
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**CULTIVO DE *Mucor circinelloides* EM SUBSTRATOS LÍQUIDO E SÓLIDO
PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS**

ALEX FERNANDO DE ALMEIDA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Microbiologia Aplicada.

**Rio Claro
Estado de São Paulo
Novembro - 2007**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

CULTIVO DE *Mucor circinelloides* EM SUBSTRATOS LÍQUIDO E SÓLIDO
PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

ALEX FERNANDO DE ALMEIDA

Orientadora: Profa. Dra. Sâmia Maria Tauk-Tornisielo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Microbiologia Aplicada

Rio Claro
Estado de São Paulo
Novembro - 2007

Aos meus pais

Antonio Simões de Almeida

Antonia Angelina Tarossi de Almeida

(pela dedicação em educar seus filhos com os melhores métodos
que poderiam usar: paciência, amor e ética)

Aos meus avós

Antonio Tarossi

Maria Aparecida Simoso Tarossi

Liberata Maria Antognholli Simões de Almeida

Aos meus irmãos

Mauro César de Almeida

E Nair Aparecida dos Santos Almeida

Fábio André de Almeida

E a minha sobrinha

Bruna Nayara de Almeida

À minha Família

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ó Deus agradeço profundamente pelos desafios impostos em minha vida. Agradeço pelo preparo realizado por Ti antes de ingressar no curso. Agradeço pelas dificuldades encontradas e pelas experiências vividas durante cada etapa do trabalho. Senhor, a Ti ofereço este trabalho para que possa, a partir dele, surgir novas idéias e novos desafios a serem vencidos a fim de proporcionar o bem a toda criatura por Ti criada, pelo fruto de Seu trabalho. Amém.

À Profa. Dra. Sâmia Maria Tauk-Tornisielo, como orientadora científica e espiritual, agradeço pelo apoio, paciência, compreensão, amizade e incentivo desde o primeiro instante da caminhada para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Olavo Raymundo Jr. (Uniararas), orientador e amigo, pela indicação e incentivo.

Ao Prof. Dr. Roberto Naves Domingos, diretor do Centro de Estudos Ambientais – CEA, Unesp, pelo total apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis pela amizade, apoio e conselhos durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pião pelas análises estatísticas realizadas no trabalho.

À Eleni Nadai Malaguti e Francisca de Assis Mattioli Gonçalves (técnicas de laboratório do CEA) pelo constante apoio no desenvolvimento do trabalho, que sem este o trabalho não teria o mesmo resultado.

Ao Dr. Amauri Menegário pelo apoio durante o trabalho com seus conhecimentos em química analítica.

À Sara pelo apoio burocrático durante todo o experimento e amizade.

À todos os funcionários do CEA: Jorbison, Reginaldo, Marcos, Silvia, Gleide, Jorge, Zezé, Lurdes e Fernanda, pelos momentos de descontração, atualizações dos assuntos alheios, apoio em informática, pelas viagens realizadas a outros departamentos, pelas guloseimas da cozinha e limpeza dos laboratórios.

À Escola Estadual Padre Orestes Ladeira, Conchal, SP, por ter-me auxiliado em um momento importante de minha vida abrindo suas portas quando mais precisei.

Ao químico Ari Castro da Faculdade de Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus de Pirassunga – SP.

À Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche Silva e a química Maria Ângela Allarico Adorno (Janja) do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos – SP.

Aos amigos do CEA: Maria Lúcia, Felipe, Ítalo, Alisson, Eduardo, Alexandre, Silvana, Márcia e Adilson.

Ao Christian Wellbaum (in memoriam) que auxiliou no início do trabalho e amizade.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada pelos momentos inesquecíveis que vivemos e partilha das dificuldades encontradas durante os trabalhos.

Aos inesquecíveis amigos da República do Genaro: César, Aguinaldo (Pantas), Fabrício (Tito) e Sidnei (Príncipe) pelos maravilhosos momentos de convivência e experiência adquirida nestes anos.

À Érika Carolina Vieira, que em tão pouco tempo presente em minha vida fez grandes mudanças com seu jeito calmo e sereno.

A todos que de alguma forma estarão lembrando desta etapa da minha vida,

Agradeço

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	6
Objetivos específicos.....	6
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1 Fungos Filamentosos	8
3.2 Zigomicetos	9
3.2.1. <i>Mucor circinelloides</i> descrito por Schipper (1976).....	11
3.3 Cultivo em Substrato Sólido (CSS).....	11
3.4 Lipídios.....	15
3.5 Ácidos graxos insaturados.....	16
3.6 Biossíntese de ácidos graxos insaturados	19
3.7 Aplicações de ácidos graxos insaturados.....	23
3.8 Mecanismos para produção de ácidos graxos insaturados	26
3.9 Concentração de ácidos graxos insaturados em fungos filamentosos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Microrganismos	33
4.2 Seleção da melhor linhagem através da produção de biomassa e de ácidos graxos insaturados	34
4.2.1 Padronização do inóculo.....	34
4.2.2 Cultivo de <i>Mucor circinelloides</i> pelo método turbidimétrico automatizado – Labsystems Bioscreem C, em diferentes meios de cultura e PH.....	35
4.2.3 Produção de biomassa e lipídios totais por cultivo submerso (CSm).....	36

4.2.4	Extração dos lipídios totais.....	37
4.2.5	Cultivo de <i>M. circinelloides</i> (linhagem M1) em cultivo em substrato sólido (CSS).....	37
4.2.6	Determinação do pH dos substratos sólidos.....	38
4.3	Extração de lipídios e análise dos ácidos graxos em CSS.....	38
4.3.1	Extração de Lipídios nos Substratos Cultivados.....	38
4.3.2	Preparação dos Ésteres Metílicos dos Ácidos Graxos.....	39
4.3.3	Análise da Composição de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa.....	39
4.3.4	Análise por padronização externa.....	40
4.4	Suplementação dos cultivos em substrato sólido, com fontes de carbono para a produção de ácidos graxos insaturados.....	41
4.5	Adição da casca de arroz ao substrato para produção de ácidos graxos insaturados.....	42
4.6	Efeito de diferentes temperaturas no cultivo de <i>M. circinelloides</i> (linhagem M1), para produção de ácidos graxos insaturados.....	42
4.7	Efeito de diferentes concentrações de esporos para produção de ácidos graxos insaturados.....	43
4.8	Influência da otimização das condições de cultivo de <i>M. circinelloides</i> sobre a produção de ácidos graxos insaturados.....	43
4.9	Análise estatística dos resultados.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1.	Cultivo de <i>Mucor circinelloides</i> pelo Método Turbidimétrico Automatizado – Labsystems Bioscreen C, em Diferentes Meios de Cultura e pH.....	44
5.2	Cultivo submerso de linhagens de <i>Mucor circinelloides</i> (CSm).....	50
5.3.	Cultivo e Produção de Lipídios em Substrato Sólido (CSS).....	56
5.4	Influência da Suplementação dos Cultivos em Substrato Sólido, com Fontes de Carbono para a Produção de Ácidos Graxos Insaturados.....	64
5.5	Influência da Adição da Casca de Arroz (CA) ao Substrato para Produção de Ácidos Graxos Insaturados.....	68
5.6	Influência da Temperatura no Cultivo de <i>M. Circinelloides</i> (Linhagem M1) para Produção de Ácidos Graxos Insaturados.....	71
5.7	Influência de Diferentes Concentrações de Esporos para Produção de Ácidos Graxos Insaturados.....	82
5.8	Influência da Otimização das Condições de Cultivo de <i>M. circinelloides</i> sobre a Produção de Ácidos Graxos Insaturados.....	86
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
7.	REFERÊNCIAS.....	94

Lista de Tabelas

Tabela 1. Obtenção de ácidos graxos insaturados utilizando cultivo em sistema sólido.	14
Tabela 2. Nomenclatura de ácidos graxos saturados e insaturados.....	16
Tabela 3. Composição de ácidos graxos saturados e insaturados nos óleos de diferentes espécies vegetais comercializadas no Brasil.....	18
Tabela 4. Composição de ácidos graxos obtidas de fungos filamentosos em cultivo submerso e sob condições controladas.	29
Tabela 5. Condições de cultivo selecionadas pelos cultivos realizados em sistema automatizado Bioscreen C para a realização do estudo em cultivo em submerso.	50
Tabela 6. Produção de biomassa e lipídios totais a partir da linhagem M1 de <i>M. circinelloides</i> , em diferentes fontes de carbono, variação de inóculo fragmentos de micélio após incubação a 25°C, 150 rpm, 72 horas e pH 5,8. Legenda: MV: Meio de saís de Vogel.....	51
Tabela 7. Produção de biomassa e lipídios totais a partir da linhagem M2 de <i>M. circinelloides</i> , em diferentes fontes de carbono, com variação de inóculo fragmentos de micélio após incubação a 25°C, 150 rpm 72 horas e pH 5,8. Legenda: MV: Meio de saís de Vogel.....	51
Tabela 8. Produção de biomassa e de lipídios a partir das linhagens M1 e M2 de <i>Mucor circinelloides</i> , em diferentes fontes de carbono, com inóculo 1.10^7 de suspensão de esporos após incubação a 25°C, 150 rpm, 72 horas e pH 5,8.....	52
Tabela 9. Quantidades de ácidos graxos produzidos a partir da linhagem M1 de <i>M. circinelloides</i> , em diferentes meios contendo fontes de carbono e inoculados com variação de inóculo fragmentos de micélio, a 25°C, 150 rpm, 72 horas e pH 5,8.	54
Tabela 10. Quantidades de ácidos graxos produzidos a partir da linhagem M2 de <i>M. circinelloides</i> , em diferentes fontes de carbono, com variação de inóculo fragmentos de micélio após incubação a 25°C, 150 rpm, 72 horas e pH 5,8.	54
Tabela 11. Quantidade de ácidos graxos produzidos a partir das linhagens M1 e M2 de <i>M. circinelloides</i> , em diferentes fontes de carbono, com inóculo contendo 1.10^7 após incubação a 25°C, 150 rpm, 72 horas e pH5,8.....	55
Tabela 12. Condições de cultivo selecionadas para produção de ácidos graxos insaturados em cultivo em substrato sólido.....	56
Tabela 13. Análise da variância para a produção de lipídios da linhagem M1 para o modelo fatorial considerando como fatores de variação três substratos e sete dias de	

cultivo. Legenda: GL = grau de liberdade; SQ = desvio padrão; QM = quadrado médio; F = frequência de distribuição; Pr = probabilidade.59

Tabela 14. Análise da variância para a produção de AGL da linhagem M1 para o modelo fatorial considerando como fatores de variação três substratos e sete dias de cultivo. Legenda: GL = grau de liberdade SQ = desvio padrão; QM = quadrado médio; F = frequência de distribuição; Pr = probabilidade.63

Tabela 15. Composição de ácidos graxos insaturados nos substratos utilizados para cultivo de *M. circinelloides*.64

Tabela 16. Lipídios totais, AO (18:1), AL (18:2) e AGL (γ -18:3) em cultivos de *M. circinelloides* em farinha de soja, 6 dias a 25° C, com suplementação de 2% de carboidratos ou de óleos vegetais, em erlenmeyers de 250mL, em triplicata.66

Tabela 17. Lipídios totais, AO (18:1), AL (18:2) e AGL (γ -18:3) em cultivos de *M. circinelloides* em farinha de soja, por seis dias a 25° C, em erlenmeyers de 250mL, em triplicata, com misturas dos complementos suplementares em diferentes composições e proporções.67

Tabela 18. Produção de lipídios totais, AO (18:1), AL (18:2) e AGL (γ -18:3) em cultivos de *M. circinelloides*, em farinha de soja, por seis dias a 25°C, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2 % (C:G 1:1 p/p).69

Tabela 19. Porcentagem relativa de lipídios totais e AGL nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, por seis dias a 25° C, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (C:G 1:1 p/p).70

Tabela 20. Lipídios totais extraídos de farinha de soja acrescido com casca de arroz (3:2 p/p), suplementado com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) durante o cultivo de *M. circinelloides*, em diferentes temperaturas, durante sete dias.72

Tabela 21. Porcentagem relativa de ácidos graxos nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, por seis dias em diferentes temperaturas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2 % (C:G 1:1 p/p).75

Tabela 22. Lipídios totais extraídos de farinha de soja acrescida com casca de arroz (3:2 p/p), suplementado com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) durante o cultivo de *M. circinelloides*, em temperatura de 20° C e 25° C por seis dias, seguido de 12° C por 24 horas.76

Tabela 23. Análise da variância para a produção de LT da linhagem M1 para o modelo fatorial considerando como fatores de variação sete temperaturas. Legenda: GL = grau de liberdade.77

Tabela 24. Porcentagem relativa de ácidos graxos nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, em temperatura de 20° C e 25° C por

seis dias, seguido de 12°C por 24 horas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (C:G 1:1 p/p)..... 79

Tabela 25. Análise da variância para a produção de AGL da linhagem M1 para o modelo fatorial considerando como fatores de variação sete temperaturas. Legenda: GL = grau de liberdade; SQ = desvio padrão; QM = quadrado médio; F = frequência de distribuição; Pr = probabilidade..... 80

TABELA 26. Resultados da aplicação do teste Tukey 5% nos cultivos da linhagem M1 para temperatura..... 80

Tabela 27. Lipídios totais extraídos de farinha de soja acrescida com casca de arroz (3:2 p/p), suplementado com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) durante o cultivo de *M. circinelloides*, em temperatura de 20° C por seis dias, seguido de 12° C por 24 horas, utilizando diferentes concentrações de esporos. 82

Tabela 28. Produção de ácidos graxos nos bioprodutos e porcentagem relativa nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, em temperatura de 20° C por seis dias, seguido de 12° C por 24 horas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (C:G 1:1 p/p), utilizando diferentes concentrações de esporos. 84

Tabela 29. Produção de ácidos graxos nos lipídios totais e porcentagem relativa de ácidos graxos nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, em temperatura de 20°C por seis dias, seguido de 12°C por 24 horas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2 % (C:G 1:1 p/p), utilizando diferentes concentrações de esporos..... 85

Tabela 30. Lipídios totais extraídos de farinha de soja acrescida com casca de arroz (3:2 p/p), suplementado com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) durante o cultivo de *M. circinelloides*, em temperatura de 20° C, seguido de 12° C por 24 horas. 86

Tabela 31. Produção de ácidos graxos nos lipídios dos bioprodutos e porcentagem relativa de ácidos graxos nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, em temperatura de 20° C, seguido de 12° C por 24 horas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (C:G 1:1 p/p)..... 88

Tabela 32. Produção de ácidos graxos nos lipídios dos bioprodutos e porcentagem relativa de ácidos graxos nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, em temperatura de 20° C por seis dias, seguido de 12° C por 24 horas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2 % (C:G 1:1 p/p) 89

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo reprodutivo de um representante da classe Zigomicetos, ordem Mucorales (<i>Rhizopus sp.</i>)	10
Figura 2. Crescimento representativo de um fungo filamentosos em substrato sólido (modificado de RAHARDJO et al., 2006)	12
Figura 3. Posicionamento de ligações duplas com configuração <i>cis</i> em ácido linoléico (A), família ômega-6 e ácido alfa-linolênico (B), família ômega-3.....	17
Figura 4. Uma seção do caminho anabólico para síntese de ácidos graxos insaturados modificado de Hornung (2005).	21
Figura 5. Configuração <i>cis</i> e <i>trans</i> de ácidos graxos insaturados. (A) configuração isômero <i>cis</i> , (B) configuração isômero <i>trans</i>	23
Figura 6. Perfil dos padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos a partir de cromatografia gasosa.	41
Figura 7. Curva de crescimento da linhagem M1 em meio de solução salina 0,85%, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,0, a 28°C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreem C.	45
Figura 8. Curva de crescimento da linhagem M1 em meio de Vogel, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,0, a 28°C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreem C.	45
Figura 9. Curva de crescimento da linhagem M1 em meio de solução salina 0,85%, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,8, a 28°C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreem C.	46
Figura 10. Curva de crescimento da linhagem M1 em meio de Vogel, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,8, a 28°C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreem C.	46
Figura 11. Curva de crescimento da linhagem M2 em meio de solução salina 0,85%, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,0, a 28°C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreem C.	47
Figura 12. Curva de crescimento da linhagem M2 em meio de Vogel, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,0, a 28°C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreem C.	47
Figura 13. Curva de crescimento da linhagem M2 em meio de solução salina 0,85%, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,8, a 28°C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreem C.	48
Figura 14. Curva de crescimento da linhagem M2 em meio de Vogel, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,8, a 28°C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreem C.....	48
Figura 15. Crescimento de <i>M. circinelloides</i> em farinha de soja com seis dias de cultivo, 25°C.	57

- Figura 16.** Lipídios totais extraídos dos substratos sólidos farelo de trigo, farinha de soja e farelo de mandioca no cultivo de *M. circinelloides* a 25°C, durante sete dias. 58
- Figura 17.** Curva de produção e eficiência na conversão de ácido oleico (AO), ácido linoléico (AL) e ácido gama-linolênico (AGL) por *M. circinelloides* crescidos em farelo de trigo, farinha de soja e farelo de mandioca por sete dias a 25° C..... 61
- Figura 18.** Perfil dos ácidos graxos em farinha de soja sem (A) e com crescimento (B) de *M. circinelloides* cultivado por seis dias, a 25°C, obtido por cromatografia gasosa. 65
- Figura 19.** (A) Crescimento de *M. circinelloides* em farinha de soja acrescida de casca de arroz (3:2), por seis dias, a 25° C. (B) Detalhe do crescimento de *M. circinelloides* com aumento de 10x 68
- Figura 20.** Efeito da temperatura sobre o perfil de ácidos graxos em farinha de soja acrescida de casca de arroz (3:2 p/p) e suplementada com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) cultivado por *M. circinelloides*, durante seis dias. 73
- Figura 21.** Efeito da temperatura sobre o perfil de ácidos graxos nos lipídios totais obtidos do cultivo de *M. circinelloides* em farinha de soja acrescida de casca de arroz (3:2 p/p) e suplementada com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) durante seis dias..... 74
- Figura 22.** Efeito do ciclo da temperatura sobre o perfil de ácidos graxos em farinha de soja acrescida de casca de arroz (3:2 p/p) e suplementada com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) cultivado por *M. circinelloides*, em temperatura de 20° C e 25° C por seis dias, seguido de 12° C por 24 horas..... 78
- Figura 23.** Efeito do ciclo da temperatura sobre o perfil de ácidos graxos nos lipídios totais obtidos do cultivo de *M. circinelloides* em farinha de soja acrescida de casca de arroz (3:2 p/p) e suplementada com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) durante seis dias. 78

Lista de Abreviaturas

LT	lipídios totais
AGI	ácidos graxos insaturados
AGS	ácidos graxos saturados
AGI <i>trans</i>	ácidos graxos insaturados <i>trans</i>
AGI <i>cis</i>	ácidos graxos insaturados <i>cis</i>
VLDL	very low density lipoproteins
LDL	low density lipoprotein
HDL	high density lipoprotein
AE	ácido esteárico
AGL	ácido gama-linolênico
AA	ácido araquidônico
AEP	ácido eicosapentaenóico
ADH	ácido docosahexaenóico
AO	ácido oléico
AL	ácido linoléico
AP16:0	ácido palmítico
AP16:1	ácido palmitoléico
ADGL	ácido dihomo gama linolênico
CSS	cultivo em sistema sólido
CSm	cultivo submerso
CEA	Centro de Estudo Ambientais
w-3	ômega-3
w-6	ômega-6
w-9	ômega-9
acetil-CoA	acetil coenzima A
ATP	adenosina trifosfato
NADPH	nicotinamina difosfato
ACP	proteína carregadora de acila
CO ₂	dióxido de carbono
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
°C	graus Celsius

KNO ₃	nitrato de potássio
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amônia
NaCl	cloreto de sódio
KCl	cloreto de potássio
DO	densidade óptica
M	molar
FFAP	free fatty acid polymerase
p/p	peso por peso
L	litros
mL	mililitros
mg	miligramas
g	gramas
Kg	kilogramas
rpm	rotações por minuto
C:N	carbono:nitrogênio
US\$	dólares
Glc	glicose
CG	canola:gergelim
CGlc	canola:glicose
GGlc	gergelim:glicose
CGGlc	canola:gergelim:glicose
CA	casca de arroz

RESUMO

Os ácidos graxos insaturados, presentes naturalmente em óleos vegetais e peixes de água fria, possuem potentes atividades biológicas como precursores antiinflamatórios e hormonais. A busca por novas fontes de organismos ricos em ácidos graxos insaturados da família ômega 6 tem-se intensificado. Os fungos filamentosos do solo da ordem Mucorales são conhecidos por possuírem naturalmente altas concentrações destes ácidos graxos. Neste estudo foram inicialmente utilizadas duas linhagens de *Mucor circinelloides* isoladas de solo de área de caatinga (M1) e cerrado (M2), com as quais foram realizados teste preliminares para selecionar a melhor linhagem produtora de ácido gama-linolênico (AGL). A partir dos resultados obtidos nos cultivos em sistema automatizado foram selecionadas as melhores fontes de carbono, glicose e maltose, para produção de biomassa e também o melhor pH 5,8 para o cultivo submerso. Nos cultivos submerso objetivando-se melhor produção de AGL, selecionou-se a linhagem M1 sob as condições de cultivo com pH 5,8, temperatura 25° C, rotação de 150 rpm e inóculo com de 1.10^7 esporos.mL⁻¹. Os cultivos em substrato sólido foram realizados com farinha de soja, farelo de trigo, polpa cítrica, bagaço de cana-de-açúcar e casca de mandioca, acrescidos com extrato de levedura 1% e mantidos a 25° C, por 168 horas. Foram observados decréscimos no teor de lipídios totais (LT) em todos os cultivos realizados. A farinha de soja foi o melhor substrato para produção de AGL. Este substrato suplementado com diferentes suplementos carbônicos demonstrou que a mistura de óleo de canola:óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) foi o maior indutor de AGL (6,2 g.Kg⁻¹ Bioproduto; 26,0 g.g⁻¹ LT). A adição de casca de arroz ao substrato melhorou a aeração do substrato e o aproveitamento deste pelo fungo, acentuando a formação de AGL (8,4 g.Kg⁻¹ Bioproduto; 36,3 g.g⁻¹ LT). Os testes de temperatura realizados mostraram que a temperatura de 20° C durante 144 horas, seguida de 12° C durante 24 horas propiciaram maior produção de AGL (12,9 g.Kg⁻¹ Bioproduto; 43,4 g.g⁻¹ LT). Ao aumentar a concentração de esporos para 1.10^8 esporos.mL⁻¹ houve acréscimo na produção de AGL (14,2 g.Kg⁻¹ Bioproduto; 58,1 g.g⁻¹ LT). A otimização dos fatores ambientais de cultivo para maior produção de AGL possibilitou a redução de 24 horas do tempo de cultivo da linhagem M1, havendo no final a produção deste ácido graxo de 17,1 g.Kg⁻¹ Bioproduto. Verificou-se que um tempo maior de cultivo acarretou decréscimo das quantidades de LT e AGL. Sugere-se que outros estudos devem ser desenvolvidos para se determinar a digestibilidade, viabilidade e aceitação do produto final destinando-o como ração animal.

Palavras-chaves: fungos filamentosos, farinha de soja, ácido gama-linolênico, temperatura, inóculo

ABSTRACT

Unsaturated fatty acid naturally occur in vegetable oils and cold-water fishes. They have powerful biological activities being anti-inflammatory and hormone precursor. The search for new organisms which are rich in omega 6 unsaturated fatty acid family has been intensified. Soil filamentous fungi from Mucorales order are known by having high fatty acids concentrations. Firstly, two *Mucor circinelloides* strains isolated from caatinga soil area, M1, and from cerrado, M2, have been used. The preliminary tests have been carried out to select the best strain for production of gamma-linolenic acid (GLA). From the automatized incubator system results, either the best carbon sources, glucose and maltose or the best pH, 5.8, have been selected for biomass production in submerged culture. In that cultures focused on better GLA production, M1 strain has been selected under pH 5.8, temperature of 25 °C, 150 rpm rotation and with a 1.10^7 mL⁻¹ spore inocula. The cultures in solid substrate have been carried out with soy flour, wheat bran, citric pulp, sugar cane bagasse and cassava rind, added with 1% yeast extract, at 25 °C, for 168 hour. The increase of total lipids (TL) values of all cultures has been observed. The soy flour was the best substrate for GLA production. The substrate added with different carbonic supplements, demonstrated that canola:sesame 2% (1:1 w/w) oil mixture was the best inducer of GLA production (6.2 g.Kg⁻¹ Bioproduct; 26.0 mg.g⁻¹ TL). The rice rind addition in the substrate improved the aeration and the exploitation of it, for the fungi strain, increasing the GLA synthesis (8.4 g.Kg⁻¹ Bioproduct; 36.3 mg.g⁻¹ TL). Temperature tests have shown that 20 °C during 144 hours followed by 12 °C during 24 hours has led to a greater GLA production (12.9 g.Kg⁻¹ Bioproduct; 43.4 mg.g⁻¹ TL) When the spore concentration as increased to 1.10^8 spores.mL⁻¹ there was an increase in the GLA production (14.2 g.Kg⁻¹; 58.1 mg.g⁻¹ TL). The culture environmental factors optimization for increasing the production of GLA led the M1 strain to a 24-hour time reduction. The optimization resulted led in a fatty acid production of 17.1 g.Kg⁻¹ Bioproduct. Longer time culture, caused decrease on the amounts of TL and GLA. Other studies must be developed to determine the digestibility, viability and acceptance of the final product for animal feed.

