referências
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	2.2	Presente estudo
<i>Rhizopus arrhizus</i>	7.2	Omogbai e Ikenebomeh, 2013
<i>Mucor rouxii</i> *	3.1	TAYEL et al., 2010
<i>Absidia glauca</i>	4.0	Rungsardthong et al., 2006

*Nome atual: *Rhizopus arrhizus*

CONCLUSÕES

Este estudo demonstra o potencial do *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em converter resíduos agroindustriais em biomassa oleaginosa e com bom rendimento de quitosana.

A milhocina é uma excelente fonte de nitrogênio que favorece o crescimento do microrganismo e a produção de quitosana.

O glicerol bruto foi um fator significativo no acúmulo de lipídeos por *M. subtilissimus*.

A quitosana produzida por *M. subtilissimus* em resíduos agroindustriais apresentou alto grau de desacetilação e baixa viscosidade, propriedades promissoras para diversas aplicações.

4 REFERÊNCIAS

ADARME-VEGA, T. Catalina; THOMAS-HALL, Skye R.; SCHENK, Peer M. Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. **Current opinion in biotechnology**, v. 26, p. 14-18, 2014.

AHMAD, Mudasir et al. Chitosan-based nanocomposites for cardiac, liver, and wound healing applications. In: **Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics**. Woodhead Publishing, 2019. p. 253-262.

ALVES, MARIA H.; TRUFEM, SANDRA FB; MILANEZ, ADAUTO I. Táxons de Mucor Fresen.(Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil. **Rev Bras Bot**, v. 25, n. 2, p. 147-160, 2002.

ANDRADE SILVA, Nadielly et al. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from caatinga soil in the northeast of Brazil. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 9, p. 15377-15395, 2014.

ANDRADE, Rosileide FS et al. Promising Biosurfactant Produced by *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 Using Renewable Resources and Its Application in Cotton Fabric Cleaning Process. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2018, 2018.

BEOPOULOS, Athanasios et al. Identification and characterization of DGA2, an acyltransferase of the DGAT1 acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase family in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. New insights into the storage lipid metabolism of oleaginous yeasts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1523-1537, 2012.

BEOPOULOS, Athanasios; NICAUD, Jean-Marc. Yeast: A new oil producer?. **Oléagineux, Corps gras, Lipides**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2012.

BERGER, Lúcia et al. Green conversion of agroindustrial wastes into chitin and chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans*

strains. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 9082-9102, 2014.

BERGER, Lúcia Raquel Ramos et al. Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 635-641, 2018.

BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001.

BUI, Vu; PARK, Duckshin; LEE, Young-Chul. Chitosan combined with ZnO, TiO₂ and Ag nanoparticles for antimicrobial wound healing applications: a mini review of the research trends. **Polymers**, v. 9, n. 1, p. 21, 2017.

CARVALHO, Ana Karine F. et al. Direct transesterification of *Mucor circinelloides* biomass for biodiesel production: Effect of carbon sources on the accumulation of fungal lipids and biofuel properties. **Fuel**, v. 234, p. 789-796, 2018.

CHATTAWAY, F. W.; THOMPSON, C. C.; BARLOW, A. J. E. The action of inhibitors on dermatophytes. **Biochemical Journal**, v. 63, n. 4, p. 648, 1956.

CHEIRSILP, Benjamas; KITCHA, Suleeporn. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 73-80, 2015.

CHURCHWARD, Colin P.; ALANY, Raid G.; SNYDER, Lori AS. Alternative antimicrobials: the properties of fatty acids and monoglycerides. **Critical reviews in microbiology**, v. 44, n. 5, p. 561-570, 2018.

DOU, Binlin et al. Thermogravimetric kinetics of crude glycerol. **Bioresource technology**, v. 100, n. 9, p. 2613-2620, 2009.

FU, Jie et al. Enhancement of docosahexaenoic acid production by low-energy ion implantation coupled with screening method based on Sudan black B staining in *Schizochytrium* sp. **Bioresource technology**, v. 221, p. 405-411, 2016.