Key words: filamentous fungi, soy flour, gamma-linolenic acid, temperature, inocula

1 INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras são componentes essenciais para a dieta humana, os quais desempenham diferentes papéis no organismo humano como reserva de energia, de fosfolípidios e de esteróis. Estes contêm ácidos graxos essenciais que não são produzidos pelos mamíferos, mas precisam estar presentes na dieta, auxiliando no transporte e absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K pelo intestino bem como, conferem sabor aos alimentos (BELITZ e GROSH, 1992). Ácidos graxos essenciais das famílias Omega 3 e Omega 6 possuem de dezoito a vinte e quatro átomos de carbonos com insaturações promovidas por enzimas denominadas desaturases e elongases.

Uma dieta rica em ácidos graxos insaturados (AGI) modifica o perfil lipídico reduzindo os níveis plasmáticos de triglicérides, colesterol “Very Low Density Lipoproteins” (VLDL), colesterol “Low Density Lipoprotein” (LDL) e colesterol total e aumento dos níveis de colesterol “High Density Lipoprotein” (HDL) estando associado com diminuição do risco

de aterosclerose e doença coronária (RIBEIRO e BURKET, 1989). A prescrição de AGI para pacientes que sofrem de doença de Crhon promove melhora clínica moderada (GRAHAM et al., 2002; BUARRAJ et al. 2004). O decréscimo de ácidos graxos poliinsaturados no plasma aumentou as incidências de depressão e comportamento suicida em pacientes que apresentaram baixa concentração de colesterol no plasma, tendo outras perturbações bioquímicas como na ativação do sistema inflamatório, resultando em aumento de citoquinas pro-inflamatórias e eicosanóides CAPAno sangue (COLIN et al., 2003).

Ácidos graxos insaturados, como ácido gama-linolênico (AGL), ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenóico (AEP) e ácido docosahexaenóico (ADH), são obtidos principalmente a partir de óleo de peixe de água fria (YAQOOB et al., 2000), óleo de prímula (*Oenothera biennis*, *O. lamarckiana*) (WARD, 1995), óleo de borragem (*Borago officinalis*) (GÓMEZ e OSSA, 2002), óleo da semente de groselha preta (*Ribes nigrum*) (GILL e VALIVETY, 1997) e óleo de linhaça e oliva (NUERNBERG et al., 2005). A composição de ácidos graxos dos óleos obtidos de fontes vegetais pode variar dependendo das diferentes condições de crescimento tais como qualidade do solo, chuva, temperatura e outros fatores ambientais, causando moderadas modificações nos níveis de AGL, que geralmente é encontrado esterificado ao glicerol na forma de triacilglicerol (CARVALHO, 1994).

Com o avanço da biotecnologia industrial em todas as áreas do conhecimento, novas alternativas de produção de moléculas de interesse farmacêutico e nutricional enriquecendo alimentos tornando-os mais saudáveis foram desenvolvidas e organismos como algas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos foram testados para produção de óleos microbianos. Esses estudos contribuiram para o entendimento dos mecanismos bioquímicos de produção e acumulação de lipídios em células microbianas denominadas “single cell oil” (HAAL e RATLEDGE, 1977; GILL et al., 1977; VEGA et al., 1988). Os processos fermentativos utilizando meios de cultivo preparados tiveram que passar por modificações como concentração inicial de nitrogênio mineral ou orgânico, concentração de sais e minerais e fontes de carbono, tanto quanto os fatores de crescimento como pH e temperatura dos cultivos. Tais contribuições fizeram com que pesquisas, envolvendo produção e acumulação de óleos microbianos, considerassem as rotas metabólicas (enzimáticas) que podem ser induzidas ou reprimidas de acordo com os parâmetros escolhidos para o processo de fermentação (WYNN et al., 2001; RATLEDGE, 2002).

Dentre os microrganismos testados, algumas espécies de leveduras e de fungos filamentosos foram selecionadas e classificadas como espécies oleaginosas. Dentre as leveduras, *Apiotrichum curvatum*, *Candida* sp. (HAAL e RATLEDGE, 1977; VEGA et al.,

1988) foram estudadas e otimizadas para a produção de óleos microbianos em biorreatores. No entanto, os fungos filamentosos da ordem Mucorales são os mais intensamente estudados, para a produção de ácidos graxos poliinsaturados, dos quais, *Mortierella alpina*, *M. elongata*, *M. isabelina* (CHAUDHURI et al., 1998; XIAN et al., 2003; ZHU et al., 2006), *Cunninghamella echinulata* (GEMA et al., 2002; FAKAS et al., 2006), *Mucor rouxii*, *M. circinelloides*, *Mucor hiemalis* (WYNN et al., 2001; SILVA et al., 2003; AHMED et al., 2006; JEENOR et al., 2006; CERTIK et al., 2006), foram aplicadas em diferentes parâmetros de crescimento envolvendo meios de cultivo alternativos.

Estudos envolvendo a viabilidade de produção de ácidos graxos poliinsaturados por fungos filamentosos em escala industrial têm sido desenvolvidos em reatores empregando processos em sistema líquido (CERTIK e SHIMIZU, 1999; DYAL e NARINE, 2005). Esses estudos desenvolveram equações matemáticas e analisaram o rendimento do processo para a produção de AGL, AA, AEP e ADH, sugerindo indicadores de produção como conteúdo de AGI do óleo, conteúdo de AGI da célula, concentração de AGI no reator (g/L), conteúdo de triacilglicerol do óleo (%), produtividade específica de AGI (g AGI/g célula·h), produtividade volumétrica de AGI (g AGI/L·h), custo dos nutrientes/unidade AGI (US\$/g AGI) e custo dos nutrientes/unidade produtiva (US\$/L·h/g AGI). Estes parâmetros muitas vezes se tornam problemas econômicos quanto ao sistema de produção em escala industrial, pois se faz necessário à adição de componentes ao meio de cultivo, inviabilizando o processo, se não forem bem controlados (KENNEDY et al., 1993).

A comercialização de óleos microbianos ricos em AGI já pode ser observada, tendo como pioneiros Japão e Inglaterra (CARVALHO, 1994). Algumas patentes foram desenvolvidas utilizando fungos, como *Pythium ultimum*, *Rhizopus arrhizus*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* e *Mortierella alpina*, utilizando processos em sistema líquido onde estes microrganismos foram cultivados sob diferentes condições de estresse, nutrientes, pH, relação C:N, adição de íons de cobre, zinco e ferro e processos envolvendo produção de enzimas desaturases e sua caracterização (HERBERT e KEITH, 1989; O'BRIEN et al., 1993; BIJL et al., 2001; URSIN, et al., 2006).

Processo utilizando materiais de origem animal e vegetal como substrato tem sido extensivamente usado, para a obtenção de produtos de origem microbiana. Este processo, o qual não possui água livre para o crescimento microbiano, é chamado de Cultivo em Substrato Sólido (CSS). Sua utilização teve início aproximadamente em 2.600 a.C. pelos egípcios e 1.000 a.C. pelos orientais na produção do koji (OOIJKAAS et al., 2000). O desenvolvimento de técnicas e modelos de cultivos utilizando fungos filamentosos tem sido

intensamente aplicado, na obtenção de novos alimentos e na produção de enzimas de interesse industrial. Nessas se agregaram valores devido à capacidade de reduzir compostos complexos a compostos mais simples, conferindo maior sabor aos alimentos e reduzindo custos de produção da celulose, com tecnologia mais limpa (HÖLKER et al., 2004).

Quanto ao aspecto econômico, o CSS é um processo promissor devido a grande capacidade dos microrganismos em degradar compostos que seriam dificilmente degradados após processos industriais. Com isso, métodos de análise de crescimento microbiano em CSS são estudados, para determinar melhor o método de cultivo e análise de aproveitamento do substrato para conversão em produtos, pois, métodos tradicionais não são válidos, para determinação de biomassa (MARÍN et al., 2005). Modelos de biorreatores também têm sido propostos para obter melhor desenvolvimento microbiano e produtos de interesse, sendo propostos reatores em colunas, bandeja, com agitação, controle da aeração e umidade (KALOGERIS et al., 2003; RAHARDJO et al., 2005; 2006).

A utilização do CSS para produção de AGI iniciou-se recentemente com trabalho publicado por Emelyanova (1996) utilizando cevada, arroz, trigo e milho, e *Cunninghamella japonica* como microrganismo para a produção de AGL. Os resultados obtidos despertaram os interesses de outros autores (ABU et al., 2000; STREDANSKY et al., 2000a; STREDANSKY et al., 2000b; JANG et al., 2000; CONTI et al., 2001) que iniciaram estudos com diversos substratos e fungos filamentosos da classe Zigomicota, dentre eles *Mucor circinelloides*, *Mortierella* sp. e *Cunninghamella* sp. Abu et al. (2000) estudaram os efeitos lipogênico e lipolítico de linhagens de *Aspergillus oryzae* e *A. niger* utilizando batata-doce (*Ipomoea batatas*) determinando o tempo de cultivo ideal para a acumulação de AGL e diminuição de ácidos graxos de menor interesse na dieta como ácido esteárico (AE) e ácido linoléico (AL). Os resultados obtidos foram consistentes com o dinamismo e versatilidade do metabolismo fúngico. Conti et al. (2001) estudaram diversos cereais como substratos com o emprego de diversas espécies da ordem Mucorales, juntamente com o efeito da temperatura na conversão e insaturação de ácidos graxos insaturados.

Gema et al. (2002) estudaram a produção de AGL utilizando polpa de laranja a partir do cultivo de *C. echinulata*. Neste estudo verificaram os efeitos da relação C:N com a produção de lipídios; com isso, observaram que a insaturação de AGI foi mais acentuada com a depleção do nitrogênio do meio de cultivo, juntamente com o decréscimo de lipídios. Estas características de produção de AGL e decréscimo de lipídios são condizentes com os resultados obtidos em processos realizados em sistema líquido, no qual tende haver um

acréscimo de ácidos graxos insaturados e decréscimo dos ácidos graxos saturados (KOIKE et al., 2001).

Ilyemi et al. (2006) estudaram o processo em sistema sólido, utilizando sementes de palma como substrato no cultivo de *Trichoderma harzianum* e *Aspergillus niger* verificando na biomassa fúngica o conteúdo de proteína total, aminoácidos e ácidos graxos. Concluíram que o processo de CSS em sementes de palma melhora os valores nutricionais, podendo ser este material fermentado como ingrediente alimentar para animais, porém deve-se realizar estudos de digestibilidade. Certik et al. (2006) estudaram diversas linhagens de fungos filamentosos e vários cereais e misturas de cereais, obtendo um substrato misto acrescido ou não de óleos vegetais. Neste estudo concluíram que o processo de CSS pode ser aplicado para obter novos bioprodutos enriquecidos de AGL, podendo ser usado como alimento de menor custo, gerando novas perspectivas para uma nutrição enriquecida de AGI em uma dieta a base de cereais.

Estudos relacionados à otimização do processo de CSS como também a viabilidade econômica para a produção de AGI merecem mais atenção, pois o emprego de subprodutos industriais como substrato para o cultivo de fungos filamentosos pode diminuir os custos de produção e reduzir gastos de energia para a execução do processo.

2 OBJETIVOS

Este trabalho é parte integrante do Grupo FUGALI do Centro de Estudo Ambientais (CEA) da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, que visa à produção de ácidos graxos e enzimas a partir de fungos filamentosos do solo, de áreas naturais e degradadas.

Objetivos específicos:

- Verificar a produção de biomassa, lipídios totais e ácidos graxos insaturados de duas linhagens de *Mucor circinelloides* isoladas do solo de área de cerrado (Corumbataí – SP) e de caatinga (Floresta Nacional Contendas do Sincorá,

Vitória da Conquista, BA) utilizando método turbidimétrico automatizado – Labsystem Bioscreen C;

- Selecionar as melhores condições de cultivo usando diferentes formas de inóculo, fontes de carbono e pH;
- Selecionar o melhor substrato de origem vegetal para a realização do processo de cultivo em sistema sólido, com maior produção de AGL e menor custo de aplicação;
- Verificar o efeito do tempo de cultivo quanto à acumulação de lipídios totais e produção de ácidos graxos insaturados;
- Verificar o efeito da suplementação do substrato com fontes de carbono de origem vegetal (óleos vegetais) e carboidratos;
- Verificar o efeito da adição de agentes descompactantes ao substrato quanto ao seu aproveitamento (do substrato), para a produção de lipídios totais e produção de AGL.
- Verificar o efeito da mudança de temperaturas durante o processo de cultivo e produção de AGL.
- Verificar o efeito da concentração de inóculo para a produção de AGL.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos são popularmente conhecidos como bolores e se encontram amplamente disseminados na natureza, sendo freqüentemente observados em pães, queijos velhos e frutas deterioradas. Cada filamento desses microrganismos cresce principalmente em sua extremidade, a partir da extensão da célula terminal. Um único filamento recebe a denominação de hifa e estas estruturas crescem em conjunto, ao longo de uma superfície, formando tufo compactos, sendo esse conjunto denominado micélio (MADIGAN et al., 2004).

Pesquisas demonstraram que os fungos filamentosos possuem um importante papel em uma gama de processos biotecnológicos, em particular, por serem produtores de

grande variedade de enzimas e metabólitos como antibióticos, ácidos orgânicos, pigmentos e outros aditivos alimentares (JAY, 2000). Baseando-se neste conhecimento biotecnológico, diversos trabalhos mencionaram modificações genéticas para esses microrganismos, afim de que a produção de seus metabólitos fosse otimizada, tornando-os definitivamente viáveis à produção em escala industrial (IWASHITA, 2002).

3.2 Zigomicetos

Os zigomicetos constituem um grupo de fungos filamentosos pertencentes ao filo Zygomycota. Caracterizam-se, entre outros aspectos, por apresentarem a parede celular constituída por quitina e quitosano, além do micélio geralmente cenocítico, com septos apenas na delimitação dos órgãos de reprodução ou quando a colônia envelhece (BONONI, 1999).

A taxonomia dos zigomicetos está essencialmente baseada no tipo de vida de seus representantes (sapróbia, parasita, mutualista) e também nas características morfológicas de suas estruturas de reprodução assexuada. Para este grupo de fungos, sabe-se que a reprodução assexuada ocorre com a diferenciação de esporos imóveis, que são formados por diferentes estruturas chamadas esporângios, esporangíolos, merosporângios, esporângios uniesporados e cladosporângios. Esta forma de reprodução pode ainda ocorrer a partir de fragmentos de micélio, pois os fungos são altamente capazes de regeneração e também através da formação de gemas ou clamidósporos, que correspondem a segmentos do micélio que são divididos em compartimentos com a formação de septos (**FIGURA 1**). Normalmente, ocorre também o espessamento da parede, a condensação do citoplasma e o acúmulo de óleos. Já a reprodução sexuada ocorre apenas quando dois micélios geneticamente compatíveis se colocam lado a lado liberando substâncias químicas e permitindo então a plasmogamia (BONONI, 1999).

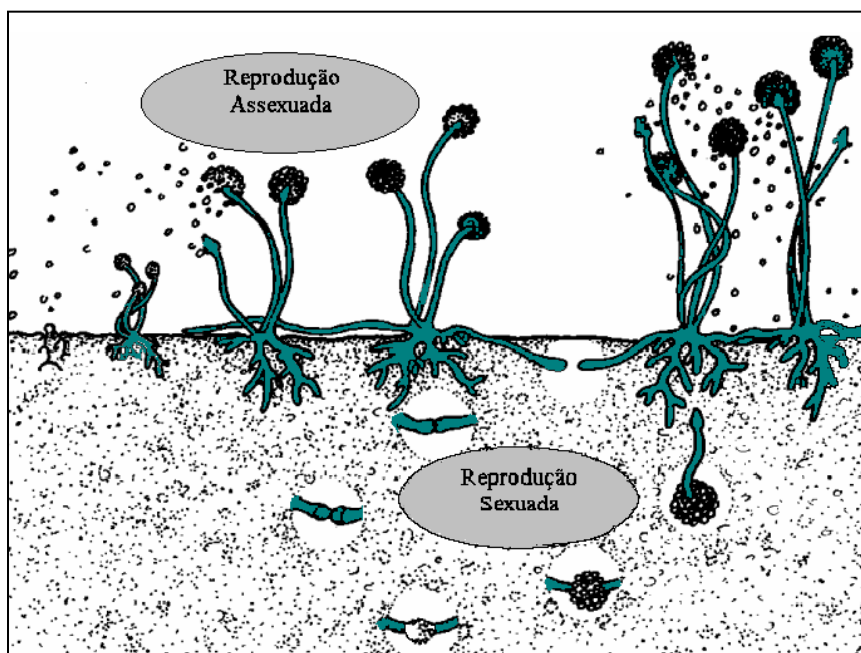


Figura 1. Ciclo reprodutivo de um representante da classe Zigomicetos, ordem Mucorales (*Rhizopus sp.*). Reprodução Assexuada: o micélio vegetativo se desenvolve e forma hifas aéreas produzindo esporângio o qual se rompe liberando esporangiósporos que, ao se alocarem em substrato ideal germinam fechando o ciclo. Reprodução Sexuada: nas extremidades das hifas (+) e (-) formam gametas que se fundem formando zigósporo, sofrendo meiose formando um zigoto que germina formando novo micélio. Fonte: Biodidac

Os zigomicetos estão distribuídos em sete ordens, trinta e duas famílias e cento e trinta gêneros, com aproximadamente novecentas espécies. Mucorales é a ordem com maior número de espécies (cerca de trezentas). Seus representantes também são conhecidos como fungos do açúcar, uma vez que sua capacidade de degradação limita-se às moléculas de estrutura mais simples, como glicose e sacarose. Assim, são os primeiros fungos a colonizarem um substrato crescendo exuberantemente, com micélio denso e conspícuo, chegando a atingir de dois a três centímetros de altura (ALEXOPOULOS et al., 1996).

A família Mucoraceae é a mais numerosa das famílias da ordem Mucorales, estando representada por vinte gêneros e cerca de cento e trinta espécies, que são caracterizadas pela formação de esporângios multi-esporulados, com columela bem desenvolvida, podendo apresentar espinhos e outros tipos de projeções. Os representantes mais comuns pertencem aos gêneros *Actinomucor*, *Mucor*, *Rhizomucor* e *Zygorhynchus* (BONONI, 1999).

3.2.1. *Mucor circinelloides* descrito por Schipper (1976)

Dentro da classificação de *Mucor circinelloides* pode-se encontrar algumas variedades devido às diferenças apresentadas nas estruturas de reprodução, como a presença de esporos esféricos formados em várias circunstâncias e diferenças no comprimento da ramificação dos esporângios. Testes de interfertilidade provaram que *Mucor circinelloides*, *Mucor lusitanicus*, *Mucor griseo-cyanus* e *Mucor janssenii* podem ser classificados em indivíduos com espécies variáveis.

A identificação mediante técnicas clássicas baseadas na morfologia das colônias de *M. circinelloides* pode ser desvantajosa devido às características atípicas apresentadas sob condições desfavoráveis, por exemplo, a distância entre o esporângio e a ramificação lateral mais próxima pode ser tão reduzida que o primeiro parece ser sésil e, muitas vezes, o crescimento deste é interrompido ou ocorre falhas no desenvolvimento, podendo haver esporângios estéreis, protuberância terminal das hifas e tumefação nos esporangióforos, paredes finas e uniformes ou, menos frequentemente, ligeiramente incrustada como uma parede esporangial normal, podendo apresentar esporângios pequenos, columela de subglobosa à aplanada e os esporangiósporos tendem ser subglobosos e de tamanhos variáveis.

3.3 Cultivo em Substrato Sólido (CSS)

O cultivo utilizando substratos sólidos para a obtenção de produtos alimentícios (molho de soja, miso, tempeh, koji e outros) e bebidas fermentadas (Sake, Chicha, Boza, Mahewu, Bouza) possui registros desde 1.000 a.C. nos países do Oriente e de 100 d.C. nos países do Ocidente (BIANCHI et al., 2001; BLANDINO et al., 2003). Por definição, cultivo em substrato sólido é o desenvolvimento de microrganismos no qual a umidade presente é suficiente para manter o crescimento e o metabolismo microbiano, não existindo água livre e ar contínuo nesta fase (RAHADJO et al., 2006). Esse processo simula as condições de vida de muitos microrganismos utilizados para a obtenção de enzimas (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003; RAHARDJO et al., 2005; SIMÕES e TAUKTORNISIELO, 2005), metabólitos secundários (ROBINSON et al., 2001; HÖLKER et al.,

2004; KRISHNA,2005), enriquecimento protéico (CAMPOS et al., 2005; ILUYEMI et al., 2006) enriquecimento lipídico (ABU et al.; 2000; GUI-YOU et al., 2004; CERTIK et al., 2006) e produção de esporos (HÖLKER et al., 2004; VICCINI et al., 2006), e é o método de escolha de cultivo nos casos em que os processos biotecnológicos são requeridos incluindo diferenciação morfológica e metabólica para penetração do substrato e formação de hifas aéreas (HÖLKER et al., 2004).

No processo de CSS, os fungos filamentosos são os mais adaptados devido a suas propriedades fisiológicas e bioquímicas. Os esporos produzidos durante este tipo de cultivo possuem maior estabilidade, são mais resistentes ao ressecamento e exibem altas razões para germinarem por períodos mais extensos, depois de serem congelados (HÖLKER e LENZ, 2005).

Após a germinação do esporo, os fungos filamentosos formam hifas tubulares que se alongam nas pontas e ao mesmo tempo formam novas ramificações ao longo dessas hifas (**FIGURA 2**), formando uma rede tridimensional chamada de micélio, que cresce dentro da matriz do substrato, na superfície e formando hifas aéreas (RAHARDJO et al., 2006). Esta morfologia permite que os fungos filamentosos colonizem a superfície do substrato e suas hifas penetrem-no em busca de nutrientes (MITCHEL et al., 2000). Os fungos, não podendo transportar substratos macromoleculares torna-se necessária a excreção de complexos enzimáticos hidrolíticos, quebrando-os em compostos menores que são absorvidos através da membrana celular, para promoverem atividades de biossíntese e metabólica (RAIMBAULT, 1998).

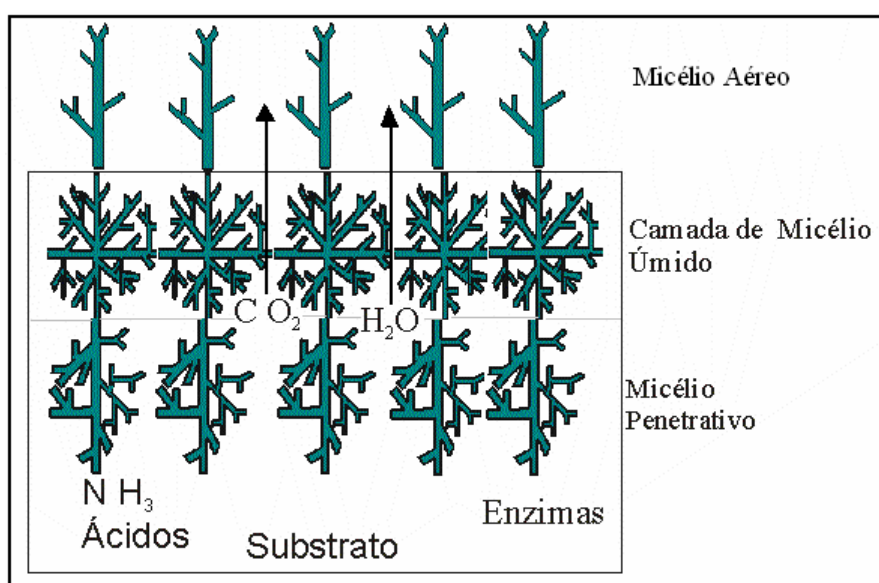


Figura 2. Crescimento representativo de um fungo filamentoso em substrato sólido (modificado de RAHARDJO et al., 2006).

O processo de CSS possui algumas vantagens sobre o cultivo submerso (CSm) que devem ser consideradas durante a escolha do processo de cultivo a ser utilizado (RAIMBAULT, 1998). Embora os métodos para CSm estejam bem desenvolvidos, não são aplicáveis ao processo de CSS devido às diferenças na estrutura física do sistema (MITCHELL et al., 2000). Além disso, o CSS apresenta algumas limitações como dificuldade em dissipar o calor e os gases gerados durante o processo, dificuldades em controlar pH, umidade, temperatura, aeração e nas coletas de amostras representativas durante o processo, devido a não homogeneização da biomassa em crescimento (RAHARDJO et al., 2005; MARQUES et al., 2006; RODRIGUEZ et al., 2006; MISRA et al., 2007).