GHORMADE, V.; PATHAN, E. K.; DESHPANDE, M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production?. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

HUANG, Chao et al. 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

JACKMAN, Joshua et al. Nanotechnology formulations for antibacterial free fatty acids and monoglycerides. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 305, 2016.

JIRU, Tamene Milkessa et al. Oleaginous yeasts from Ethiopia. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 78, 2016.

KABARA, Jon J. et al. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 23-28, 1972.

KAMISAKA, Yasushi et al. Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1438, n. 2, p. 185-198, 1999.

KAMISAKA, Yasushi; NAKAHARA, Toro. Characterization of the diacylglycerol acyltransferase activity in the lipid body fraction from an oleaginous fungus. **The Journal of Biochemistry**, v. 116, n. 6, p. 1295-1301, 1994.

KLEIN, Mathias et al. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 3, p. 878-893, 2017.

KOSA, Gergely et al. High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low-and high-value lipids. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 66, 2018.

LAMAR, R.V. Chemo-immunological studies on localized infections: second paper: lysis of the pneumococcus and hemolysis by certain fatty acids and their alkali soaps. **Journa Experimental Medicine**. V.13, P.380–386, 1911.

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

NASCIMENTO, Thiago Pajeú et al. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p. 16-24, 2016.

NICOL, R. W.; MARCHAND, K.; LUBITZ, W. D. Bioconversion of crude glycerol by fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1865-1875, 2012.

OMOGBAI, Barry Aigbodion; IKENEBOMEH, Marcel. Solid-state fermentative production and bioactivity of fungal chitosan. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 2, p. 172, 2013.

PAPANIKOLAOU, Seraphim et al. Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 3, p. 262-281, 2017.

PELE, Milagre A. et al. Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2018.

RUNGSARDTHONG, Vilai et al. Application of fungal chitosan for clarification of apple juice. **Process biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 589-593, 2006.

SANTIAGO, André Luiz Cabral Monteiro de et al. Isolation of Mucorales from processed maize (*Zea mays* L.) and screening for protease activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 698-700, 2008.

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

SCHIPPER, MAA. 1978. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. **Studies in Mycology** 17: 1-53.

SILVA, T. C. et al. Chitin, chitosan and biosurfactant production by *Cunninghamella phaeospora* using agroindustrial wastes. **Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms**, p. 326, 2016.

SONOWAL, Shashanka; CHIKKAPUTTAIAH, Channakeshavaiah; VELMURUGAN, Natarajan. Role of flow cytometry for the improvement of bioprocessing of oleaginous microorganisms. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1712-1726, 2019.

SOUZA, Carlos AF et al. *Mucor indicus* isolated from the semiarid region of Brazil: a first record for South America. **Mycotaxon**, v. 131, n. 4, p. 897-906, 2016.

TAYEL, Ahmed A. et al. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. **International journal of biological macromolecules**, v. 47, n. 1, p. 10-14, 2010.

THORMAR, Halldor. Antibacterial effects of lipids: historical review (1881 to 1960). **Lipids and Essential Oils**, p. 25, 2011.

TRUFEM, S. F. B. Mucorales do Estado de São Paulo. 1. Gênero *Mucor* Micheli. **Rickia**, 1981.

VICENTE, Gemma et al. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 5, p. 3173-3178, 2010.