A composição química e as propriedades físicas do substrato são importantes determinantes para o crescimento e a fisiologia do microrganismo cultivado e a natureza do produto associado ao custo e viabilidade do processo (PANDEY et al., 2000; VALINO et al., 2004). Dessa maneira, os materiais utilizados como substratos nos cultivos em meio sólido incluem produtos como arroz, mandioca, soja, beterraba, batata e batata doce (FENG et al., 2000; NWE et al., 2002; ABDEL-FATTAH et al., 2002) e resíduos da exploração destes produtos como farelo e a palha de trigo e de arroz (GOMES et al., 1994; RIDDER et al., 1999; CASTILHO et al., 2000; JECU, 2000; BAKIR et al., 2001; BIESEBEKE et al., 2002; CHEN et al., 2002), bagaço de mandioca (VANDENBERGHE et al., 2000; PALMA et al., 2002) e de cana-de-açúcar (PALMA et al., 1996; SOUZA et al., 1999), resíduos da indústria de processamento do café (BRAND et al., 2000; SOARES et al., 2000), resíduos das indústrias processadoras de frutas como maçã, figo, morango e manga (BRAMORSKI et al., 1998; COURI et al., 2000; ROUKAS, 2000; ZHENG e HETTY, 2000; SHOJAOSADATI e BABAEIPOUR, 2002), resíduos de indústrias extratoras de óleo como tortas de oliva, de amendoim, de soja, de canola e de babaçu (HADDADIN et al., 1999; PALMA et al., 2000; FENICE et al., 2003), sabugo de milho (DAMASO et al., 2000; BAKIR et al., 2001), entre outros.

O desenvolvimento de bioprocessos para o enriquecimento de produtos de origem agroindustrial, tanto protéico como lipídico, fez do CSS um importante instrumento para a obtenção de bioprodutos para melhor desenvolvimento de aves, bovinos e suínos (MENDONÇA e PIMENTEIRA, 2001; BUARRAJ et al., 2004). Tais processos têm alcançado sucesso na produção de ácidos graxos insaturados microbianos (**TABELA 1**), levando ao aumento do interesse em desenvolver técnicas de cultivo e disponibilizar processos para atender a produção em níveis comerciais (LEMAN, 1997; CERTIK e SHIMIZU, 1999) além de aumentar a digestibilidade do substrato em animais ruminantes ou

não ruminantes, degradar compostos tóxicos e elevando os teores nutricionais (ZHANG et al., 2006).

Tabela 1. Obtenção de ácidos graxos insaturados utilizando cultivo em sistema sólido.

Produtos Obtidos	Substratos	Microrganismo	Referências
AGL, AO, AL, AP16:0, AP16:1	Cevada, trigo, arroz	<i>Cunningamella japonica</i>	Emelyanova, 1996
AGL, AL, ADGL	Batata doce	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>P. ostreatus</i>	Abu et al., 2000
AGL, AEP, AA	Polpa de maçã, arroz, cevada, malte,	<i>Pithium ultimun</i> , <i>Thamnidium elegans</i>	Stredansky et al., 2000a, 2000b
AL, AGL, AAL, AA, AEP	Amendoim, farelo de arroz e trigo, resíduo de batata doce	<i>Mortirella alpina</i>	Jang et al., 2000
AGL	Cevada, trigo, arroz, arroz glutinoso, aveia	<i>C. elegans</i> , <i>C. echinulata</i> , <i>Rhizopus sp</i> , <i>T. elegnas</i> , <i>Mucor sp.</i> , <i>Mortierella sp.</i>	Conti et al., 2001; Gema et al., 2002; Guiyou et al., 2004; Certik et al., 2006
AO, AL, AGL	Semente de palma	<i>T. longibrachiatum</i> , <i>A. niger</i> , <i>S. rolfsi</i>	Iluyemi et al., 2006

Do ponto de vista nutricional, alimentos como grãos de cereais, farelos em geral, possuem baixo teor de lipídios com variação de 3,6% em seu conteúdo calórico total, porém, o AL é o maior constituinte da família ômega 6 encontrado nos grãos (CORDIAN, 1999). Dessa forma, a dieta tende ser deficiente em outros ácidos graxos essenciais como AGL e AA (CERTIK et al., 2006). O primeiro processo industrial para produção de AGL, utilizando cultivo de fungos oleaginosos, foi desenvolvido no Reino Unido usando *M. circinelloides* (RATLEDGE, 1993) em cultivo submerso. O conhecimento do comportamento de fungos oleaginosos, tanto lipolíticos como lipogênicos, quanto à obtenção de AGI ou ao enriquecimento de resíduos agroindustriais que podem ser destinados à ração animal, é necessário para otimização da produção de ácidos graxos essenciais visando a uma produção em maior escala.

3.4 Lipídios

Óleos, gorduras e outras substâncias de caráter semelhante são denominados lipídios por apresentarem como característica comum insolubilidade em água, sendo compostos altamente reduzidos. Possuem em sua estrutura química os átomos de carbono, hidrogênio e outros grupos. Na utilização como fonte de energia requer oxidação altamente exergônica (LEHNINGER et al., 2002).

Terroine (1979) *apud* Leite (1999) classificou os lipídios em duas classes: variáveis e constantes. Os lipídios variáveis compreendem os óleos e gorduras saturados que possuem funções importantes como fornecedores de calorias, sendo chamados de lipídios de reserva. Os lipídios constantes compreendem os óleos e gorduras presentes nas membranas, nos tecidos como nervoso e circulatório, nos órgãos como fígado e rins e nos músculos e, por estas características, são também conhecidos como lipídios estruturais.

Estes compostos possuem funções imprescindíveis para o bom funcionamento do organismo tais como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares. Na dieta humana, os lipídios são responsáveis por liberarem a maior parte da energia necessária para a manutenção das vias metabólicas (cerca de 9 kcal/g), fornecendo duas vezes mais energia que outras fontes como carboidratos e proteínas. Outras funções atribuídas aos lipídios são: vitaminas lipossolúveis A, D, E e K; mediadores celulares como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas; isolamento térmico de animais e o de conferir sabor aos alimentos (OYAMA et al., 2001). Diversas complicações na saúde humana, porém, são atribuídas ao consumo exagerado de lipídios que vem ocorrendo nas últimas cinco décadas, como resultado da mudança dos hábitos alimentares da população, elevando assim a incidência de acidentes coronários, acidentes vasculares cerebrais, aumento do colesterol LDL e de algumas formas de câncer (VALSTA et al., 2005).

Compostos presentes nas moléculas de triacilglicerol, fosfolipídios, glicerofosfolipídios e esfingolipídios, portanto, são importantes precursores de hormônios esteróides e eicosanóides e devem estar presentes na dieta humana para que os sistemas biológicos ligados ao metabolismo, à defesa imune e à regulação hormonal possam estar em equilíbrio com as exigências nutricionais do organismo.

3.5 Ácidos Graxos Insaturados

Os lipídios são constituídos basicamente por ácidos graxos que correspondem a uma cadeia carbônica apolar e um grupo carboxila polar, sendo representados pela fórmula geral RCOOH. Podem possuir de 4 a 36 átomos de carbonos e nenhuma ramificação. Os mais comumente encontrados são os que apresentam 16 e 18 átomos de carbonos. Na natureza, os ácidos graxos são encontrados na forma saturada constituída apenas de ligações simples e cadeias planas, ou nas formas insaturadas constituídas por uma ou mais dupla ligações podendo apresentar uma curva em sua cadeia carbônica. As ligações duplas são sempre separadas por um grupo metileno ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) e possuem um sistema de classificação simplificado indicando o número de átomos de carbonos, número de ligações duplas e a localização das mesmas (**TABELA 2**) (LEHNINGER et al., 2002). A presença de ácidos graxos saturados e insaturados na membrana citoplasmática dos organismos têm fundamental importância quanto à determinação da fluidez da mesma, para compostos presentes na região externa à membrana adaptando-se ao meio circundante.

Tabela 2. Nomenclatura de ácidos graxos saturados e insaturados.

Ácidos graxos	Estrutura	Nº de carbonos e insaturações	Localização da insaturação	Nomenclatura
Ácido Palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0		16:0
Ácido Esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0		18:0
Ácido Oléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1	9	18:1 Δ^9
Ácido Linoléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2	9,12	18:1 $\Delta^{9,12}$
Ácido Linolênico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:3	9,12,15	18:1 $\Delta^{9,12,15}$
Ácido Araquidônico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	20:4	5,8,11,14	20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$

Os AGI podem ser encontrados tanto na configuração *cis* quanto na configuração *trans*. Entre os organismos do domínio *Eukaria* a configuração *cis* é a mais comumente encontrada, podendo ser encontrada em menores quantidades a configuração

trans em animais ruminantes que apresentam microrganismos em seu trato digestivo. Esses microrganismos são capazes de converter a configuração *cis* na configuração *trans*, através de enzimas presentes em seus sistemas metabólicos, ocorrendo processo de hidrogenação dos ácidos graxos insaturados (MANCINI FILHO e CHEMIN, 1996). Em organismos do domínio *Bacteria*, a relação entre ácidos graxos *trans/cis* é utilizada como uma forma de adaptação dos organismos à sobrevivência em ambientes poluídos com altas concentrações de solventes orgânicos, tendo esta relação, efeito na fluidez da membrana (HEIPIEPER et al., 1996).

Nutricionalmente, os ácidos graxos têm adquirido destaque através de descobertas realizadas a partir de estudos desenvolvidos avaliando seus efeitos sobre a dieta humana com altos teores de ácidos graxos saturados (AGS) e insaturados (AGI). Estes devem ser introduzidos na dieta por não serem sintetizados pelos mamíferos. Os AGI são popularmente conhecidos como ômega-3 (w-3) e ômega-6 (w-6). Esta denominação ocorre devido à localização da última dupla ligação presente na cadeia carbônica apolar antes do grupo metil (**FIGURA 3**). Sendo assim, os AGI da família ômega-3 possuem a última ligação dupla a três carbonos do grupo metil; e os ácidos graxos da família ômega-6 possuem a última ligação dupla a seis carbonos do grupo metil (ROCHE, 1999).

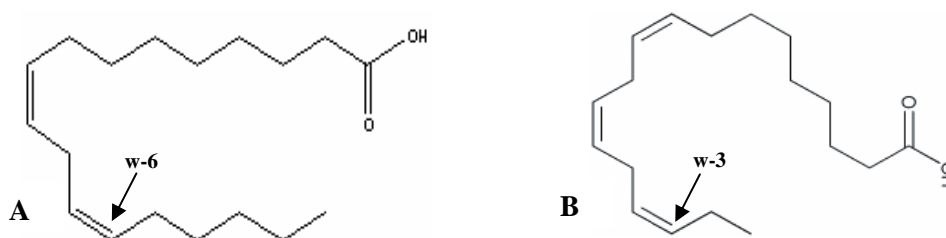


Figura 3. Posicionamento de ligações duplas com configuração *cis* em ácido linoléico (A), família ômega-6 e ácido alfa-linolênico (B), família ômega-3.

Os ácidos graxos da família w-3 são comumente encontrados em peixes de água fria como o atum, *bluefish* e salmão. Nestes são encontrados os ácidos graxos alfa-linolênico (C18:3), eicosapentaenóico (C20:5) e docosahexaenóico (C22:0). Os ácidos graxos da família w-6 são encontrados amplamente entre os reinos, porém, alguns em menores quantidades e em outros não são produzidos (KATCH e McARDLE, 1996). O AL (C18:2 $\Delta^{9,12}$) é o ácido graxo mais comum entre os organismos terrestres. É o principal constituinte

dos fosfolipídios de membrana, desempenhando papel fundamental em sua fluidez e serve como precursor para outros ácidos graxos, com número de insaturações e de carbonos maiores (MURATA e LOS, 1997). Os ácidos graxos com dezoito ou mais átomos de carbono e com mais de duas ligações duplas são sintetizados por organismos como algas, bactérias e fungos ou por plantas oleaginosas tais como soja, canola, girassol e gergelim (JUNQUEIRA et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2005). A composição de ácidos graxos saturados e insaturados variam em cada espécie vegetal (**TABELA 3**) e o valor agregado ao óleo comercializado também varia com a concentração de ácidos graxos insaturados.

Tabela 3. Composição de ácidos graxos saturados e insaturados nos óleos de diferentes espécies vegetais comercializadas no Brasil.

Ácidos Graxos	Valores de Referência (%)			
	Soja	Girassol	Gergelim	Canola
Ácido Mirístico	<0,5	<0,5	<0,5	<0,2
Ácido Palmítico	7,0 – 14,0	3,0 – 10,0	7,0 – 12,0	2,5 – 6,5
Ácido Palmitoléico	<0,5	<1,0	<0,5	<0,6
Ácido Estearico	1,4 -5,5	1,0 – 10,0	3,5 – 6,0	0,8 – 3,0
Ácido Oléico (w-9)	19,0 - 30,0	14,0 – 35,0	35,0 – 50,0	53,0 – 70,0
Ácido Linoléico (w-6)	44,0 – 62,0	55,0 – 75,0	35,0 – 50,0	15,0 – 30,0
Ácido Linolênico (w-3)	4,0 – 11,0	<0,3	<1,0	5,0 – 13,0
Ácido Araquídico	<1,0	<1,5	<1,0	0,1 – 1,2

Fonte: Campestre Indústria e Comércio de Óleos Vegetais Ltda.

Os ácidos graxos podem estar ligados a classes de lipídios tais como neutros ou apolares (de reserva: triacilglicerol) e os polares (presentes nas membranas como fosfolipídios e glicerofosfolipídios). Para a extração em materiais biológicos, várias técnicas têm sido desenvolvidas para a máxima extração de lipídios de materiais vegetal ou animal, sem que as porções de ácidos graxos sejam alteradas durante o processo (NELSON, 1991). Dentre todos

os processos testados, há a preocupação em se utilizar solventes com baixo risco ao ambiente e com baixo índice de toxicidade. Um método clássico de extração de lipídios é o método de Soxhlet (1879) que utiliza hexano como solvente. Este método tem como desvantagem o prolongado tempo de exposição ao calor, que pode causar degradação térmica e devido ao grande volume de solvente utilizado.

Outros métodos de extração, conhecidos como métodos de extração a frio quando comparados ao método de Soxhlet (1879), envolvem a utilização de ao menos dois tipos de solventes (FOLCH et al., 1957; BLIGH e DYER, 1959; HARA e RADIN, 1978). O método de Hara e Radin (1978), utilizando *n*-hexano – isopropanol – água, foi analisado para a extração de lipídios de amostras de vegetal e animal, sendo que otimizações do mesmo podem torná-lo aplicável para a extração de lipídios, substituindo os solventes altamente tóxicos. Os dois métodos, o de Folch et al. (1957) e o de Bligh e Dyer (1959) utilizam clorofórmio e metanol para a extração de lipídios em amostras de vegetal e animal, porém em proporções diferentes. Apesar da toxidez destes solventes, tais métodos têm sido os mais utilizados em trabalhos envolvendo extração da fração lipídica de microrganismos. Isso devido ao alto teor de lipídios extraído da biomassa e pela capacidade que os sistemas testados apresentaram em extrair eficientemente os lipídios polares de membranas celulares (STREDANSKY et al., 2000; SOMASHEKAR et al., 2002; JANG et al., 2005).

3.6 Biossíntese de Ácidos Graxos Insaturados

Quando a disponibilidade de um combustível para uma célula ou organismo, tanto carboidratos como lipídios excedem a quantidade necessária para suprir as necessidades energéticas, ocorre a conversão desse excedente em ácidos graxos via *ácidos graxos sintase*, que são armazenados em forma de triacilglicerol. O substrato imediato é a acetil-CoA, formada na mitocôndria e transportada para o citosol na forma de citrato com gasto de energia adenosina trifosfato (ATP) e formação de NADPH, utilizado para o processo de biossíntese. Após a primeira unidade de carbono ter sido transferida da acetil-CoA para o grupo SH de um resíduo de cisteína da *β -cetoacil ACP sintase*, a proteína carregadora de acila (ACP) está livre para receber o radical malonil do malonil-CoA, formando o malonil-ACP, que pela ação de enzimas de condensação e do complexo sintase, libera dois carbonos para a formação dos ácidos graxos, com liberação de CO₂, que será utilizado durante a carboxilação da actil-CoA a

malonil-CoA. Após cinco repetições do processo, o palmitato (16:0) é o produto final do sistema ácido graxo sintase nas células animais, vegetais e dos microrganismos (MAYES e BOTHAN, 2003a). O palmitato é o precursor para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa que pode ser alongado para formar tanto estearato (18:0), quanto ácidos graxos saturados ainda maiores, por adições posteriores de grupos acetila, pela ação dos sistemas de alongamento dos ácidos graxos presentes no retículo endoplasmático e na mitocôndria (LEHNINGER et al., 2002).

Para que as reações de alongação e de insaturação ocorram é utilizada uma série de enzimas que catalisam a adição de uma dupla ligação na cadeia *acil graxo*, conhecidas como enzimas dessaturases, que são encontradas quase universalmente em todas as células, ajudando a regular a fluidez dos lipídios de membrana e também possuindo função crítica na biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados (MARZZOCO e TORRES, 1999). Para este processo existem três tipos de enzimas dessaturases: acil-CoA dessaturase, acil-graxo dessaturase e acil-ACP dessaturase. As acil-CoA dessaturases são enzimas ligadas à membrana que dessaturam ácidos graxos esterificados à Coenzima A (CoA), presentes em animais, leveduras e células de fungos. Certik e Shimizu (1999) descreveram alguns caminhos que estariam envolvidos neste processo biossintético: síntese *de novo* de ácidos graxos por glicose, incorporação de ácidos graxos exógenos diretamente à estrutura do lipídio e dessaturação e alongação das fontes de lipídios, bem como, a biohidrogenação dos ácidos graxos (saturação) e degradação parcial ou total (P-oxidação), que contribuem para este processo.

A enzima estearoil CoA (Δ^9) dessaturase de fungos e animais são semelhantes, sendo que, para esta atividade requer oxigênio, citocromo *b5* e são dependentes de NADPH e citocromo *b5* redutase. Esta enzima catalisa o primeiro passo para a biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados incorporando uma ligação dupla no carbono Δ^9 do AE para gerar ácido oléico (AO). A Δ^{12} dessaturase (*w-6* dessaturase) é capaz de adicionar uma ligação dupla na posição Δ^{12} do ácido graxo, formando o AL. A sua atividade foi localizada no retículo endoplasmático e utiliza NADPH e CoA ligada aos ácidos graxos como substrato em plantas (PEREIRA et al., 2003).

A Δ^6 dessaturase é encontrada no retículo endoplasmático de animais. Nos microrganismos foi encontrada em algumas espécies como *Mucor rouxii*. Esta enzima contém uma região rica em histidina não usual modificada abaixo do domínio citocromo *b5*, dentro da região de aminoácidos que está ausente em Δ^6 dessaturases de outros organismos, sendo ela

responsável pela adição de uma dupla ligação na posição $\Delta 6$ da cadeia de ácido graxo, formando o ácido gama-linolênico (C18:3 w-6) (NAPIER et al., 2004), como apresenta a **Figura 4**.

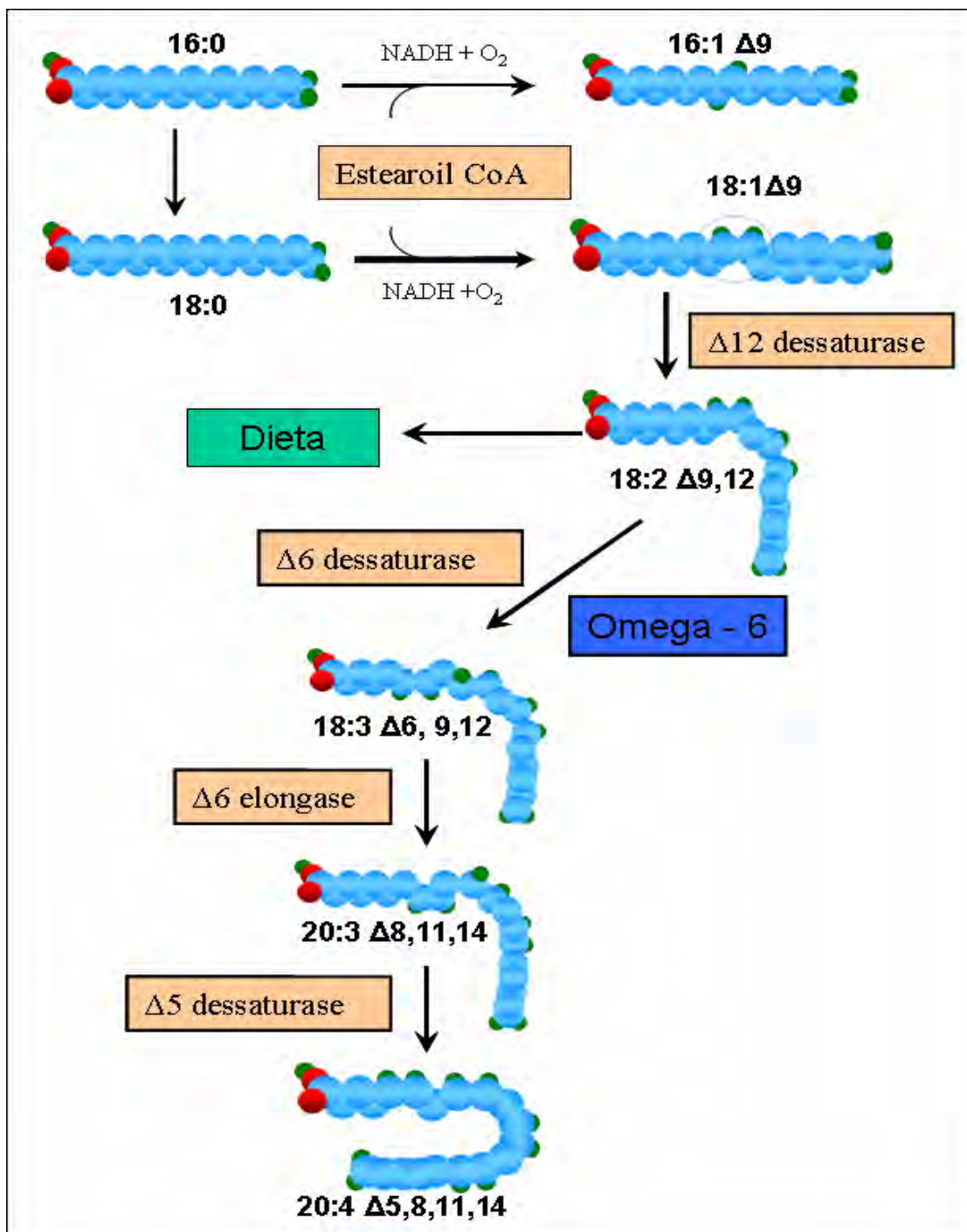


Figura 4. Uma seção do caminho anabólico para síntese de ácidos graxos insaturados modificado de Hornung (2005).

A síntese do AA envolve a elongação do AGL a ácido eicosatrienóico pela ação de uma enzima elongase e uma subsequente dessaturação para a síntese do AA, envolvendo neste processo uma Δ^6 dessaturase, uma *C₁₈-ácido graxo insaturado elongase* específica e uma Δ^5 dessaturase. A biossíntese do AA ocorre na fase estacionária do crescimento sob a exaustão da glicose do meio acompanhada pelo decréscimo de seus precursores de ácidos graxos saturados e insaturados (EROSHIN et al., 2000). Este caminho enzimático para a síntese do AA foi encontrado em organismos, como o fungo *M. rouxii*, alga *Ostreococcus tauri* e o protista *Caenorhabditis elegans* (HUANG et al., 2004).

O caminho de biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados da família w-3 é encontrado em concentrações inferiores em microrganismos partindo da dessaturação promovida pela enzima Δ^{15} dessaturase na posição $\Delta 15$ formando o ácido α -linolênico. Este sofre dessaturação promovida pela Δ^6 dessaturase formando o ácido octadecatetraenóico. Com a adição de dois carbonos promovida pela enzima elongase, é formado o ácido eicosatrienóico (C20:4 w-3), e subsequentemente, dessaturação na posição $\Delta 5$, pela Δ^5 dessaturase, para formar o ácido eicosapentaenóico. O próximo passo da biossíntese desta via ocorre com a formação do ácido docosahexaenóico envolvendo dois passos: o primeiro envolvendo a elongação do ácido eicosapentaenóico para ácido docosapentaenóico e o segundo, a dessaturação do ácido docosapentaenóico para ácido docosahexaenóico através da Δ^4 -dessaturase (RATLEDGE, 2004).

Durante o processo de biossíntese há um mecanismo bioquímico diretamente ligado à disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio. Este influencia a acumulação dos ácidos graxos na célula e na ativação ou repressão das enzimas ligadas à biossíntese (HALL e RATLEDGE, 1977; IMMELMAN et al., 1997; KOIKE et al., 2001). A reação de acumulação envolve dois passos: (1) clivagem do citrato transportado para fora da mitocôndria via malato/citrato translocase, pela ação de uma enzima ausente em microrganismos não oleaginosos – *ATP:citrato liase* e (2) suprimento de acetil-CoA ou malonil-CoA e NADPH para a adição de dois carbonos na cadeia acil graxo pela atividade da enzima *málica*, que é controlada pelo nitrogênio no meio de cultivo, podendo sua atividade ser inibida em sua ausência (RATLEDGE, 2002).

O entendimento dos princípios de biossíntese e acumulação de lipídios em microrganismos propõem investimentos na elaboração de plantas industriais para o enriquecimento de substratos e produção de óleos microbianos com teor acentuado de ácidos graxos insaturados, visando controles de produção e técnicas de clonagem dos

microrganismos selecionados, favorecendo o processo de produção (HUANG et al., 2004; ZHANG et al., 2004).

3.7 Aplicações de Ácidos Graxos Insaturados

Os ácidos graxos insaturados, também conhecidos como gorduras insaturadas, são encontrados tanto naturalmente em vegetais, microrganismos e animais quanto em fontes sintéticas, através de processos industriais contendo hidrogenação. Esta última é realizada em gorduras insaturadas com configuração *cis* passando para a configuração *trans*, sem alterar a posição da ligação dupla, apresentando maior similaridade aos ácidos graxos saturados do que com os isômeros insaturados da configuração *cis* (FIGURA 5). Esta configuração é mais conveniente para fins comerciais e aceitos pelos consumidores por serem mais estáveis e garantirem maior tempo de exposição dos alimentos ao ar e à luz e maior tempo de prateleira (MARTIN et al., 2004).

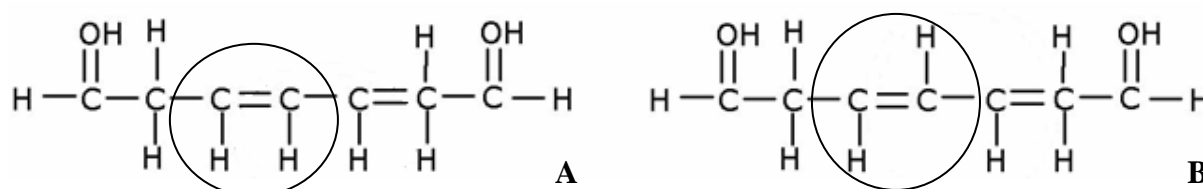


Figura 5. Configuração *cis* e *trans* de ácidos graxos insaturados. (A) configuração isômero *cis*, (B) configuração isômero *trans*.

Os ácidos graxos saturados, mais comumente encontrados em biscoitos, bolachas, margarinas entre outros, são conhecidos por aumentar os níveis de colesterol LDL sem alterar os níveis de colesterol HDL. Os ácidos graxos insaturados *trans* (AGI *trans*) incorporados aos alimentos aumentam o nível de colesterol LDL e diminuem o nível de colesterol HDL. Seus efeitos também estão relacionados ao surgimento de arteriosclerose,

acidente vascular cerebral, e seus excessos são acumulados, principalmente, na região abdominal dos mamíferos (ASCHERIO e WILLETT, 1997; AUED-PIMENTEL et al., 2003). Por estas razões, a resolução RDC 360/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou que as concentrações de carboidratos, proteínas, gorduras totais, ácidos graxos saturados, AGI *trans*, valor energético e sódio sejam discriminados nos rótulos de embalagens, sendo que, o limite mínimo da concentração de AGI *trans* é de 0,2g e concentrações abaixo da indicada podem ser adicionadas ao rótulo como ausente no produto.

Estudos têm comparado o efeito da dieta com altas concentrações de ácido graxo monoinsaturado e verificado seu efeito no tratamento de doenças cardíacas (KRIS-ETHERTON et al., 1999; ALLMAN-FARINELLI et al., 2005; BINKOSKI et al., 2005; PIETERSE et al., 2005). Os ácidos graxos insaturados *cis* (AGI *cis*) possuem extensa aplicação nas áreas farmacêutica, alimentícia e ambiental. O AO (w-9), um ácido graxo monoinsaturado encontrado em óleos vegetais como azeite de oliva, é indicado na alimentação diária devido ao efeito de reduzir o LDL, colesterol no plasma sanguíneo e triacilgliceróis. Esta alternativa para a redução do colesterol LDL tem atraído a atenção de muitos consumidores e pesquisas por novas fontes de ácido graxo monoinsaturado são desenvolvidas, para atender a demanda crescente por óleos ricos nestes ácidos graxos (SENTHILSELVAN et al., 1997; MIR et al., 1999).

Os AGI *cis* da família w-6 e w-3 tornaram-se conhecidos entre a população mundial por seus efeitos benéficos à saúde. Seus efeitos são intensamente estudados em todas as enfermidades observadas em humanos, animais de estimação e os benefícios encontrados em rações destinadas a animais de corte. Os ácidos graxos da família w-6 possuem características inflamatórias e, a partir do AA, acentuam a formação de eicosanóides atuando como precursor para produção de prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos e lipoxinas, que pelo caminho da ciclooxigenase, formam prostaglandinas da série 2 e leucotrienos da série 4 (MAYES e BOTHAM, 2003b). Os ácidos graxos da família w-3 possuem características antiinflamatórias e são potencialmente aplicados em lesões provocadas por inflamações localizadas (ROCHE, 1999). Estudos demonstraram que a eficácia de tratamentos envolvendo processos inflamatórios, é mais facilmente alcançada quando administrados os AGI w-6 e w-3 em diferentes proporções e, estudos desenvolvidos com o propósito de aperfeiçoar a aplicação destes AGI, sendo verificado que para tais tratamentos o conteúdo de w-3 deve ser superior ao w-6 (SIMOPOULOS et al., 1999).

Inflamações intestinais, doença de Crohn e colite ulcerativa que ocorrem principalmente na faixa etária pediátrica, são de maior ocorrência entre populações que consomem alimentos ricos em ω -6 e pobres em outros nutrientes. Seu tratamento é realizado com a administração ideal de ω -3, porém, sendo também administrado o ω -6, em menor quantidade. Também foi observado que em populações esquimós tal incidência era de menor frequência devido ao consumo de peixe (GRAHAM et al., 2002; BUARRAJ et al., 2004).

Pacientes com depressão e que sofreram algum tipo de desordem cardíaca apresentaram diferença entre a relação ω -3/ ω -6 acentuada, mostrando que tal relação era sempre inferior aos dos pacientes que não tinham passado por algum distúrbio (COLIN et al., 2003; FRASURE-SMITH et al., 2004; LOGAN, 2004). No tratamento da dermatite atópica, a deficiência de AGI e o bloqueio da Δ^6 dessaturase são os principais responsáveis pelo surgimento da enfermidade, devido ao bloqueio da síntese de metabólitos com papel fundamental na manutenção da integridade da pele e também da função imunomoduladora (CASTRO et al., 1995). A combinação com AGI *cis*, como o AGL com tamoxifen, diminui o desenvolvimento de câncer de mama tendo resposta mais rápida ao tratamento, podendo o tumor desaparecer em caso de ser descoberto no estágio inicial (KENNY et al., 2000).

Com tais aplicações e o aumento da preocupação da população com uma dieta alimentar mais saudável, para evitar problemas vasculares e a obesidade na fase adulta, os alimentos funcionais contendo ácidos graxos essenciais e os óleos ricos em AGI *cis* levaram a mudanças alimentares nos Estados Unidos, Europa e Brasil (MONDINI e MONTEIRO, 1994; KRIS-ETHERTON et al., 2000; SANDERS, 2000; VALSTA et al., 2005).

A análise do perfil de ácidos graxos tem sido estudada como importante ferramenta para auxiliar a taxonomia e a classificação filogenética de microrganismos terrestres e simbiontes de plantas (GRAHAM et al., 1995). Os fosfolipídios encontrados em membranas celulares são importantes para descrever a estrutura da comunidade microbiana, que podem ter grandes variações entre os diferentes grupos de organismos, e os modelos de ácidos graxos podem refletir na composição das espécies da comunidade microbiana (RUESS et al., 2002). A composição dos fosfolipídios varia entre os organismos procarióticos e eucarióticos e entre os próprios grupos, sendo estes compostos rapidamente degradados em células mortas, fazendo deles bons indicadores de organismos vivos no solo. Esta característica é importante ferramenta química para a investigação e caracterização de comunidades microbianas (DRENOVSKY et al., 2004).

3.8 Mecanismos para Produção de Ácidos Graxos Insaturados

O aperfeiçoamento de técnicas para a produção de ácidos graxos essenciais por fungos oleaginosos apresenta algumas vantagens sobre o cultivo e produção destes ácidos graxos por plantas oleaginosas, como o menor espaço físico para cultivo de microrganismos, o perfil da produção de AGI são naturalmente altos ou tais microrganismos podem ser induzidos a produzir valores superiores de AGI, pela manipulação do meio de crescimento ou pela manipulação genética nos organismos de interesse (DYAL e NARINE, 2005).

A escolha do inóculo para o cultivo de microrganismos oleaginosos é o primeiro passo para o início do processo de produção de AGI. Algumas espécies são boas produtoras de esporos facilitando o preparo do inóculo para a realização do cultivo. Outras espécies produzem poucos esporos dificultando a obtenção de uma concentração favorável para a realização do cultivo. Neste caso, o preparo de uma suspensão de micélio é mais favorável para a realização do processo de produção de AGI e obtenção de bons resultados (CHEN e LIU, 1977). Tem sido demonstrado que a suspensão de esporos é mais eficiente para processos envolvendo a produção de AGI, bem como, outros metabólitos de origem microbiana. Deve-se levar em consideração o tempo de estocagem do inóculo, portanto, não devendo ser utilizado inóculo armazenado por períodos prolongados de armazenamento (GUI-YOU et al., 2004).

A adição de fontes de carbono e nitrogênio é necessária, tanto em cultivo submerso quanto sólido, para melhorar o crescimento do microrganismo no substrato. Assim, diversos trabalhos têm testado carboidratos e óleos vegetais para acentuar a produção de AGI. Dentre os carboidratos, a glicose tem demonstrado ser a melhor fonte de carbono para este fim, porém, em outros trabalhos, a maltose foi a melhor indutora para formação de biomassa e produção de AGI utilizando linhagens diferentes (BOTHÁ et al., 1997; JEFFERY et al., 1997; CERTIK e SHIMIZU, 1999). Dentre as fontes de nitrogênio têm sido testadas fontes orgânicas e inorgânicas. O extrato de levedura foi demonstrado por diversos trabalhos ser melhor indutor para a produção e acumulação de AGI. Deve-se considerar ainda a relação carbono/nitrogênio (C/N) (IMMELMAN et al., 1997; PUPIN et al., 2000; KOIKE et al., 2001). Esta relação está diretamente ligada à indução ou repressão da enzima *málica* e da *ATP:citrato liase*. Estas enzimas são ativadas quando ocorre decréscimo da concentração de nitrogênio, acentuando a acumulação de AGI, quando o microrganismo entra em fase estacionária do crescimento (RATLEDGE, 2002).

Os ácidos graxos encontrados na membrana celular são responsáveis pelo controle da entrada e saída de nutrientes e metabólitos. A fluidez da membrana plasmática é controlada pela presença de ácidos graxos saturados e insaturados, que a torna mais rígida ou flexível devido à curvatura formada pelas insaturações. A temperatura é o principal fator de regulação do grau de insaturações dos ácidos graxos nos organismos. As temperaturas altas tendem a aumentar a presença de ácidos graxos saturados e temperaturas baixas proporcionam maior número de insaturações (SILVA et al., 1998).

O aumento da temperatura de 10° C para 15° C fez com que o crescimento de cianobactérias e a síntese *de novo* de ácidos graxos cessassem em 10 horas. Neste período, os lipídios da membrana são dessaturados e quando o grau de insaturação atinge certo nível provocado pela regulação da expressão dos genes dessaturases, as células voltam a crescer e sintetizar ácidos graxos (SAKAMOTO e BRYANT, 1997). Quando ocorre elevação da temperatura, o grau de insaturação dos ácidos graxos dos lipídios de membrana diminui, devido à supressão da dessaturação dos ácidos graxos e aceleração da síntese *de novo* de ácidos graxos (MURATA e LOS, 1997).

A demanda de oxigênio durante o processo de cultivo de microrganismos para a produção de AGI é crucial, devido à necessidade das enzimas dessaturases ao oxigênio. Com o aumento gradativo do oxigênio dissolvido é possível observar acréscimo de AGI e um decréscimo no volume de ácidos graxos saturados, sugerindo que as enzimas Δ^9 e Δ^{15} dessaturases possuem prováveis atividades em converter 18:0 para 18:2, via 18:1, com aumento no teor de AGL (ROUX et al., 1995; DU PREEZ et al., 1995). A incorporação de sementes de malte ao substrato sólido destinado ao cultivo de microrganismos aumenta a entrada de oxigênio, promovendo acréscimo na acumulação de AGL e evita a formação de regiões ausentes de oxigênio (STREDANSKY et al., 2000b). Em alguns substratos, após a esterilização, forma-se uma massa compactada que interfere na respiração microbiana e afeta a utilização do substrato pelo microrganismo, sendo que este se desenvolve somente na superfície do substrato. Com a adição de agentes descompactantes, ocorre melhor distribuição do micélio no substrato e conseqüente dessaturação dos ácidos graxos saturados pela enzima Δ^6 dessaturase (CERTIK et al., 2006).

Outros fatores, como atividade de água e pH são importantes para a produção de AGI. A umidade do meio afeta as reações de atividade enzimática em substrato sólido e afeta o processo de produção onde os efeitos podem ser expressos como concentração ou atividade de água, podendo formar forças dipolo-dipolo, ligações iônicas, forças de van der Waals e pontes de hidrogênio, que envolvem moléculas de águas e afetam os processos de

síntese e catálise de ácidos graxos (CHOWDARY e PRAPULLA, 2002; ANTCZAK et al., 2004). As condições de cultivo em diferentes variações de pH têm demonstrado que melhor conversão de ácidos graxos saturados para insaturados ocorre na faixa de pH entre 5,8 a 6,5, em culturas utilizando fungos filamentosos (HIGASHIYAMA et al., 1998). Os conteúdos de ácidos graxos saturados e monoinsaturados tendem a diminuir com a elevação do pH, ocorrendo também aumento de ácidos graxos poliinsaturados (DYAL e NARINE, 2005).

3.9 Concentração de Ácidos Graxos Insaturados em Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos oleaginosos possuem capacidade de acumular 30% de sua biomassa em lipídios (RATLEDGE, 1994). O acúmulo dos lipídios, quando ocorre com a exaustão do nitrogênio do meio de cultivo, converte as fontes de carbono do meio em AGI permitindo que o microrganismo continue se desenvolvendo. A aplicação de técnicas de cultivo promove melhor rendimento do substrato para conversão de fontes de carbono em biomassa e lipídios que podem estar ligados à membrana (lipídios polares) ou de armazenamento (lipídios neutros) (SINGH e WARD, 1997). Os objetivos de trabalhos realizados em cultivo submerso são de aumentar a produção de lipídios e AGI sem que esta esteja diretamente relacionada com a produção de biomassa. Alguns estudos têm obtido importantes resultados, com valores aproximados do encontrado em óleos vegetais (**TABELA 4**).

Estudo comparativo com culturas agitada e estática mostrou que a aeração em cultura agitada promoveu maior produção de biomassa e acúmulo de lipídios totais (LT) (10,6 g.L⁻¹ e 40,4%, respectivamente) comparado com a cultura estática. As diferenças encontradas nas formas de cultivo refletiram na composição de AGI e possibilitaram a aplicação de linhagens selecionadas na obtenção de ácidos graxos de maior interesse na indústria, como substituintes das gorduras animal e vegetal (AGGELIS et al., 1997). Nemeč et al. (1997) observaram que a produção de biomassa, lipídios e ácidos graxos não são proporcionais às taxas de produção de biomassa e LT, sendo observado que o maior valor de ácido linolênico (17,5%) foi encontrado no maior valor de LT; enquanto que o maior valor de AL (58,4%) foi encontrado no menor valor de LT, com valores semelhantes de biomassa produzida.

Tabela 4. Composição de ácidos graxos obtidas de fungos filamentosos em cultivo submerso e sob condições controladas. Legenda: 14:0: ácido mirístico; 16:0: ácido palmítico; 16:1: ácido palmitoléico; 18:0: ácido esteárico; 18:1: ácido oléico; 18:2: ácido linoléico; 18:3: ácido linolênico; 20:4: ácido araquidônico.

Microrganismos	Porcentagem (%)								Referência
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:4	
<i>P. persicinus</i>	3,1	19,4	-	6,8	21,0	35,5	4,7	-	Papacharilaou e Pisano, 1984
<i>M. circinelloides</i>	-	12,4	2,2	8,7	32,1	16,3	28,3	-	Botha et al., 1997
<i>M. inaquisporus</i>	2,0	15,8	-	2,0	20,2	22,2	37,2	-	Emelyanova, 1997
<i>M. alpina</i>	2,4	15,3	-	9,5	49,3	7,2	4,0	9,2	Zhu et al., 2002
<i>M. rouxii</i>	-	14,4	-	5,4	31,6	8,4	13,8	-	Somashekar et al., 2002
<i>M. hiemalis</i>	-	21,7	-	7,4	24,4	17,4	23,4	-	Ahamed et al., 2006

Chaudhuri et al. (1998) estudaram *M. elongata* SC208 utilizando os meios de cultivos tomate dextrose, glicose e mostarda em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Concluíram que nas melhores condições de cultivo, utilizando mostarda, produziu-se 23,2 g.L⁻¹ de biomassa seca, 63,7 mg.g⁻¹ de LT e 33,2% de AA. Higashiyama et al. (1997) estudaram a produção de AA, cultivando *M. alpina* em fermentador industrial. Nesse estudo obtiveram 50,6 g.L⁻¹ de biomassa produzida, 24,2 g.L⁻¹ de LT e 10,9 g.L⁻¹ de AA, com aumento de 45,0% do conteúdo de ácidos graxos totais com oito dias de cultivo. Carvalho et al. (1999) estudaram a linhagem *Mucor* sp. LB-54 adicionando glicose ao meio de cultivo e na temperatura de 28° C por 144 horas e 12° C durante 72 horas. Observaram que a produção de biomassa foi de 6,3 g.L⁻¹, a produção de lipídios foi de 1,6 g.L⁻¹ (25,1%) e produção de AGL foi de 74,1 mg.L⁻¹ (19,40%), mostrando o efeito da diminuição da temperatura durante o período de cultivo.

Eroshin et al. (2000), durante o cultivo de *M. alpina* em meios contendo uréia como fonte de nitrogênio sob cultivo contínuo, mostraram a especificidade de produção de crescimento e produção de AA em 0,03 h⁻¹. Nesse estudo foi observada produção de biomassa de 15,6 g.L⁻¹, porcentagem de lipídios na biomassa seca de 12,8%, produção de AA de 19,2 mg.L⁻¹.h⁻¹ (32,0% dos LT e 4,1% da biomassa seca). Somashekar et al. (2002) estudaram a produção de AGL utilizando diferentes fontes de nitrogênio, carboidratos e óleo de gergelim em cultivo submerso. Observaram que o KNO₃ foi a melhor fonte de nitrogênio para induzir a produção de LT (32,0% em seis dias). Concluíram que o melhor indutor para a produção de AGL foi (NH₄)₂SO₄, o qual foi obtido 16,3% contra 13,8% para KNO₃.

Papanikolaou et al. (2004) estudaram a produção de AGL utilizando altas concentrações de açúcar e controlando a relação de C:N no meio de cultivo utilizando *M. isabelina*. Observaram a produção de biomassa de 35,9 g.L⁻¹, acumulação de lipídios de 0,2 g.g⁻¹ de glicose e produção de 801,0 mg.L⁻¹ de AGL e 19 mg de AGL.g⁻¹ de biomassa. Jang et al. (2005), utilizando *M. alpina*, estudaram o efeito da adição de 1% de óleo de soja ao meio de cultivo utilizando glicose e amido solúvel como fontes de carbono. Avaliaram também a produção de AGI da família *w-6*. Concluíram que a adição de amido solúvel (60 g.L⁻¹) foi mais eficiente para produção de AA (3750,9 mg.L⁻¹ e 55,01%) e, a adição de 80 g.L⁻¹, foi melhor para produção de AEP (36,8 mg.L⁻¹ e 0,57%). A produção de biomassa para ambas as concentrações, porém, foi de 23,0 g.L⁻¹ e a produção de ácidos graxos totais de 6819,1 e 6451,7 mg.L⁻¹, respectivamente.

Ahmed et al. (2006) estudaram várias linhagens de fungos filamentosos para produção de AGL utilizando cultivo submerso com glicose e extrato de levedura como meio de cultivo. Concluíram que a linhagem *Mucor* sp. RRL001 foi a melhor produtora de biomassa (13,4 g.L⁻¹), maior acumuladora de LT (5,8 g.L⁻¹) e produtora de AGL (431,2 mg.L⁻¹). A porcentagem de AGL nos LT foi menor para outras linhagens (9,1%). Zhu et al. (2006) estudaram a produção de AA em sistema alimentado controlando o tempo de cultivo, o consumo de glicose, a produção e a acumulação de lipídios na biomassa. Observaram que as melhores condições de cultivo para produção de AA foram adições de glicose de 20 g.L⁻¹dia e de 1,5 g.L⁻¹dia de nitrato. A glicose residual foi de 1,0 g.L⁻¹ após o cultivo. A produção de biomassa foi de 37,0 g.L⁻¹ e produção de lipídios na biomassa de 14,2 g.L⁻¹ (38,4%). A produção de AA foi de 7,7 g.L⁻¹ (54,5%), sendo o experimento realizado com 192 horas de cultivo.

A determinação da composição de AGI em cultivos utilizando substratos sólidos não pode seguir os mesmos parâmetros utilizados para a determinação desses em cultivos submersos. Isto devido à presença de ácidos graxos nos substratos utilizados para os cultivos, que devem ser considerados antes da realização do experimento (EMELYANOVA, 1996). Estudo realizado por esse autor utilizando *C. japonica* em substratos trigo, cevada, milho e arroz, demonstrou que, consideráveis diferenças na composição inicial de ácidos graxos foram observadas em todos os substratos, juntamente com redução do peso final do substrato cultivado. A quantificação do perfil de AGI foi realizada a partir da extração dos LT do substrato cultivado (substrato + biomassa fúngica). No estudo, foi observado incremento de 33,0% de AL e de 22,9% de AGL, no substrato milho suplementado com peptona.

Concluiu-se que a composição de AGI não foi dependente do substrato no qual o fungo foi cultivado.

Stredansky et al. (2000b) estudaram o efeito do crescimento de *T. elegans* em polpa de maçã incrementada com óleo de amendoim e rotação de 0,5 rpm ou aeração constante de 100 mL.min⁻¹, por 192 horas de cultivo a 24° C. Os resultados desse estudo, quando analisado o efeito da extração do substrato úmido e seco foram a obtenção do óleo na massa seca de 21,2%; conteúdo de AGL nos ácidos graxos totais de 9,1% (p/p), conteúdo de AGL em substrato úmido de 3,5 g.Kg⁻¹ e obtenção de AGL em substrato seco de 8,8 g.Kg⁻¹. Concluíram que esta técnica é aplicável para o enriquecimento de subprodutos com AGL a partir de óleos fúngicos, utilizando resíduos de indústrias alimentícias podendo-se comparar com o cultivo submerso. Em outro trabalho, Stredansky et al. (2000a) estudaram o efeito do crescimento de *P. ultimum* MUCL 16164 para produção de AEP e AA utilizando óleos de coco, de amendoim, de girassol e de linhaça suplementados com cevada e sementes de malte, durante 216 horas de cultivo e em temperatura de 21° C. Observaram que, no tratamento utilizando óleo de linhaça, cevada e semente de malte, o teor de LT na biomassa seca foi de 24,4%. A produção de AEP foi de 3,6 g.Kg⁻¹ (7,9%) e de AA foi de 2,7 g.Kg⁻¹ (5,9%). Concluíram que o processo de CSS permite não só a produção satisfatória, mas também, substancial redução do tempo de cultivo e volume dos frascos utilizados no processo.