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

CONCLUSÕES

- A aplicação de um planejamento fatorial como ferramenta estatística foi fundamental para seleção das concentrações favoráveis a produção de lipídeos e quitosana por *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 e *Mucor subtilissimus* UCP 1262.
- Os resíduos agroindustriais (manipueira, glicerol bruto e milhocina) podem ser utilizados como fontes alternativas de carbono e nitrogênio em meios de cultura para o cultivo de *M. subtilissimus* UCP 1262 e *L. hyalospora* UCP 1266, reduzindo os custos de produção de lipídeos e quitosana;
- Os fungos *Mucor subtilissimus* UCP 1262 e *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 apresentaram produção de biomassa e quitosana satisfatórios, com rendimentos semelhantes ou superiores aos relatados na literatura;
- A *L. hyalospora* UCP 1266 apresenta potencial biotecnológico na produção de ácidos graxos poli-insaturados, em especial o ômega-3 em glicerol bruto e milhocina;
- As maiores produções de biomassa apresentada por *L. hyalospora* UCP 1266 e *M. subtilissimus* UCP 1262 foram obtidas em meios de cultura com glicerol e milhocina;
- As quitosanas produzidas a partir de biomassa micelial por *L. hyalospora* UCP 1266 e *M. subtilissimus* UCP 1262 apresentam baixa viscosidade e grau de desacetilação de aproximadamente 80%;
- A obtenção simultânea de lipídeos e quitosana por *M. subtilissimus* UCP 1262, tornou o bioprocesso econômico e sustentável, por três finalidades: valorização dos resíduos agroindustriais (milhocina e glicerol bruto), produção de lipídeos e a produção de quitosana renováveis como suplementos alimentares.

ANEXOS

Confirmation of your submission to Microbial Cell Factories - MICF-D-19-00340

De: Microbial Cell Factories Editorial Office (em@editorialmanager.com)

Para: galba_takaki@yahoo.com.br

Data: quinta-feira, 17 de outubro de 2019 00:18 BRT

MICF-D-19-00340

Eco-friendly nutraceutical fatty acids production by oleaginous fungus *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 using renewable substrates

Adriana Ferreira Souza, Ph.D student; Hugo Marques Galindo, Ph.D student; Manuela Cristina Mota Lins, Ph.D; Rosileide F. Silva Andrade, Ph.D in Microbiology; Norma Buarque Gusmão, Ph.D in Pharmacy; Galba Maria Campos-Takaki, PhD
Microbial Cell Factories

Dear Prof Campos-Takaki,

Thank you for submitting your manuscript 'Eco-friendly nutraceutical fatty acids production by oleaginous fungus *Lichtheimia hyalospora* UCP 1266 using renewable substrates' to Microbial Cell Factories.

The submission id is: MICF-D-19-00340

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's website.

Your username is: galba_takaki

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/micf/>.

Best wishes,

Editorial Office
Microbial Cell Factories
<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/>

17/10/2019

Yahoo Mail - [IJMS] Manuscript ID: ijms-632140 - Submission Received

[IJMS] Manuscript ID: ijms-632140 - Submission Received

De: Editorial Office (ijms@mdpi.com)

Para: galba_takaki@yahoo.com.br

Cc: adrife.souza@gmail.com; hugo.galindo21@gmail.com; mablima33@yahoo.com.br; drubioribeaux@gmail.com; dayanamontero87@gmail.com; rosileide_fontenele@yahoo.com.br; normagusmao@gmail.com; galba_takaki@yahoo.com.br

Data: quinta-feira, 17 de outubro de 2019 16:20 BRT

Dear Professor Campos Takaki,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: International Journal of Molecular Sciences

Manuscript ID: ijms-632140

Type of manuscript: Article

Title: Green Synthesis for Optimized Chitosan Production by Mucorales Fungi Using Agroindustrial by-products

Authors: Adriana Ferreira de Souza, Hugo Marques Galindo, Marcos Antônio Barbosa de Lima, Daylin Rubio Ribeaux, Dayana Montero Rodriguez, Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Norma Buarque Gusmão, Galba Maria Campos-Takaki *

Received: 17 October 2019

E-mails: adrife.souza@gmail.com, hugo.galindo21@gmail.com, mablima33@yahoo.com.br, drubioribeaux@gmail.com, dayanamontero87@gmail.com, rosileide_fontenele@yahoo.com.br, normagusmao@gmail.com, galba_takaki@yahoo.com.br

Submitted to section: Bioactives and Nutraceuticals,
<https://www.mdpi.com/journal/ijms/sections/bioactives>

Yahoo Mail - [IJMS....pdf ^