Conti et al. (2001) estudaram a produção de AGL utilizando várias linhagens da ordem Mucorales e os substratos como cevada, milho, trigo e arroz. Avaliaram o efeito da temperatura, umidade, composição do substrato e estudos preliminares em escala piloto. Observaram que a melhor produção de AGL ocorreu utilizando-se semente de malte, cevada e óleo de amendoim (5:15:0,5) com o fungo *C. elegans* CCF 1318 em temperatura de 21° C e umidade do meio de 66,7%, por 168 horas. Nestas condições, obteve-se 15,9% de óleo no substrato cultivado, 13,4 mg.g⁻¹ de AGL no substrato seco o que corresponde a 13,8%. Gema et al. (2002) utilizaram casca de laranja cultivado com *C. echinulata* para a produção de AGL, destinando-o à produção de ração animal. No experimento, ocorreu incremento de 0,5 g.Kg⁻¹ (NH₄)₂SO₄ + 10 g.Kg⁻¹ de glicose, sob temperatura de incubação de 28° C, houve produção de 12,6 mg.10g⁻¹ de AGL do substrato seco, correspondendo a 5,6% do AGL no óleo total que correspondeu a 22,3 mg.g⁻¹ do peso seco do substrato.

Ilyemi et al. (2006) estudaram o efeito do crescimento de cinco linhagens de fungos filamentosos em torta de sementes de palma, com objetivo de avaliar as mudanças na composição de carboidratos, aminoácidos, proteínas e ácidos graxos no substrato. Observou-

se que o aumento de proteína do substrato utilizando *T. longibrachiatum* foi de 79,4%, com aumento real de proteínas de 45,7%. O conteúdo de aminoácidos foi de 0,49 g.100g⁻¹ do substrato enriquecido com metionina, 0,41 g.100 g⁻¹ do substrato enriquecido com lisina, 3,5 g.100g⁻¹ do substrato enriquecido com cisteína e 1,4 g.100g⁻¹ do substrato enriquecido com isoleucina. Quanto ao conteúdo de hemicelulose e celulose, houve decréscimo de 48,7% com decréscimo real de 57,2% da hemicelulose utilizando *A. niger* e decréscimo 56,5% da celulose, com decréscimo real de 64,7% utilizando *T. longibrachiatum*. Quanto ao conteúdo de ácidos graxos, foi observado aumento tanto de ácidos graxos saturados como insaturados. Em todas as linhagens, portanto, utilizadas no experimento, foi observado decréscimo no conteúdo de ácido mirístico. O maior aumento dentre os ácidos graxos foi observado entre o AO (40%). No conteúdo de AL o aumento foi de 25,6% e no conteúdo de AGL o incremento foi de 0,6%. Concluíram que o processo de CSS utilizando torta de sementes de palma melhora os valores nutricionais do substrato podendo ser utilizado como ingrediente para alimentação animal.

Certik et al. (2006) utilizaram dez linhagens de fungos filamentosos dentre eles *Thamnidium*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Mortierella* e *Rhizopus*. Em estudo preliminar, foi realizada a triagem da melhor linhagem para produção de AGL em cultivo submerso, utilizando cevada e flocos de aveia. Observaram que a melhor linhagem para produção e acumulação de lipídios foi *M. isabelina* CCF-14 e CCF-127 (10,4 e 2,8% do bioproduto). A melhor produtora de AGL foi *T. elegans* CCF-1465, a qual foi obtida 4,82 g.Kg⁻¹ de bioproduto (6,6%). A linhagem foi utilizada para os CSS utilizando vinte e oito formas de substratos. Observaram que, após quatro dias de cultivo em temperatura de 24° C, houve produção de AGL em todos os substratos testados, sendo que não foi detectado na triagem prévia dos substratos não cultivados. Os melhores substratos foram farelo de trigo + sementes de malte (3:1), flocos de sementes de trigo + sementes de malte (3:1) e milho + sementes de malte (3:1). Nestes substratos foram encontrados 4,96 g AGL.Kg⁻¹ bioproduto (14,3%), 7,23 g AGL.Kg⁻¹ bioproduto (13,1%) e 6,5 g AGL.Kg⁻¹ bioproduto (12,7%). Concluíram que o enriquecimento de substratos a base de cereais com AGL utilizando fungos filamentosos deve-se criar novas perspectivas para o enriquecimento nutricional com AGI devendo esta técnica ser focada para estudos em grandes escalas, desenvolvendo-se modelos de produção em biorreatores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

As linhagens de *Mucor circinelloides* avaliadas neste presente estudo foram isoladas de solo de área de caatinga (linhagem M1) (SIMÕES, 2006) e de cerrado (linhagem M2) (isolada e identificada pelo Dr. Marcelo J. Silveira Rügger e cadastrada como linhagem 122C). As amostras compostas de solo foram obtidas através de coletas com três repetições (sub amostras) para cada uma delas, retiradas de 0 a 15 cm de profundidade, eliminando-se a serapilheira. Cada amostra de solo foi homogeneizada e em seguida colocada em saco de polietileno. Os microrganismos foram cultivados em meio ágar aveia, por 120 horas a 28 °C, sendo posteriormente as culturas liofilizadas e mantidas a -4 °C no laboratório de

Microbiologia, do Centro de Estudos Ambientais da Unesp, campus de Rio Claro - SP. A espécie foi selecionada por ser boa produtora de ácidos graxos insaturados, em especial, o ácido gama-linolênico (du PREEZ et al., 1997; IMMELMAN et al., 1997).

4.2 SELEÇÃO DA MELHOR LINHAGEM ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

4.2.1 Padronização do Inóculo

À superfície dos tubos contendo, individualmente, colônias das linhagens M1 e M2 crescidas em meio ágar extrato de malte a 28 °C, durante 168 horas, foram adicionados 5mL de solução salina (NaCl 0,85%), sendo posteriormente suavemente raspada com estilete estéril para obtenção de esporos. A suspensão foi filtrada sendo determinada a concentração de esporos do filtrado em câmara de Neubauer. À suspensão, quando necessário, foi ajustada de modo que a contagem de esporos ficasse próxima a 1.10^7 esporos.mL⁻¹, concentrando-a com mais inóculo ou diluindo-a com solução salina (NaCl 0,85%).

A suspensão de micélio foi preparada cultivando as linhagens M1 e M2 durante 72 horas em meio líquido de sais de Vogel (1956) utilizando glicose como fonte de carbono na concentração de 2% e extrato de levedura como fonte de nitrogênio na concentração de 1%. O micélio foi filtrado a vácuo utilizando funil de Büchner e papel filtro Wathman no. 1. O micélio úmido foi pesado utilizando balança analítica nas concentrações 0,2, 0,5, 0,7 e 1,0 g. O procedimento ocorreu em condições assépticas de preparo.

Para a preparação do meio líquido de sais de Vogel (1956), utilizou-se uma solução de elementos traços em água destilada acrescido de 1,0 mL de clorofórmio como agente antimicrobiano.

Solução de elementos traços:

Ácido cítrico · H ₂ O	5,00 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O.....	5,00 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	1,00 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0,005 g
H ₃ BO ₃	0,005 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O.....	0,005 g
Água destilada qsp	100 mL

A solução de sais de Vogel foi preparada pela dissolução dos sais abaixo relacionados, em água destilada.

Citrato de sódio · 5H ₂ O	15,00 g
KH ₂ PO ₄	25,00 g
NH ₄ NO ₃	10,00 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,00 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,50 g
Solução de Biotina (0,1 mg.mL ⁻¹)	0,50 g
Solução de traços de elementos.....	050 g
Água destilada qsp	100 mL

Para a preparação do meio de cultura a solução de sais de Vogel foi diluída 50 vezes com água destilada (v/v) e suplementada com fontes de carbono.

4.2.2 Cultivo de *Mucor circinelloides* pelo Método Turbidimétrico Automatizado – Labsystems Bioscreen C, em Diferentes Meios de Cultura e pH

O aparelho Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finlândia) consiste de um espectrofotômetro contendo duas câmaras (placas) estéreis, cada uma contendo 100 células de cultivo, onde os microcultivos são realizados, produzindo turbidez proporcional ao crescimento fúngico no meio de cultura utilizado. Esse equipamento permite que sejam pré-

determinados os seguintes parâmetros cinéticos: comprimento de onda para leitura das densidades ópticas (DO), tempo de cultivo, tipo e frequência de agitação das células e frequência das leituras de absorvâncias das células. O software converte automaticamente as medidas da absorvância em curvas de crescimento que são analisadas em um computador acoplado.

O meio de cultura base utilizado foi solução salina (NaCl 0,85%) e meio de sais de Vogel (VOGEL, 1956), adicionado de extrato de levedura a 1%, sendo distribuídos em vidros de penicilina e acrescido individualmente das seguintes fontes de carbono a 2% (p/v): frutose, maltose, galactose, glicose e sacarose. Os vidros foram selados, etiquetados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min, como os demais instrumentos utilizados no processo.

Foram adicionados individualmente às células da câmara de cultivo, 40 µL de suspensão de esporos na concentração de 1.10^7 esporos.mL⁻¹ do fungo analisado e 360 µL das referidas fontes de carbono, em quadruplicata. As células controle foram constituídas apenas de 400 µL de cada fonte de carbono. As placas foram colocadas nas câmaras do Bioscreen C e este foi então calibrado para que operasse segundo os seguintes parâmetros: temperatura 28 °C, leitura de absorvância a 540 nm (comprimento de onda previamente determinado), intervalo entre as leituras de 2 horas, tempo total do experimento de 96 horas, agitação média das células de 1min antes de cada leitura. As leituras de densidade ópticas (OD) automáticas foram enviadas para computador acoplado, no qual os resultados foram obtidos após as 96 horas, sendo então determinadas as curvas de crescimento das linhagens de *M. circinelloides* nas referidas fontes de carbono. O experimento foi realizado em cultivos com pH 5,0 e 5,8.

4.2.3 Produção de Biomassa e Lipídios Totais por Cultivo Submerso (CSm)

A produção de biomassa foi avaliada em frascos de 125 mL, contendo 50 mL de meio de sais de Vogel (VOGEL, 1956), juntamente com extrato de levedura 1% como fonte de nitrogênio e com glicose ou maltose, como fonte de carbono na concentração de 1%, em pH 5,8. Foram adicionados, individualmente, aos frascos 5,0 mL de solução de esporos na concentração 1.10^7 esporos.ml⁻¹, em triplicata. O experimento foi realizado utilizando-se também micélio como inóculo, sendo adicionados individualmente aos frascos contendo meio e fonte de carbono conforme descrito anteriormente 0,2; 0,5; 0,7 e 1,0 g de micélio úmido, em triplicata.

Os frascos permaneceram sob agitação a 150 rpm, a 25 °C, por 72 horas. As biomassas das linhagens foram obtidas através de filtração a vácuo em papel filtro Whatman no.1, e colocadas em estufa a 65 °C até obtenção do peso constante, determinado gravimetricamente em balança analítica.

4.2.4 Extração dos Lipídios Totais

Os lipídios totais foram determinados segundo método de Folch et al. (1957). A biomassa foi colocada em frascos âmbar com tampa. Foram adicionados 5,0 mL de clorofórmio e 2,5mL de metanol e deixou-se a temperatura ambiente por 24 horas, com agitação ocasional. A esta fração foi adicionado um quarto do volume total de solução salina KCl 0,85%, ocorrendo a separação das fases. A fase inferior contendo clorofórmio foi cuidadosamente removida com pipeta de Pasteur e transferida para um tubo de ensaio âmbar com tampa, previamente tarado. O solvente foi removido em atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente, os tubos foram colocados em dessecador sob vácuo até obtenção do peso constante, posteriormente foram pesados em balança analítica.

A determinação dos ácidos graxos insaturados foi realizada em cromatografia gasosa descrita nas seções 4.3.2 e 4.3.3.

4.2.5 Cultivo de *M. circinelloides* (linhagem M1) em Cultivo em Substrato Sólido (CSS)

Os substratos sólidos usados foram farelo de trigo (modificado de YOSHIOKA et al., 1981), farinha de soja, casca de mandioca, polpa cítrica e bagaço de cana-de-açúcar. Para o preparo do meio farelo de trigo e farinha de soja foram adicionados, individualmente, 5 g dos substratos sólidos e 5 mL de água destilada em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Os meios foram homogeneizados, sendo os frascos tampados e esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 min. Os frascos foram inoculados com 1mL de suspensão de esporos 1.10^7 e incubados a 25 °C por 168 horas. Foi adicionado extrato de levedura na concentração de 1% nos substratos farelo de mandioca, polpa cítrica e bagaço de cana-de-açúcar, após

experimento realizado com a adição de 5,0 mL de água e não verificado crescimento nestes substratos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.2.6 Determinação do pH dos Substratos Sólidos

Dos substratos utilizados para os cultivos, 10 g foram adicionados em frascos de Becker de 500 mL e adicionado 100 mL de água destilada aquecida. Agitou-se por 30 min com auxílio de agitador magnético e mesa agitadora deixando em repouso por 15 min. O pH foi medido com pH-metro eletrônico.

4.3 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS E ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS EM CSS

4.3.1 Extração de Lipídios nos Substratos Cultivados

A massa completa cultivada (biomassa mais substrato residual) foi seca até a obtenção de peso constante, por gravimetria a 65 °C em estufa de secagem, triturada e moída com o auxílio de almofariz e pistilo (STREDANSKI et al., 2000).

A fração de lipídio foi extraída seguindo a técnica de Folch et al. (1957), utilizando-se clorofórmio – metanol (2:1 v/v), além das modificações propostas por Christie (1982). Além destas modificações, outras foram efetuadas para adequação dos substratos à metodologia, pois este procedimento foi desenvolvido originalmente para extração de lipídios de tecidos animais.

A biomassa cultivada e seca foi colocada em Erlenmeyer de 250 mL com tampa, adicionando-se inicialmente 20 mL de metanol. A homogeneização foi realizada por cerca de 15 min em mesa agitadora (agitação vigorosa). Após esta etapa, foram adicionados 40 mL de clorofórmio e a agitação foi efetuada por 30 min. A mistura foi filtrada a vácuo e o resíduo sólido ressuspendido em 40 mL da solução de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v) e homogeneizado por 30 min. Após a filtração, o sólido foi lavado mais uma vez com 20 mL de clorofórmio e com 10 mL de metanol. Os filtrados combinados foram transferidos para um funil de separação e, $\frac{1}{4}$ do volume total foi adicionado de uma solução de KCl 0,85%. A

mistura foi agitada vigorosamente e levada ao repouso. A fase inferior, ou seja, o extrato de clorofórmio contendo os lipídios foi removido para um frasco âmbar com tampa de 200 mL, sendo recolhido em papel filtro com cloreto de cálcio anidro (remoção de traços de água). O filtrado foi concentrado a vácuo em evaporador rotativo a 40-45 °C, sendo o solvente recuperado e destilado.

O concentrado foi cuidadosamente transferido, com pipeta de Pasteur, para frascos âmbar de 5 mL com tampa, previamente tarado. O solvente restante foi removido em atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram levadas para dessecador com sílica gel, mantido a vácuo, e pesadas em balança analítica até a obtenção do peso constante.

4.3.2 Preparação dos Ésteres Metílicos dos Ácidos Graxos

A determinação da composição de ácidos graxos dos lipídios por cromatografia gasosa é precedida por esterificação ou transesterificação para formar os ésteres metílicos que aumentam a volatilidade destes compostos e proporcionam análises mais adequadas. Foi utilizada a esterificação e transesterificação catalisada por base.

A amostra de lipídios, contida em tubo de vidro de cor âmbar com capacidade de 5 mL e com tampa, foi dissolvida e adicionada de 100 µL de solução de hidróxido de sódio metanólico 2M. A mistura foi agitada por 30 s e deixada em repouso por 30 min, sendo posteriormente adicionada 100mg de cloreto de cálcio anidro e a amostra centrifugada a 4000 rpm por 8 min. A fase superior foi injetada no cromatógrafo a gás.

4.3.3 Análise da Composição de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa

Após a metilação das amostras de lipídios totais dos microrganismos, os ésteres metílicos foram analisados por cromatografia gasosa. A cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo a gás marca Finnigan – Tometrics, modelo 9001, em coluna FFAP (free fatty acid polimerase) megabore de 30m com filme de 1µm, com as seguintes especificações: fluxo de hidrogênio = 20 mL min⁻¹; fluxo de nitrogênio = 25 mL min⁻¹; fluxo de ar sintético = 175

mL min⁻¹; gás de arraste = hidrogênio; pressão de trabalho = 4 psi; temperatura do injetor = 210 °C; temperatura do detector = 250 °C; divisão da amostra = 10:1; temperatura da coluna de 50 °C por 1 min., com programação de 45 °C por minuto até 190 °C mantendo por 1 minuto, seguindo 2 °C por minuto até 196 °C mantendo por 2 min. e 10 °C por minuto até 336 °C mantendo por 3 min.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por integração dos componentes da amostra com os dos padrões autênticos dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (marca Sigma) através do programa Borwin instalado ao computador acoplado ao cromatógrafo.

4.3.4 Análise por padronização externa

Foram preparadas amostras para calibração contendo concentrações diferentes do padrão do éster metílico do ácido oléico (AO 18:1 n9), ácido linoléico (AL 18:2 n6), ácido gama-linolênico (AGL 18:3 n6) e ácido araquidônico (AA 20:4 n6), que foram injetadas no cromatógrafo. Após identificação das respectivas áreas dos picos, determinou-se a equação da reta colocando-se a concentração na abscissa e a área dos picos na ordenada (CIOLA, 1985). Para o ácido oléico a equação foi $y = 4413.6x - 209721$ e o $R^2 = 1$; ácido linoléico a equação foi $y = 3495.1x - 80915$ e o $R^2 = 1$; ácido gama linolênico a equação foi $y = 2895.4x - 113521$ e o $R^2 = 0,9983$ e o ácido araquidônico a equação foi $y = 2608.8x - 90541$ e o $R^2 = 0,9987$. O perfil dos ésteres metílicos dos ácidos graxos estão representados na **Figura 6**.

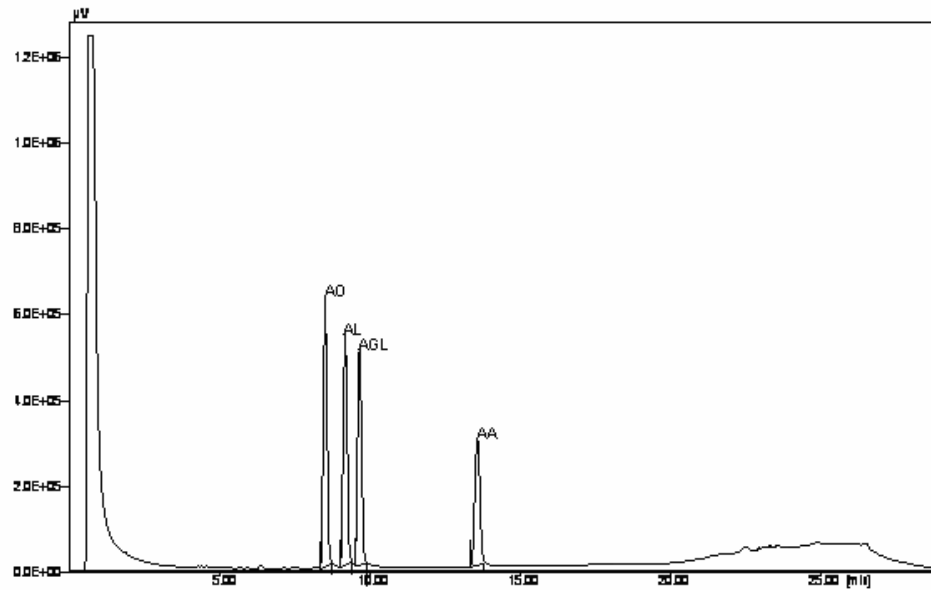


Figura 6. Perfil dos padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos a partir de cromatografia gasosa.

4.4 SUPLEMENTAÇÃO DOS CULTIVOS EM SUBSTRATO SÓLIDO, COM FONTES DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

Foram utilizadas fontes de carbono como suplementos dos substratos usados: glicose, maltose, óleo de gergelim, óleo de girassol e óleo de canola, adicionadas na concentração de 2% (p/p). Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250mL contendo 5 g de farinha de soja como substrato para o desenvolvimento da biomassa fúngica e incubados a 25 °C, por 144 horas. Além deste cultivo outros foram realizados acrescentando aos meios de cultura as fontes de carbono que melhor contribuiriam para o crescimento dos microrganismos como a glicose, óleo de canola e óleo de gergelim. Estes suplementos foram adicionados aos meios de cultura contendo farinha de soja nas proporções: óleo de canola/óleo de gergelim 2% (1:1 p/p); óleo canola/glicose 2% (1:1 p/p), óleo de gergelim/glicose 2% (1:1 p/p), óleo de canola/óleo de gergelim 4% (1:1 p/p), óleo de canola/glicose 4% (1:1 p/p), óleo de gergelim/glicose 4 % (1:1 p/p), óleo de canola/óleo de gergelim/glicose 4% (1:1:2 p/p) e óleo canola/óleo de gergelim/glicose 6% (1:1:1 p/p) e incubados a 25 °C, por 144 horas.

4.5 ADIÇÃO DA CASCA DE ARROZ AO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

A fim de melhorar a aeração no interior do substrato sólido (farinha de soja), foi adicionada ao meio de cultivo casca de arroz como agente descompactante nas seguintes proporções: 3:1, 3:2 e 3:3 (p/p). Foram realizados dois cultivos, o primeiro acrescentando somente casca de arroz sem adição de suplementos carbônicos e, um segundo acrescentando casca de arroz acrescido de suplementação de fonte de carbono óleo de canola e óleo de gergelim a 2% na proporção de 1:1 (p/p), sendo mantidos a 25 °C por 144 horas, em triplicata.

4.6 EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS NO CULTIVO DE *M. circinelloides* (LINHAGEM M1), PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

Foi verificado o efeito de diferentes temperaturas de incubação na produção de AGI. A linhagem foi incubada nas temperaturas de 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C utilizando farinha de soja + casca de arroz (3:2 p/p) suplementado com 2% de óleo de canola e óleo de gergelim na proporção 1:1 (p/p) por 144 horas, em triplicata.

Outro experimento foi realizado após a determinação da melhor temperatura de cultivo para produção de AGI de acordo com Carvalho (1999) e Jang et al. (2000). A linhagem M1 foi cultivada por 144 horas em farinha de soja + casca de arroz (3:2 p/p) suplementado com 2% de óleo de canola e óleo de gergelim na proporção 1:1 (p/) utilizando temperatura de incubação de 20 °C. Após este período, a temperatura de incubação alterada para 12 °C e mantida por 24 horas. Em seguida, a massa cultivada foi mantida em temperatura de 65 °C até obtenção do peso constante por gravimetria, conforme descrito na seção 4.3.1..

4.7 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ESPOROS SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

A suspensão foi filtrada sendo determinada a concentração de esporos do filtrado em câmara de Neubauer. À suspensão, quando necessário, foi ajustada de modo que a contagem de esporos ficasse próxima a 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos.mL⁻¹, sendo preparada conforme seção 4.2.1, concentrando-a com mais inóculo ou diluindo-a com solução salina (NaCl 0,85%).

4.8 INFLUÊNCIA DA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *M. circinelloides* SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

Após todos os passos da otimização para produção de AGL ter sido efetivado, foi realizado um experimento com intervalos de crescimento de 72, 96, 120 e 144 horas a 20 °C, após sendo mantido a 12 °C por 24 horas, utilizando-se 5 g do substrato farinha de soja acrescido de casca de arroz na proporção 3:2, suplementado com óleo de canola/óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) com umidade em torno de 70% e pH 5,9.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos em triplicata foram tratados utilizando-se análise de variância com modelo tipo fatorial e para as médias foi aplicado teste de Tukey, com nível de 5% de significância através do sistema computacional SAS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo de *Mucor circinelloides* pelo Método Turbidimétrico Automatizado – Labsystem Bioscreen C, em Diferentes Meios de Cultura e pH.

Os melhores crescimentos das linhagens de *M. circinelloides* estão representados nas **Figuras 7 a 14**, contendo as curvas de crescimentos obtidas em sistema automatizado.

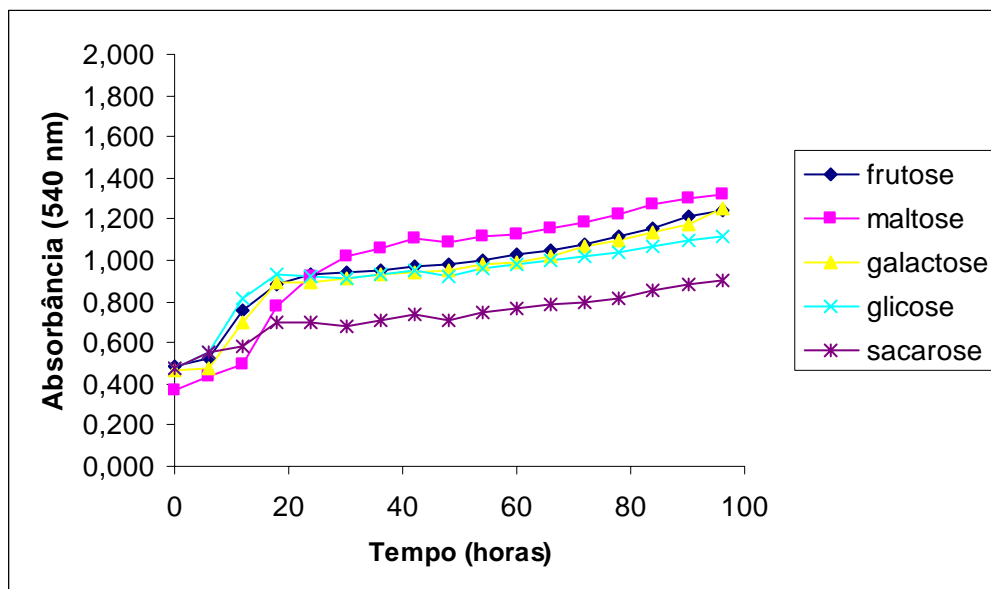


Figura 7. Curva de crescimento da linhagem M1 em meio de solução salina (NaCl) 0,85%, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,0, a 28 °C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreen C.

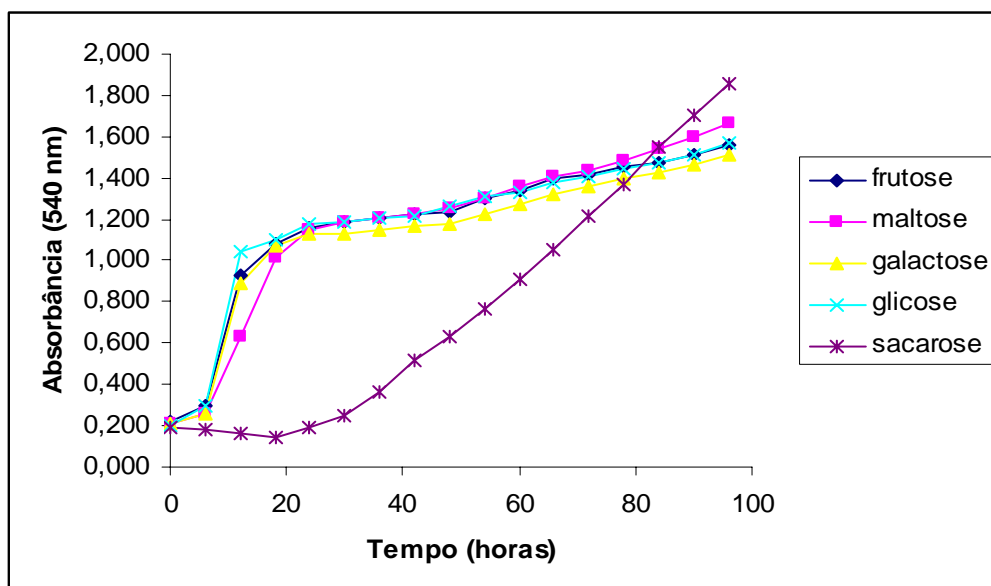


Figura 8. Curva de crescimento da linhagem M1 em meio de Vogel, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,0, a 28 °C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreen C.

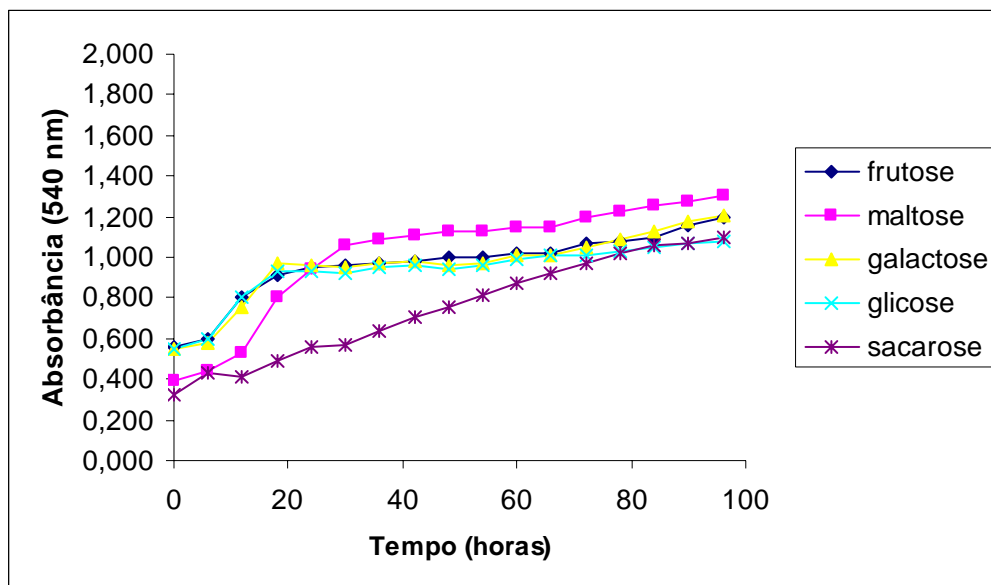


Figura 9. Curva de crescimento da linhagem M1 em meio de solução salina (NaCl) 0,85%, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,8, a 28 °C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreen C.

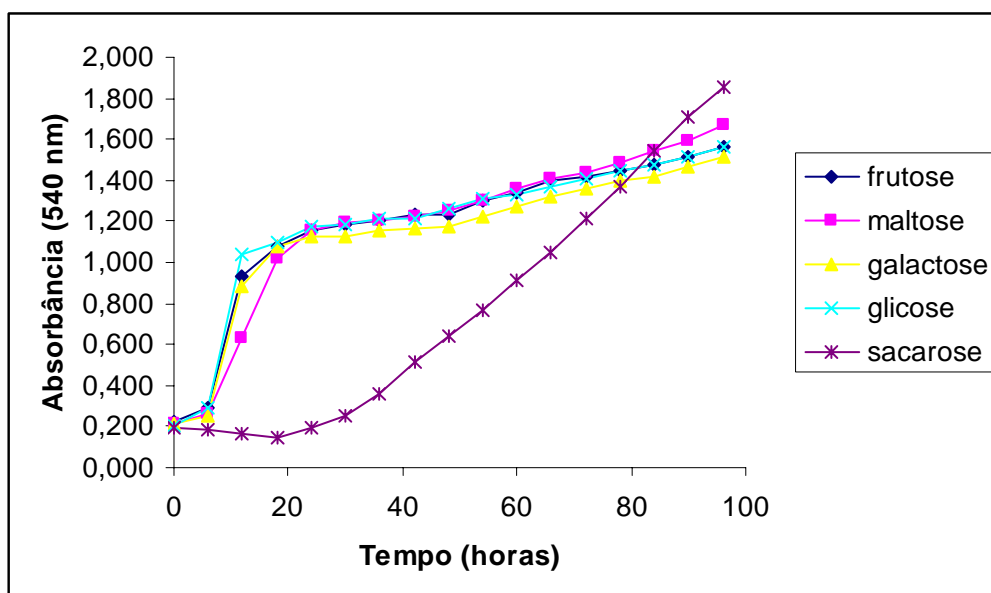


Figura 10. Curva de crescimento da linhagem M1 em meio de Vogel, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,8, a 28 °C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreen C.

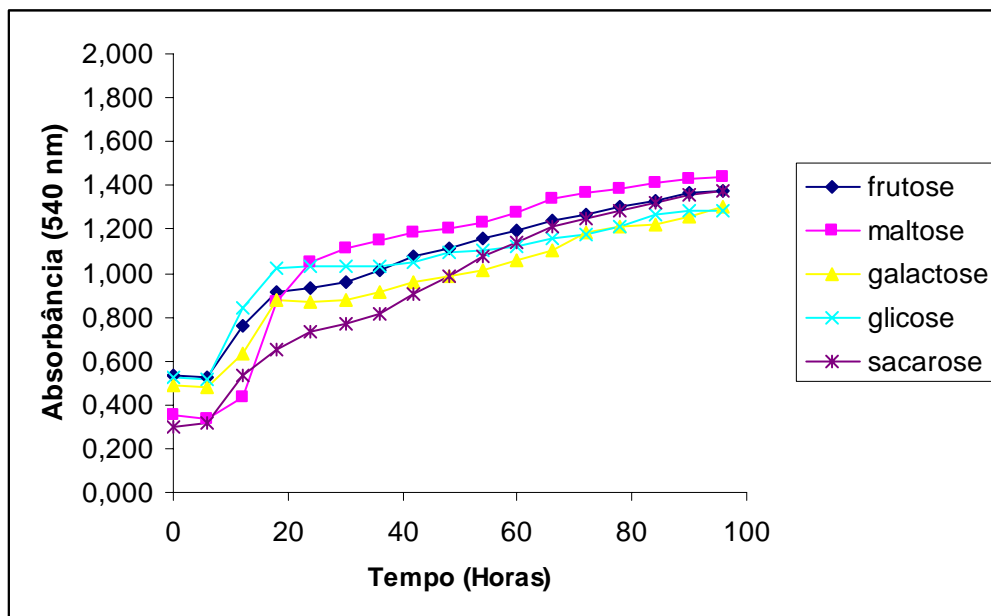


Figura 11. Curva de crescimento da linhagem M2 em meio de solução salina (NaCl) 0,85%, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,0, a 28 °C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreen C.

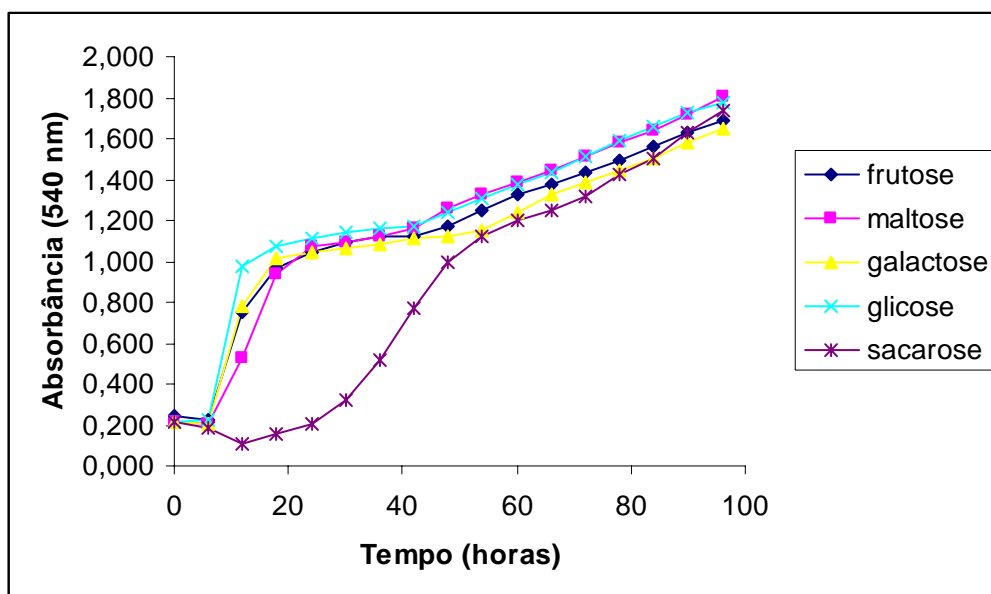


Figura 12. Curva de crescimento da linhagem M2 em meio de Vogel, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,0, a 28 °C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreen C.

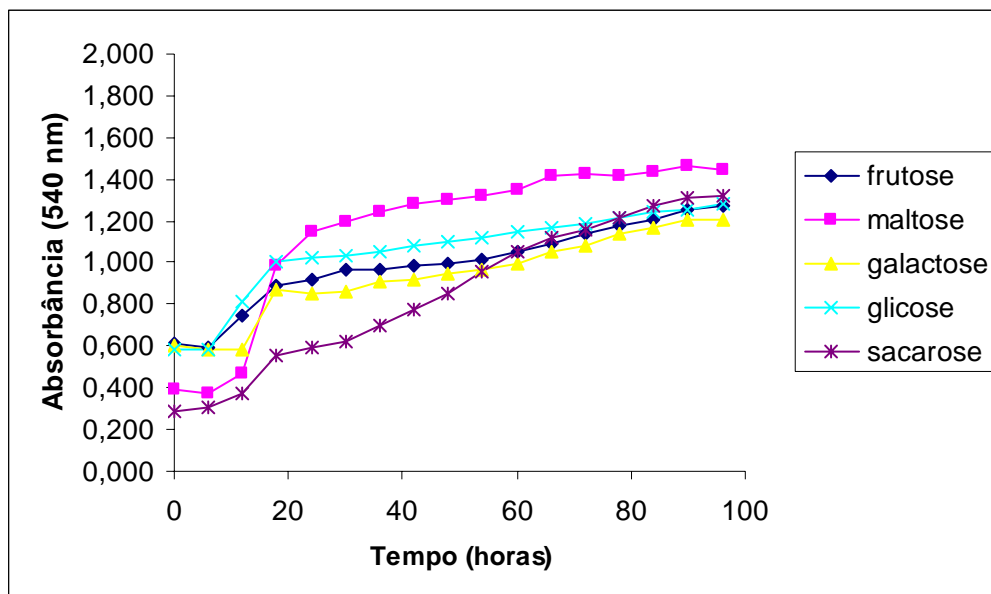


Figura 13. Curva de crescimento da linhagem M2 em meio de solução salina (NaCl) 0,85%, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,8, a 28 °C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreen C.

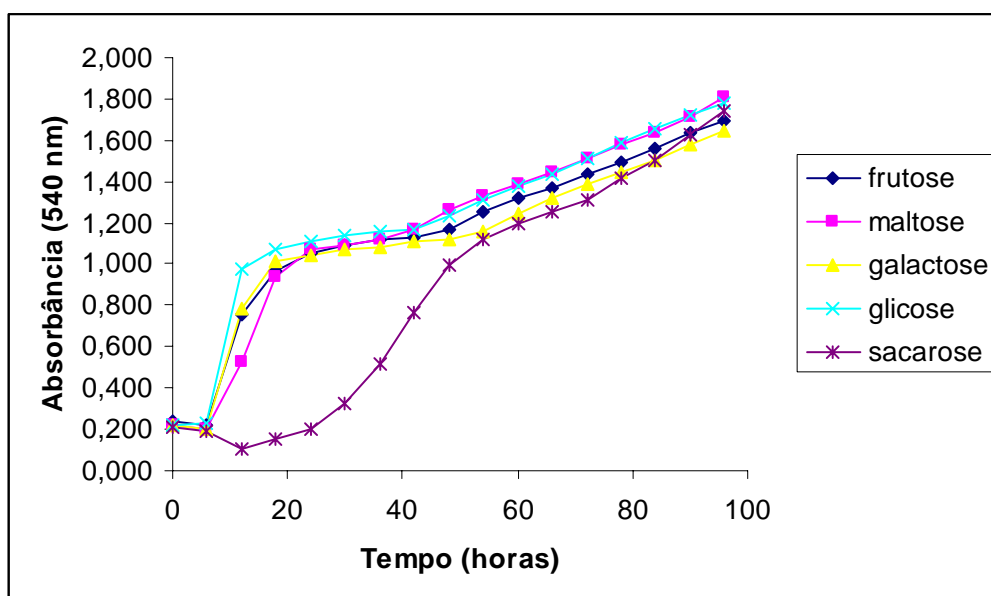


Figura 14. Curva de crescimento da linhagem M2 em meio de Vogel, contendo fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e pH 5,8, a 28 °C, por 96 horas em sistema automatizado Bioscreen C.

Os resultados demonstram que o crescimento das linhagens foi distinto para cada fonte de carbono utilizada, porém, não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens durante a repetição do experimento tanto em pH 5,0 quanto em pH 5,8. A adição de maltose aos cultivos induziu a maior formação de biomassa nos dois valores de pH utilizados e para os dois tipos de meios empregados, para os cultivos das linhagens M1 e M2, após 96 horas. A velocidade para formação de biomassa foi maior com glicose dentro da fase logarítmica de crescimento (12-30 h). Simões e Tauk-Tornisielo (2005a) relataram que a maltose foi também melhor para produção de biomassa nos cultivos das linhagens de *Aspergillus niger* e *A. aculeatus* e a glicose naqueles das linhagens de *A. niger* 1, *Fusarium oxysporum* 17 e *Emericellopsis mínima* linhagens 22 e 26. Este mesmo efeito da glicose foi citado ainda por vários autores (MARGOLLES-CLARK et al., 1997; GAWANDE e KAMAT, 2000; MELETIADIS et al., 2001; ANDRADE et al., 2002), pelo fato de ser facilmente metabolizável, porém, nos resultados encontrados situou-se como a segunda melhor fonte de carbono para produção de maior quantidade de biomassa das linhagens aqui estudadas, juntamente com a frutose, ambas não superando os resultados apresentados pela maltose.

Os resultados demonstraram que a sacarose foi a terceira melhor fonte de carbono para a produção de biomassa da linhagem M1 estudada, quando cultivadas em meio de saís de Vogel com pHs 5,0 e 5,8 (**FIGURAS 8 e 10**). Simões e Tauk-Tornisielo (2005a) relataram que a sacarose foi a segunda melhor fonte de carbono para o crescimento de fungos filamentosos do solo de área de caatinga, porém observaram que a melhor fonte de carbono no cultivo destes foi o xilano (SIMÕES e TAUK-TORNISIELO, 2005b).

Estudos comparativos, utilizando método tradicional de cultivo em frascos e automatizado Bioscreen C, mostraram resultados semelhantes sendo compatíveis entre eles e com a literatura, demonstrando redução de gastos de meio de cultura e de reagentes (HORAKOVA et al., 2003; LISOWSKA et al., 2004; SIMÕES e TAUK-TORNISIELO, 2005a). Nem sempre a melhor fonte de carbono para a produção de biomassa, no entanto, é a melhor fonte de carbono para a produção de metabólitos como ácidos graxos por fungos filamentosos. Somashekar et al. (2002); Papanikolaou et al. (2004) e Jang et al. (2005) estudaram a produção de ácidos graxos essenciais e verificaram que a glicose foi a melhor fonte de carbono para os fungos do gênero *Mortierella sp.* e *Mucor sp.* Na etapa seguinte deste estudo foram utilizados os parâmetros indicados na **Tabela 5** e período de cultivo de 72 horas, como descrito por Arasato e Tauk-Tornisielo (enviado para publicação).

Tabela 5. Condições selecionadas para os cultivos realizados em sistema automatizado Bioscreen C.

Condições para cultivo	
Fontes de Carbono	Glicose Maltose
pH de cultivo	5,80

5.2 Cultivo submerso de linhagens de *Mucor circinelloides* (CSm).

Nas **Tabelas 6 e 7** estão os resultados da produção de biomassa e de LT em diferentes quantidades de micélio usado como inóculo, obtidos a partir de meio de sais de Vogel (VOGEL, 1956). Verifica-se que a linhagem M1 apresentou maior produção de LT/biomassa seca (18,47% p/p) em meio contendo glicose como fonte de carbono e inoculado com 0,7 g de micélio. Quando 0,2g de micélio foi utilizado como inóculo, a maltose foi a melhor fonte de carbono para produção de biomassa e de LT/biomassa seca (16,06% p/p). A linhagem M2 não apresentou boa produção de LT/biomassa mesmo tendo a maior produção de biomassa (9,53 g.L⁻¹) com glicose como fonte de carbono.

Chen e Liu (1997) observaram que o acréscimo na quantidade de inóculo a partir de micélio aumentou a produção de biomassa e de LT/biomassa seca (16,06% p/p), em cultivo a partir de *C. echinulata*. Ao contrário desses resultados, aqueles aqui verificados demonstraram que o aumento da quantidade de micélio usado como inóculo acarretou decréscimo da produção de biomassa e de lipídio no cultivo da linhagem M1.

Tabela 6. Produção de biomassa e lipídios totais a partir da linhagem M1 de *M. circinelloides*, em diferentes fontes de carbono, inóculos com diferentes quantidades de micélio, em cultivos a 25 °C, 150 rpm, pH 5,8, durante 72 horas. Legenda: MV: Meio de sais de Vogel; LT: lipídios totais.

Inóculo a partir de micélio (g)	Fonte de carbono	Biomassa seca (g.L ⁻¹)	LT (g.L ⁻¹)	LT/biomassa seca (% p/p)
0,2	MV	1,83	0,09	4,9
	MV + Glicose	7,02	0,31	4,41
	MV + Maltose	5,85	0,94	16,06
0,5	MV	2,65	0,12	5,51
	MV + Glicose	2,66	0,50	18,79
	MV + Maltose	2,74	0,16	5,83
0,7	MV	0,81	0,02	2,46
	MV + Glicose	7,47	1,38	18,47
	MV + Maltose	6,97	0,60	8,60
1,0	MV	0,00	0,00	0,00
	MV + Glicose	5,96	0,29	5,31
	MV + Maltose	6,79	0,23	3,38

Tabela 7. Produção de biomassa e lipídios totais a partir da linhagem M2 de *M. circinelloides*, em diferentes fontes de carbono, inóculos com diferentes quantidades de micélio, em cultivos a 25 °C, 150 rpm, pH 5,8, durante 72 horas. Legenda: MV: Meio de sais de Vogel; LT: lipídios totais.

Inóculo a partir de micélio (g)	Fonte de carbono	Biomassa seca (g.L ⁻¹)	LT (g.L ⁻¹)	LT/biomassa seca (% p/p)
0,2	MV	0,00	0,00	0,00
	MV + Glicose	6,64	0,21	3,19
	MV + Maltose	7,83	0,18	2,48
0,5	MV	0,00	0,00	0,00
	MV + Glicose	2,10	0,14	6,66
	MV + Maltose	3,00	0,10	3,33
0,7	MV	0,00	0,00	0,00
	MV + Glicose	5,57	0,16	2,87
	MV + Maltose	3,66	0,24	6,55
1,0	MV	0,00	0,00	0,00
	MV + Glicose	9,53	0,20	2,09
	MV + Maltose	7,67	0,16	2,08

No cultivo da linhagem M2 o aumento da quantidade de inóculo mesmo acarretando acréscimo da produção de biomassa, não foi verificado maior produção ou acúmulo de lipídio, mesmo usando-se 1,0 g de micélio como inóculo (**TABELA 7**). Na **Tabela 8** observa-se a produção de biomassa e LT a partir de suspensão de 1.10^7 esporos.mL⁻¹. A linhagem M1 foi melhor produtora de biomassa e LT utilizando-se maltose como fonte de carbono, diferentemente de outros estudos citados na literatura, onde a glicose tem sido considerada a melhor fonte de carbono para produção de lipídios (SERRANO-CARREON et al., 1992; SOMASHEKAR et al., 2002; JANG et al., 2005; ZHU et al., 2006).

A linhagem M2 não apresentou boa produção de biomassa utilizando-se suspensão de esporos como inóculo. A utilização de suspensão de esporos mostrou ter melhor rendimento para a produção de biomassa (10,53 g.L⁻¹) e de LT/biomassa (19,37% p/p), quando comparou-se com os resultados obtidos a partir de cultivos onde o inóculo foi diferentes quantidades de micélio da linhagem M1. A inoculação com esporos é comum em diversos trabalhos para produção de ácidos graxos encontrando-se melhores resultados tanto para este fim ou para produção de outros metabólitos microbianos (EMELYANOVA, 1997; CARVALHO et al., 1999; KOIKE et al., 2001; SILVA et al., 2003; DYAL e NARINE, 2005).

Tabela 8. Produção de biomassa e de lipídios a partir das linhagens M1 e M2 de *Mucor circinelloides*, em diferentes fontes de carbono, com inóculo 1.10^7 esporos.mL⁻¹ a 25° C, 150 rpm, pH 5,8, durante 72 horas. Legenda: MV = Meio sais de Vogel; LT: lipídios totais.

Linhagens	Fonte de carbono	Biomassa seca (g.L⁻¹)	LT (g.L⁻¹)	LT/biomassa seca (% p/p)
M1	MV	2,25	0,21	9,33
	MV + Glicose	8,63	0,41	4,75
	MV + Maltose	10,53	2,04	19,37
M2	MV	1,86	0,04	2,15
	MV + Glicose	7,20	0,23	3,16
	MV + Maltose	7,52	0,26	3,45

Nas **Tabelas 9 e 10** estão os resultados obtidos de ácidos graxos insaturados a partir do crescimento micelial das linhagens M1 e M2 de *M. circinelloides* inoculados com

diferentes quantidades de micélio. As linhagens mesmo sendo da mesma espécie fúngica, porém isoladas de solos de áreas de cerrado e da caatinga, parecem indicar que suas respectivas adaptabilidades aos habitats de onde foram isoladas relacionadas às condições ambientais, devem ter provavelmente afetado as enzimas ligadas à biossíntese destes ácidos, alterando as quantidades dos mesmos. Silva et al. (1998) estudaram várias linhagens de fungos da ordem Mucorales e verificaram que o perfil dos ácidos graxos encontrados variou para cada espécie; estas também variaram com as condições de cultivos (NEMEC et al., 1997; CARVALHO et al., 1999; SOMASHEKAR et al., 2002; JEENNOR et al., 2006).

As concentrações de ácidos oléico (AO), linoléico (AL) e gama-linolênico (AGL) na biomassa da linhagem M1 foram superiores nas diferentes quantidades de inóculo quando comparadas àquelas obtidas a partir da linhagem M2. Esta última apresentou baixa produção de ácidos graxos insaturados, mesmo tendo maior produção de biomassa (9,53 g.L⁻¹), porém com menor produção de LT (2,09 g.L⁻¹). Maior produção de AGL (8,10 mg.L⁻¹) foi obtida no cultivo a partir de 1,0 g de micélio usado como inóculo, onde se observou a quantidade de 0,29 g.L⁻¹ de LT, em meio contendo glicose como única fonte de carbono. Maiores produções de biomassa (7,47 g.L⁻¹) e LT (1,38 g.L⁻¹) foram encontradas no cultivo da linhagem M1, a partir de 0,7 g de micélio usado como inóculo. Ahmed et al. (2006) relataram que a glicose foi a melhor fonte de carbono para produção de biomassa, LT e AGL nos cultivos de linhagens de *Mucor sp* em reatores, apresentando produção máxima de 431,2 mg.L⁻¹ de AGL.

Tabela 9. Quantidades de ácidos graxos produzidos a partir da linhagem M1 de *M. circinelloides*, em diferentes meios contendo fontes de carbono e inóculos contendo diferentes quantidades de fragmentos de micélio, a 25° C, 150 rpm, pH 5,8, durante 72 horas. Legenda: MV = Meio saís de Vogel; LT: lipídios totais.

Quantidade de Inóculo (g)	Fonte de carbono	Ácidos graxos (mg.L ⁻¹)		
		AO	AL	AGL
0,2	MV	0,97	0,86	1,12
	MV + Glicose	5,67	3,49	5,03
	MV + Maltose	3,22	2,36	4,56
0,5	MV	0,2	0,17	0,24
	MV + Glicose	0,96	0,76	1,09
	MV + Maltose	1,23	0,73	0,98
0,7	MV	4,33	2,21	4,36
	MV + Glicose	7,60	3,96	3,57
	MV + Maltose	3,14	1,93	2,41
1,0	MV + Glicose	15,42	10,73	8,10
	MV + Maltose	4,34	5,57	3,70
	MV	0,00	0,00	0,00

Tabela 10. Quantidades de ácidos graxos produzidos a partir da linhagem M2 de *M. circinelloides*, em diferentes meios contendo fontes de carbono e inóculos contendo diferentes quantidades de fragmentos de micélio, a 25° C, 150 rpm, pH 5,8, durante 72 horas. Legenda: MV = Meio saís de Vogel; LT: lipídios totais.

Quantidade de Inóculo (g)	Fonte de carbono	Ácidos graxos (mg.L ⁻¹)		
		AO	AL	AGL
0,2	MV	0,00	0,00	0,00
	MV + Glicose	1,73	2,20	1,86
	MV + Maltose	1,67	1,51	1,69
0,5	MV	0,00	0,00	0,00
	MV + Glicose	1,64	1,67	2,02
	MV + Maltose	0,90	1,36	1,47
0,7	MV	0,00	0,00	0,00
	MV + Glicose	1,01	0,59	0,75
	MV + Maltose	0,53	0,52	0,44
1,0	MV	0,00	0,00	0,00
	MV + Glicose	7,04	7,93	7,40
	MV + Maltose	3,09	3,04	2,62

Na **Tabela 11** estão os resultados dos ácidos graxos insaturados produzidos pelas linhagens M1 e M2 em cultivos em meio de sais de Vogel, a partir de inóculo contendo suspensão de esporos. Os valores observados nestes cultivos foram maiores em relação àqueles obtidos nos experimentos utilizando-se inóculos a partir de micélio. A maltose foi melhor indutora para produção de AO, AL e AGL para ambas as linhagens. A linhagem M1 também apresentou maior produção de AGL (10,64 mg.L⁻¹), quando comparada àquela a partir da linhagem M2, como também foi verificado para a produção de biomassa e LT. No cultivo da linhagem M1, verificou-se que a inoculação a partir de suspensão de esporos acarretou 31,35% de AGL maior do que aquela obtida no cultivo com inóculo contendo micélio.

Tabela 11. Quantidades de ácidos graxos produzidos a partir das linhagens M1 e M2 de *M. circinelloides*, em diferentes fontes de carbono, com inóculo contendo 1.10⁷ esporos.mL⁻¹ após incubação a 25° C, 150 rpm, pH5,8, durante 72 horas. Legenda: MV : Meio sais de Vogel; LT lípidios totais.

Linhagens	Fonte de carbono	Ácidos graxos (mg.L ⁻¹)		
		AO	AL	AGL
M1	MV	3,22	2,97	3,88
	MV + Glicose	9,47	7,65	6,24
	MV + Maltose	13,77	9,47	10,64
M2	MV	0,54	0,53	1,98
	MV + Glicose	1,67	1,60	1,56
	MV + Maltose	2,64	2,94	2,62

Botha et al. (1997) estudaram as propriedades fisiológicas e composição de ácidos graxos em *M. circinelloides* f. *circinelloides* quanto à assimilação de diferentes carboidratos para produção de ácidos graxos insaturados. Esta linhagem pode crescer anaerobicamente em ampla diversidade de fontes de carbono, porém, observaram que as melhores acumulações de lípidios e ácidos graxos aconteceram em amido solúvel, trealose, ácido acético e glicose. Immelman et al. (1997) estudaram o efeito de diferentes relações de C:N no meio de cultivo para produção de AGL por *M. circinelloides*. Verificaram que altas concentrações de C:N diminuíam a concentração de AGL na biomassa no final do

experimento e o conteúdo de AGL nos lipídios neutros aumentou substancialmente do começo ao fim do experimento.

Na **Tabela 12** estão as condições de cultivo em substrato sólido (CSS), selecionadas a partir dos resultados encontrados em experimentos anteriores.

Tabela 12. Condições de cultivo selecionadas para produção de ácidos graxos insaturados em cultivo em substrato sólido (CSS).

Condições para cultivo	
Linhagem M1	<i>M. circinelloides</i> Região de Caatinga
Fontes de Carbono	Glicose Maltose
Forma de Inóculo	Suspensão de esporos

5.3. Cultivo e Produção de Lipídios em Substrato Sólido (CSS)

A partir dos cultivos da linhagem M1 em farelo de trigo (pH 5,72), farelo de mandioca suplementado com extrato de levedura (pH 4,31) e farinha de soja (pH 6,07) foi realizada a triagem para o melhor substrato visando melhor produção de ácidos graxos insaturados da família ômega 6, com enfoque no AGL. Experimentos preliminares forneceram resultados que induziram a exclusão de bagaço de cana-de-açúcar e da polpa cítrica como substrato para a linhagem em estudo. Não foi possível verificar qualquer crescimento micelial nestes substratos, mesmo quando suplementados com extrato de levedura 1% (p/p) e acrescidos de 5,0 mL de água destilada.

O cultivo da linhagem M1 a 25 °C apresentou crescimento micelial e esporulação em farelo de trigo após 24 horas de cultivo e em 48 horas, todo o substrato foi ocupado pelas hifas e esporos. Este mesmo resultado foi obtido no cultivo em farelo de mandioca somente após 168 horas. No cultivo realizado em farinha de soja já em 24 horas observou-se uma densa formação de hifas na superfície do substrato sem a formação de esporos. Após 72 horas de cultivo, a superfície deste substrato foi tomada pela biomassa

fúngica e no fundo do substrato foi observada a formação de esporos, tornando-o de coloração cinza escuro devido à esporulação (**FIGURA 15**).



Figura 15. Aspecto do cultivo da linhagem M1 de *M. circinelloides* em farinha de soja, após 144 horas a 25 °C.

Stredanski et al. (2000) constataram que o crescimento micelial de *P. ultimum* na superfície do substrato foi visível após 72 horas de cultivo em polpa de maçã, penetrando no substrato nos dias seguintes. Não foi possível separar a biomassa microbiana do substrato e não foram satisfatórias as análises de proteína e glicosamina para estimar a biomassa. Mitchell et al. (2000) citaram que o crescimento microbiano na superfície do meio se dá devido a maior quantidade de oxigênio encontrada na região gás-sólido, obtendo nutrientes disponíveis. No crescimento contínuo do microrganismo, são atingidas regiões inferiores do substrato, liberando enzimas que tornam os nutrientes necessários livres para permitir a continuidade do crescimento microbiano. Neste ocorrem trocas de gases pelas hifas aéreas na superfície do substrato. Isto possibilita que o crescimento micelial em substratos sólidos, quando comparado com o cultivo líquido, seja diferente em relação à produção de metabólitos secundários e que, muitas vezes, estão associados com a formação de hifas aéreas e formação de esporos na fase estacionária de crescimento (HÖLKER e LENZ, 2005).

Certik et al. (2006) estudaram o enriquecimento de vários substratos por ácidos graxos utilizando microrganismos da ordem Mucorales e observaram que as superfícies dos substratos foram cobertas pelo micélio em 48 horas de cultivo e verificaram que a penetração das hifas no substrato, com o auxílio da microscopia. Na **Figura 16** pode-se verificar que a espécie de *M. circinelloides* estudada demonstrou ser lipolítica quanto à conversão do substrato para lipídios, havendo decréscimo na quantidade de LT de 89,1% em farelo de trigo e de 36,9% em farinha de soja, após sete dias de cultivo com relação ao controle (sem inóculo).

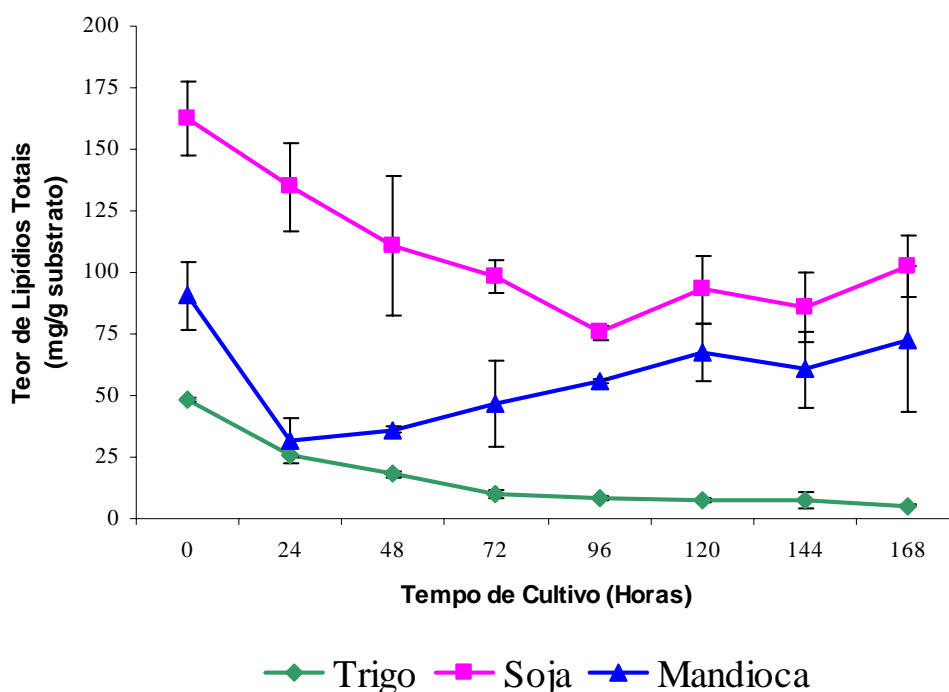


Figura 16. Lipídios totais extraídos dos substratos sólidos farelo de trigo, farinha de soja e farelo de mandioca no cultivo de *M. circinelloides* a 25 °C, durante 168 horas.

Provavelmente, esta linhagem utilizou os lipídios presentes no substrato para seu próprio crescimento. Os resultados obtidos no cultivo do fungo em farelo de mandioca foram distintos, pois houve 35,0% de consumo de lipídio após 24 horas de cultivo. Ocorreu acréscimo de LT até 120 horas de cultivo, porém 19,6% menor do valor encontrado no substrato controle. Observou-se também que nos cultivos em farelo de trigo, farinha de soja e de farelo de mandioca ocorreu decréscimo de 0,65 mg, 0,48 mg e 0,18 mg, respectivamente,

do peso seco final do substrato + biomassa após 168 horas de cultivo em relação ao peso seco inicial do substrato antes da inoculação. Os teores de LT, comparando-se o tempo de cultivo, obtidos dos substratos cultivados por *M. circinelloides* tiveram diferenças significativas estatisticamente em nível de 5% ($p < 0,05$) (**TABELA 13**).

Abu et al. (2000) estudaram as mudanças nos lipídios, ácidos graxos e proteínas que ocorreram no substrato após cultivo das linhagens com as linhagens *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus oryzae* e *A. niger*. Esses autores observaram que as espécies de *Aspergillus* demonstraram ser lipogênicas, enquanto que, *P. ostreatus* demonstrou ser lipolítica. Esses autores observaram também que, entre 48 horas e 96 horas de cultivo houve assimilação de lipídios do substrato, possivelmente para produção de biomassa.

TABELA 13. Análise da variância para a produção de lipídios da linhagem M1 para o modelo fatorial considerando como fatores de variação três substratos e sete dias de cultivo. Legenda: GL = grau de liberdade; SQ = desvio padrão; QM = quadrado médio; F = frequência de distribuição; Pr = probabilidade.

<i>Causas Variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>
Substrato	2	252003138,70	126001569,30	1,00	0,3740
Tempo de cultivo	7	889545857,40	127077979,60	1,01	0,4347
Resíduo	62	7818812718,00	126109883,00		
Total	71	8960361714,00			

Emelyanova (1996) relatou que em todos os substratos utilizados para o cultivo de *Cunninghamella japonica* foram extraídas quantidades inferiores de LT após o cultivo do fungo com relação ao substrato original. Conti et al. (2000) relataram que depois de 168 horas de cultivo dos fungos da ordem Mucorales em cevada houve decréscimo na quantidade de lipídios estocados pelos fungos quando o carbono disponível no substrato tornou-se limitante. Stredansky et al. (2000) observaram eficiência de 11% na conversão dos nutrientes do substrato para óleo fúngico, após 168 horas de cultivo em cevada tendo maior quantidade de biomassa e lipídio, comparado ao cultivo submerso. Esses resultados corroboram com os encontrados neste estudo, uma vez que, no período de 0 a 168 horas, onde ocorreu decréscimo de LT e houve acréscimo de ácidos graxos insaturados. Antes do cultivo não foi detectada nenhuma presença de AGL no substrato.

Na **Figura 17** tem-se a produção dos ácidos graxos insaturados (AGI), determinados através de cromatografia gasosa, nos cultivos aqui realizados. A concentração de AO nos substratos cultivados foram distintos quanto à concentração e tempo de cultivo. Verificou-se que houve picos de produção de AO durante o cultivo em farinha de soja, sendo o primeiro observado em 48 horas de cultivo e o segundo pico em 144 horas de cultivo. Este resultado pode estar relacionado à síntese *de novo* de ácidos graxos, porém sendo difícil explicar se o acréscimo de AO é devido ao decréscimo de AL e AGL em cultivos utilizando substratos sólidos, segundo Abu et al. (2000). Nos cultivos realizados em farelo de trigo e farelo de mandioca pode-se observar que houve acréscimo de 6,4% de AO no quarto dia de cultivo e de 1,3% em 48 horas de cultivo, respectivamente, sendo que após este período de cultivo houve decréscimo até 168 horas de cultivo.

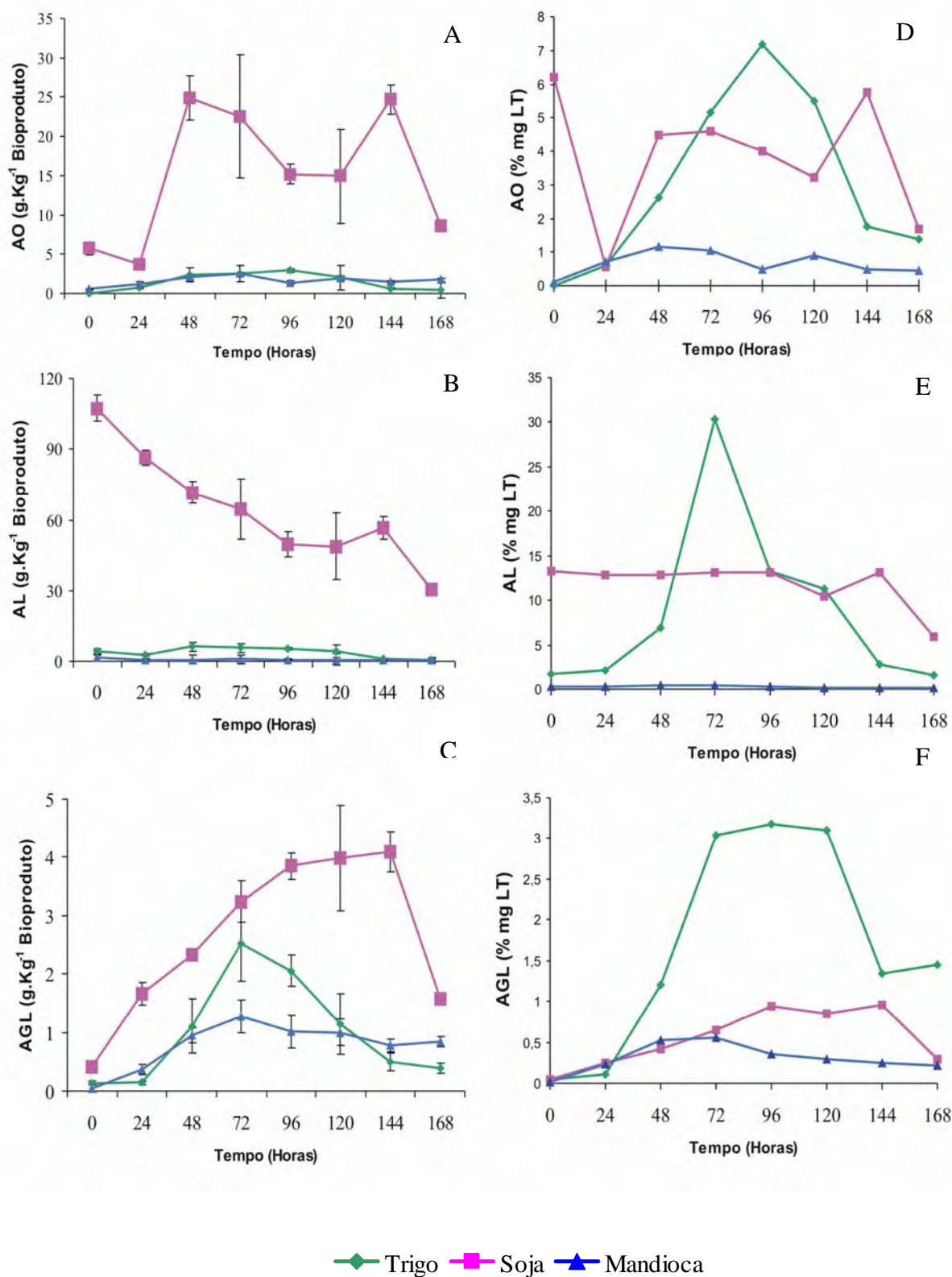


Figura 17. Curva de produção e eficiência na conversão de ácido oleico (AO), ácido linoléico (AL) e ácido gama-linolênico (AGL) por *M. circinelloides* crescidos em farelo de trigo, farinha de soja e farelo de mandioca por sete dias a 25 °C. Legenda: A, D: AO; B, E: AL; C, F: AGL; LT: lipídios totais.

O AO é importante na dieta humana para a redução dos níveis colesterolêmicos, reduzindo os níveis de colesterol LDL e triacilgliceróis e aumentando o nível de colesterol HDL, sendo importante o consumo com altos níveis de gorduras monoinsaturadas na dieta (ALLMAN-FARINELLI et al., 2005; BINKOSKI et al., 2005; VALSTA et al., 2005). O cultivo de *M. circinelloides* em farinha de soja incrementou o substrato em níveis elevados de AO (430,5%) comparado ao encontrado no controle, reduzindo os níveis de ácidos graxos saturados, que contribuem para o aumento dos níveis colesterolêmicos. Este sugere uma excelente perspectiva do enriquecimento da farinha de soja com AO e sua possível aplicabilidade industrial.

Houve maior produção de AL no cultivo realizado em farelo de trigo, após 168 horas de cultivo, sendo a taxa de conversão dos LT para este ácido graxo de 1,4%. Após 72 horas de cultivo em farelo de trigo, observou-se que esta taxa foi de 30,4%. Nos cultivos realizados em farelo de mandioca, a taxa de conversão foi muito inferior, correspondendo a 0,2% em 168 horas, porém tendo um maior pico, 0,4%, após 72 horas de cultivo. Nos cultivos realizados em farelo de soja, AL manteve-se constante (12,5%) até 96 horas, havendo decréscimo após 144 horas para 6,25%. Os resultados, portanto, indicaram que a maior taxa de conversão para AL ocorreu após 72 horas de cultivo, independentemente do substrato utilizado, porém maior valor comparativo foi verificado em farelo de trigo. O AL foi o maior constituinte encontrado dentre os ácidos graxos insaturados, tanto nos cultivos realizados com *M. circinelloides* como nos substratos utilizados como controle. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (ABU et al., 2000; CERTIK et al., 2006).

Quanto ao AGL, foi verificado que o melhor tempo de cultivo e de rendimento ocorreu em 144 horas de cultivo em farinha de soja e em 72 horas para os cultivos realizados em farelo de trigo e mandioca. As taxas de conversão foram 3,2%, 1,0% e 0,6% para o farelo de trigo, farinha de soja e farelo de mandioca, respectivamente. A concentração de LT obtidas em farelo de trigo, todavia, foi 116,8% inferior (três dias de cultivo) àquela obtida em cultivo com farinha de soja (144 horas de cultivo). Constatou-se que nem sempre a maior quantidade extraída de LT do substrato apresentou maior quantidade de AGL. Os cultivos realizados em farinha de soja tiveram maior quantidade de AGL (4,1 g.Kg⁻¹ substrato) quando a concentração obtida de LT do substrato foi de 85,9 mg.g⁻¹ de substrato.

Na **Tabela 14** em relação a produção de AGL é demonstrado que houve diferenças estatisticamente significativas a nível de 5%, em relação aos substratos e tempos de cultivos aqui utilizados. As diferenças mais significativas foram observadas a 72 e 96 horas de cultivo em farinha de soja. Os maiores níveis de significância foi encontrado durante 72 e

96 horas de cultivos em farelo de trigo e de mandioca. Nos cultivos realizados em farinha de soja, a produção de AGL sempre foi maior em relação aos demais cultivos, durante todo o período de cultivo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

TABELA 14. Análise da variância da produção de AGL da linhagem M1 através do modelo fatorial, considerando-se como fatores de variação três substratos e 168 horas de cultivo. Legenda: GL = grau de liberdade; SQ = desvio padrão; QM = quadrado médio; F = frequência de distribuição; Pr = probabilidade.

<i>Causas Variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>
Substrato	2	11,68	5,84	14,09	0,0001
Tempo cultivo	7	36,07	5,15	12,43	0,0001
Resíduo	62	25,69	0,41		
Total	71	73,44			

Stredansky et al. (2000a) e Gema et al. (2002) observaram que o maior acúmulo de AGL ocorreu com 168 horas de cultivo, seguindo seu decréscimo nos LT, sendo que sua porcentagem foi maior em 240 horas de cultivo. Conti et al. (2001) apesar de obter resultados ($9,3 \text{ mg.g}^{-1}$ substrato seco) em menor tempo de cultivo, todos esses resultados foram inferiores ou semelhantes àqueles aqui observados, porém em 144 horas. Stredanski et al. (2000b) comentaram que, concentração superior de produtos encontrados em cultivo em substrato sólido é devido à alta quantidade de substrato metabolizável, o qual é uma característica deste processo comparado ao processo de CSm.

Em se tratando de enriquecimento com ácidos graxos insaturados por CSS, a maior concentração de AGL nos substratos cultivados foi em farinha de soja, resultados este que determinou o uso desta nos demais experimentos para a otimização do cultivo de *M. circinelloides*. Comparando-se os resultados, verificou-se que a produção de AGL em relação a de LT foi melhor em farelo de trigo, todavia, a interpretação dos resultados foi baseada em produção de AGL em relação por Kg de substrato. Um dos fatos para embasar esta opção foi o consumo de lipídios durante o cultivo fúngico.

Não foi verificada a biossíntese de AA nos cultivos realizados, fato também citado na literatura nos cultivos de *M. circinelloides*, tendo sido observada somente a produção de AGL (CONTI et al. 2001). Com base nos resultados obtidos, as próximas etapas consistiram em verificar o efeito da suplementação da farinha de soja com outras fontes de carbono para otimizar a produção de ácidos graxos poliinsaturados.

5.4 Suplementação dos Cultivos em Substrato Sólido, com Fontes de Carbono para a Produção de Ácidos Graxos Insaturados

Na **Tabela 15** e **Figura 17** estão os valores de AGI encontrados nos substratos necessários para se conhecer o conteúdo de lipídios e o perfil de ácidos graxos, uma vez que, os dados disponíveis na literatura são variados devido as diferentes localizações e metodologias (CERTIK et al., 2006).

Tabela 15. Composição de ácidos graxos insaturados nos substratos utilizados para cultivo de *M. circinelloides*. Legenda: nd: não detectado, LT: lipídios totais, CG: canola:gergelim, CA: casca de arroz.

Complementos Suplementares	LT mg.g ⁻¹ substrato	g.Kg ⁻¹ Substrato Inicial		
		AO	AL	AGL
Canola	141,7±21,5	71,2±2,3	87,8±3,4	nd
Girassol	127,7±11,8	24,1±0,9	58,9±2,1	nd
Gergelim	128,5±0,5	136,5±2,8	168,8±5,8	nd
CG 2% (1:1)	170,1±0,9	75,2±1,65	127,5±0,8	nd
CG 4% (1:1)	168,1±12,8	68,0±6,8	121,1±4,9	nd
CA 3:1	131,4±4,3	190,2±4,8	165,3±2,9	nd
CA 3:2	107,9±2,6	91,3±1,4	162,9±1,6	nd
CA 3:3	81,8±7,8	142,3±1,6	116,6±3,8	nd
CA 3:1/CG 1:1	139,0±12,3	192,2±2,4	163,7±4,8	nd
CA 3:2/CG 1:1	103,9±8,3	190,7±1,2	162,2±0,9	nd
CA 3:3/CG 1:1	89,7±9,4	187,6±2,4	173,4±2,9	nd

No perfil dos AGI não foram detectados AGL em nenhuma preparação para o cultivo de *M. circinelloides*, como também observado por outros autores quando utilizaram diversos substratos de origem vegetal (JANG et al., 2000; GUI-YOU et al., 2004). Pode-se observar (**FIGURA 18**) que ocorreu decréscimo nas concentrações de AO e AL nos substratos onde foi cultivado *M.circinelloides*, mas houve produção de AGL por este fungo.

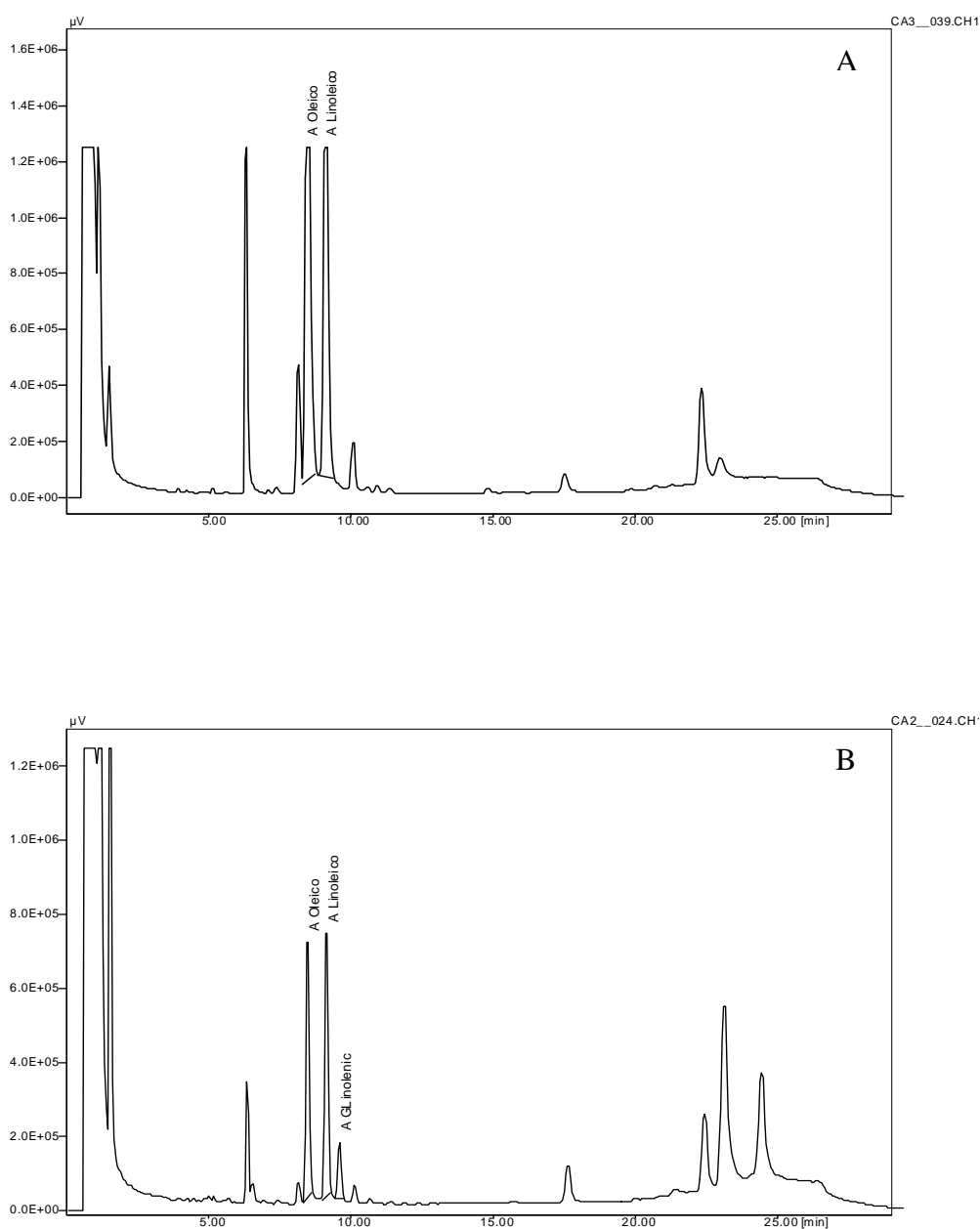


Figura 18. Perfil dos ácidos graxos em farinha de soja sem (A) e com crescimento (B) de *M. circinelloides* cultivado por 144 horas, a 25 °C, obtido por cromatografia gasosa.

Na **Tabela 16** estão os resultados obtidos nos cultivos em substrato contendo farinha de soja suplementada com 2% de carboidrato ou de óleos vegetais. Verificou-se que glicose e maltose foram as melhores fontes de carbono para a produção de AGL em cultivos líquidos com agitação, resultados semelhantes encontrados também por outros autores (CARVALHO et al., 1999; RUEGGER, 2001). Em cultivos utilizando substratos sólidos, os

efeitos não foram os mesmos, uma vez que os substratos utilizados foram ricos em carboidratos, nitrogênio e proteína. A suplementação do substrato com óleo de gergelim e canola foram melhores para a produção de AGL.

Tabela 16. Lipídios totais, AO, AL e AGL em cultivos de *M. circinelloides* em farinha de soja, 144 horas a 25 °C, com suplementação de 2% de carboidratos ou de óleos vegetais, em triplicata. Legenda: LT: lipídios totais.

Complementos Suplementares	pH	LT mg.g ⁻¹ substrato	g.Kg ⁻¹ Bioproduto			mg AGL.g ⁻¹ LT
			AO	AL	AGL	
Glicose	5,96	59,9±8,6a	11,5±2,5	29,5±4,3	4,5±2,1c	15,2±7,1b
Maltose	5,97	53,9±3,9a	9,1±1,8	24,7±6,0	3,5±1,1a	12,9±3,6a,b
Canola	6,00	70,1±7,5a	17,5±4,3	37,4±8,3	4,6±0,2c	13,3±0,3a,b
Girassol	6,05	66,5±6,3a	12,5±2,8	31,8±3,0	3,9±0,9b	11,8±1,4a
Gergelim	6,07	64,3±3,7a	15,4±1,9	34,8±3,1	5,5±0,3d	17,3±0,5c

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de significância.

As composições dos óleos suplementados ao substrato foram diferentes afetando a produção de AGL. Durante o crescimento de *M. circinelloides*, provavelmente, houve conversão destes óleos em AGL, decorrente da comparação com os resultados obtidos no controle. A depleção na produção de LT foi também presenciada nos cultivos e, a maior produção de AGL (17,3 mg.g⁻¹ LT) foi obtida na terceira maior quantidade de lipídios observada (64,3 mg.g⁻¹ substrato) utilizando óleo de gergelim. Estes dados corresponderam a 5,38% de AGL nos LT em 6,4% dos LT obtido do substrato cultivado (Bioproduto), havendo diferenças significativas entre as concentrações de AGL obtidas tanto nos bioprodutos como nos LT ($p < 0,05$). Novo experimento foi realizado utilizando óleo de canola (segundo melhor suplemento para a produção de AGL em mg.g⁻¹ LT) e glicose (terceiro melhor suplemento para a produção de AGL em mg.g⁻¹ LT) juntamente com óleo de gergelim, mostrado na **Tabela 17**. Jang et al. (2005) utilizaram suplementação do substrato com diferentes óleos vegetais e observaram que a concentração de óleo de soja 1:1 aumentou a concentração de AGI em especial AA em 19,1% (1,78 g.L⁻¹) e AEP em 20% (70,9 mg.L⁻¹).

Tabela 17. Lipídios totais, AO, AL e AGL em cultivos de *M. circinelloides* em farinha de soja, por 144 horas a 25 °C, em triplicata, com misturas dos complementos suplementares em diferentes composições e proporções. Legenda : LT: lipídios totais; CG: canola:gergelim; CGlc: canola:glicose; GGlc: gergelim:glicose; CGGlc: canola:gergelim:glicose.

Complementos Suplementares	pH	LT mg.g ⁻¹ substrato	g.Kg ⁻¹ Bioproduto			mg AGL.g ⁻¹ LT
			AO	AL	AGL	
CG 2% (1:1)	6,09	47,7±0,7a	28,5±1,5	54,5±0,8	6,2±1,3e	26,0±2,8e
CG 4% (1:1)	6,12	45,5±12,3b,c	39,2±6,8	60,1±4,9	5,5±0,9d	24,1±1,5b
CGlc 4% (1:1)	5,98	60,7±26,6c	23,5±2,4	47,4±5,0	4,8±0,9c	15,8±1,7c,d
GGlc 4% (1:1)	5,93	53,7±9,3a,b	20,5±2,6	46,6±4,1	4,0±0,7b	14,9±1,4c
CGGlc 4% (1:1:2)	5,99	41,9±3,4b,c	17,9±0,9	41,4±1,4	3,6±0,5a	17,1±0,9d
CGGlc 6% (1:1:1)	5,97	54,6±0,2b,c	25,9±2,6	33,4±7,7	3,9±0,2a,b	14,2±0,4a

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A mistura dos complementos suplementares ao substrato demonstrou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quanto à produção de AGL. Houve decréscimo de aproximadamente 13,4% de LT quando foi realizada a suplementação de dois óleos em relação a um único óleo (**TABELAS 16 e 17**). Este resultado foi ao contrário do observado para a produção de AGL, pois a prática da suplementação com dois óleos, CG 1:1, acarretou acréscimo de 12,7% (6,2 g AGL.Kg⁻¹ Bioproduto) e no LT de 10,9% (26,0 mg AGL.g⁻¹ LT). Nos cultivos onde ocorreu adição de glicose + óleos vegetais houve decréscimo na produção de AGL, **Tabela 17**. As concentrações de AGL nos LT foram superiores aos obtidos no cultivo utilizando óleo de gergelim, apresentando acréscimo de 10,9% e 10,6% nos cultivo CG 1:1 e CG 2:2, respectivamente.

Stredansky et al. (2000b) suplementando substrato de polpa de maçã com glicose e óleo de amendoim no crescimento de *T. elegans*, observaram maior produção de AGL. Jang et al. (2000) suplementaram vários substratos com óleo de soja e óleo de linhaça a 1% e observaram que também houve aumento da produção de AGL por grama de substrato. Semelhantemente, Conti et al. (2001) suplementando substrato sólido, rico em amido e níveis adequados de nitrogênio orgânico, com óleo de amendoim mais grãos de malte, verificaram aumento de AGL devido ao aumento de AL, seu precursor direto. Em concentrações maiores dos suplementos, entretanto, houve decréscimo do conteúdo de AGL nos lipídios, devido ao

fato que uma grande porção de óleo suplementado não foi metabolizado e convertido para AGL pelo fungo *C. elegans* CCF 1456.

5.5 Influência da Adição da Casca de Arroz (CA) ao Substrato para Produção de Ácidos Graxos Insaturados

O crescimento de *M. circinelloides* no substrato acrescido de casca de arroz foi distinto quanto ao substrato farinha de soja, porém, não foram observadas diferenças na formação de esporos e no crescimento micelial, em relação às diferentes quantidades de casca de arroz no substrato. As hifas cresceram uniformemente no substrato, sendo observada formação de esporos nos espaços disponíveis no interior do substrato (**FIGURA 19**). Esta característica de crescimento influencia na formação de micélio e de hifas aéreas devido à proporção da área por volume e substrato disponível. Considerando que a formação de AGI está diretamente ligada a ação de enzimas Δ^9 -dessaturase e Δ^6 -dessaturase e que estas dependem de oxigênio disponível para a transformação à AGL (CERTIK et al., 2006), a adição de agentes descompactantes melhora a respiração e eficiência da aeração nos espaços inter-partículas (PANDEY et al., 2000) e aumenta a produção de enzimas por grama de substrato inicial (RAHARDJO et al., 2005) e ajudam a remover o calor gerado durante o cultivo e promover a acumulação de AGL no bioproduto (CERTIK et al, 2006).

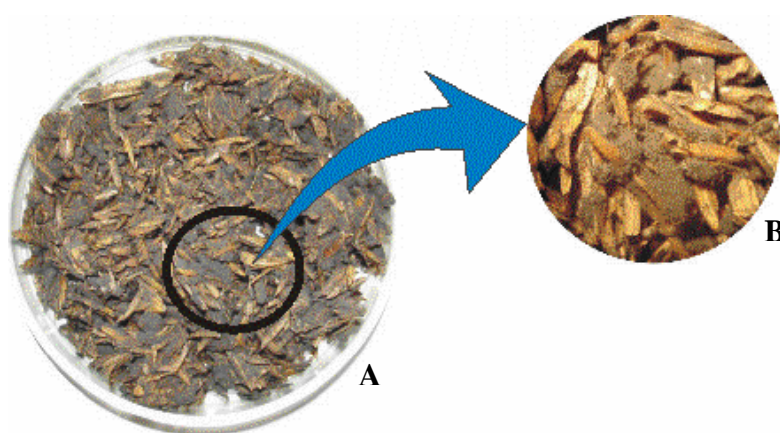


Figura 19. (A) Crescimento de *M. circinelloides* em farinha de soja acrescido de casca de arroz (3:2), por seis dias, a 25 °C. (B) Detalhe do crescimento de *M. circinelloides* com aumento de 10x.

A adição de CA ao substrato farinha de soja em diferentes proporções, sem adição de óleo vegetal, proporcionou decréscimo na concentração de AGI produzido quanto ao substrato cultivado (**TABELA 17**) quando comparado com o experimento na **Figura 17**. Verificou-se também que houve grande decréscimo na composição de LT em todos os cultivos. Este fato pode estar ligado ao aumento da porosidade no substrato, havendo maior aproveitamento pelo fungo para o crescimento, havendo diminuição na concentração de LT final de 62,59% em CA 3:1 e 72,52% em CA 3:2 acrescido de óleos vegetais comparado ao substrato controle. A maior porção de LT encontrado no tratamento CA 3:2 representou 57,9% dos LT encontrado no tratamento CG 1:1 na **Tabela 17**, no qual se encontrou maior concentração de AGL.

Tabela 18. Produção de lipídios totais, AO, AL e AGL em cultivos de *M. circinelloides*, em farinha de soja, por 144 horas a 25 °C, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (CG 1:1 p/p). Legenda: LT: lipídios totais; CG: canola:gergelim.

Casca de Arroz	pH	LT mg/g substrato	g/Kg Bioproduto			mg AGL/g LT
			AO	AL	AGL	
Sem óleo						
3:1	5,94	47,1±2,2d	21,3±6,2	27,1±7,8	3,0±0,4b	9,6±1,2a
3:2	5,89	38,4±0,6c	30,5±8,5	34,3±2,3	4,4±1,6c	13,8±3,7b
3:3	5,86	11,0±2,7a	20,3±4,0	17,8±2,2	2,7±1,5a	14,3±6,8b
Com óleo						
3:1	5,88	47,6±7,7d	30,2±2,2	43,5±3,3	5,3±1,6d	18,9±8,9b
3:2	5,91	27,6±8,3b	29,9±0,6	38,7±2,4	8,4±0,9e	36,3±3,8c
3:3	5,82	32,0±4,3b	15,7±5,0	19,6±1,9	4,6±2,8c	14,8±8,2b

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A concentração de AGL nos substratos acrescido de casca de arroz e de óleos vegetais na proporção 1:1 aumentou em 35,5% (8,4 g AGL.Kg⁻¹ Bioproduto) comparado-se ao AGL encontrado na **Tabela 17** (6,2 g AGL.Kg⁻¹ Bioproduto). A concentração de AGL (mg.g⁻¹ LT) aumentou 39,6% quando acrescido de CA 3:2 mais adição de óleos vegetais. A análise de variância e o teste de Tukey empregados a este cultivo demonstraram que houve

diferenças significativas ao nível de 5%. Pode-se atribuir a estes resultados o fato de que não há uma relação entre concentração de LT no substrato e concentração de AGL nos LT, podendo ser ou não obtidos em altas concentrações de grandes proporções de LT. Konova et al. (1988) relataram que há correlação entre o grau de insaturação de lipídios e a soma de lipídios no micélio, onde o grau de insaturação diminui com o decréscimo do conteúdo de lipídios e, que, alta concentração de lipídios, bem como, o alto conteúdo de AGL está relacionado ao baixo conteúdo de lipídios (HANSSON e DOSTALEK, 1988). Emelyanova (1997) relatou que o grau de insaturação e o conteúdo de AGL aumentaram nos LT, durante a fase de crescimento do fungo juntamente com o acúmulo de lipídios e diminuiu durante a fase estacionária de crescimento, quando o conteúdo de lipídios na biomassa permaneceu quase constante.

A concentração relativa de AGL nos LT e Bioproduto (**TABELA 19**) demonstrou que no cultivo de *M. circinelloides*, ao aumentar os valores nutricionais do substrato ou de LT, diminuiu a proporção de ácidos graxos saturados nos lipídios e aumentou as proporções de AGI. Segundo alguns autores, este ácido pode ser nutricionalmente melhor disponíveis na alimentação e tendo funções biológicas nos mamíferos controlando as concentrações de colesterol e lipoproteína *a* no plasma sanguíneo (KRIS-ETHERTON et al., 1999; CALDER e GRIMBLE, 2002; MURANO, 2003).

Tabela 19. Porcentagem relativa de lipídios totais e AGL nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, por seis dias a 25 °C, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (CG 1:1 p/p). Legenda: LT lipídios totais; CG: canola;gergelim.

Casca de Arroz	% LT (p/p)	% AGL/ LT (p/p)	% AGL/ Bioproduto (p/p)
Sem óleo			
3:1	4,75	3,04	2,26
3:2	2,75	4,29	2,64
3:3	3,10	13,04	1,35
Com óleo			
3:1	4,71	5,95	3,97
3:2	3,83	15,77	5,00
3:3	3,20	4,77	1,71

Certik et al. (2006) adicionaram óleos vegetais em vários cereais utilizados como substrato e verificaram o aumento da superfície de crescimento fúngico e de AGL nos bioprodutos em torno de 14,3% (p/p). Nos substratos sem adição de grãos de malte houve a formação de massa compacta afetando a respiração microbiana e interferindo negativamente no uso do substrato. Conseqüentemente ocorreu o uso incompleto do substrato e menos obtenção de lipídios com baixo conteúdo de AGL (STREDANSKI et al., 2000). Esses mesmos autores relataram que cerca de 40% do óleo no substrato foi convertido a óleo fúngico quando acrescido de grãos de malte e óleo de linhaça obtendo produção de 8,2% (p/p) de AEP e de 6,0% (p/p) de AA. Conti et al. (2001) adicionaram grãos de malte ao substrato de cevada acrescido de óleo de amendoim e observaram que o AL presente no meio serviu como precursor para aumentar o conteúdo de AGL obtendo 13,4 mg AGL.mg⁻¹ substrato (13,8% p/p), portanto, a adição de grandes quantidades de óleo vegetal diminuiu a concentração de AGL, onde provavelmente o óleo não foi metabolizado pelo microrganismo.

5.6 Influência da Temperatura no Cultivo de *M. Circinelloides* (Linhagem M1) para Produção de Ácidos Graxos Insaturados

As diferentes temperaturas testadas para avaliar a conversão dos AGI presentes no substrato em AGL foram estudadas de acordo com as informações contidas na literatura, sobre o efeito da dessaturação dos ácidos graxos saturados à insaturados como forma de adaptação do microrganismo em temperaturas cardeais, sendo que, a membrana citoplasmática tende a se tornar mais rígida ou flexível conforme a quantidade de AGI presente em sua constituição (MURATA e LOS, 1997).

Diferentemente dos resultados encontrados em experimentos realizados em CSm (DYAL e NARINE, 2005), o perfil dos ácidos graxos obtidos em CSS não pôde ser considerado como produto da biossíntese de ácidos graxos devido à presença de grandes quantidades de ácidos graxos saturados (AGS) e AGI no substrato. Este perfil é alterado durante o crescimento microbiano sendo que ácido graxo, como AGL, que antes não estava presente nos lipídios da farinha de soja, é sintetizado utilizando, provavelmente, como precursores os ácidos graxos monoinsaturados ou diinsaturados, como AO ou AL.

Durante o período de crescimento de *M. circinelloides* foram observadas alterações no perfil de desenvolvimento do fungo no substrato. A temperatura ótima de

crescimento manteve-se em 25 °C, na qual se observou maior crescimento do fungo e consumo de LT do substrato (27,6 mg.g⁻¹ Bioproduto) (TABELA 20), não havendo diferenças no perfil de desenvolvimento descrito na seção 5.3. O crescimento do fungo em temperatura de 10 °C foi lento, onde o crescimento micelial na superfície do substrato foi observado após 72 horas de cultivo. A esporulação nesta temperatura foi observada após 96 horas de cultivo. Não houve distinção entre o crescimento de *M. circinelloides* nas temperaturas de 15 °C e 20 °C comparado ao consumo de LT do substrato (47,0 e 45,0 mg.g⁻¹ de Bioproduto, respectivamente). Observou-se maior formação de micélio na superfície do substrato no cultivo a 15 °C e a esporulação foi observada após 72 horas. Quando utilizada a temperatura de 20 °C foi observada esporulação após 48 horas de cultivo. No cultivo utilizando temperatura de 30 °C foi observada intensa formação de micélio na superfície do substrato e esporulação em 24 horas de cultivo. Esta temperatura não influenciou no consumo de LT do substrato comparado as temperaturas de 15 °C e 20 °C. A análise de variância (TABELA 23) demonstrou que houve diferenças significativas entre as temperaturas analisadas ao nível de 5%, quanto ao consumo de LT pelo fungo durante o período de crescimento.

Tabela 20. Lipídios totais extraídos de farinha de soja acrescido com casca de arroz (3:2 p/p), suplementado com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) após o cultivo de *M. circinelloides*, em diferentes temperaturas, durante 144 horas. Legenda: LT: lipídios totais.

Temperatura °C	LT (mg.g ⁻¹ Bioproduto)	% LT (p/p)
10	71,7±5,5	7,17
15	47,0±2,9	4,70
20	45,0±5,9	4,50
25	27,6±8,3	2,76
30	49,5±7,7	4,95

Houve diferença quanto ao perfil dos ácidos graxos durante o CSS comparado ao encontrado em CSm (JANG et al., 2005). A concentração de AGS (AP e AE) nos cultivos realizados em temperatura de 10 °C foi superior à encontrada nos cultivos realizados em

temperatura de 30 °C. Com o aumento da temperatura observou-se decréscimo destes AGS até a temperatura de 30 °C de aproximadamente 50 % (TABELA 21). Esta variação foi encontrada tanto nos LT (mg.g^{-1} LT e g.Kg^{-1} Bioproduto), quanto nas porcentagens relativas.

O AO foi o maior AGI encontrado nos substratos cultivados nas temperaturas testadas. A maior concentração deste ácido graxo no bioproduto foi encontrada utilizando a temperatura de 10 °C, obtendo $130,34 \text{ g.Kg}^{-1}$ de bioproduto (45,64 % p/p). Nos LT a maior concentração de AO foi encontrada quando utilizada a temperatura de 15 °C, obtendo $148,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de LT (37,92 % p/p). A menor concentração foi encontrada utilizando temperatura de 25 °C (FIGURA 20). Nesta temperatura, foi obtido $29,91 \text{ g.Kg}^{-1}$ de bioproduto (17,91 % p/p). O teor de AO nos LT na temperatura de 25 °C foi de $125,7 \text{ mg.g}^{-1}$ de LT (55,53 % p/p) (FIGURA 21). Não foi observada diferença significativa entre as temperaturas de cultivo para a obtenção de AO nos LT, portanto, sua concentração variou entre os teores de lipídios obtidos dos substratos conforme houve aumento na temperatura de cultivo (TABELA 21).

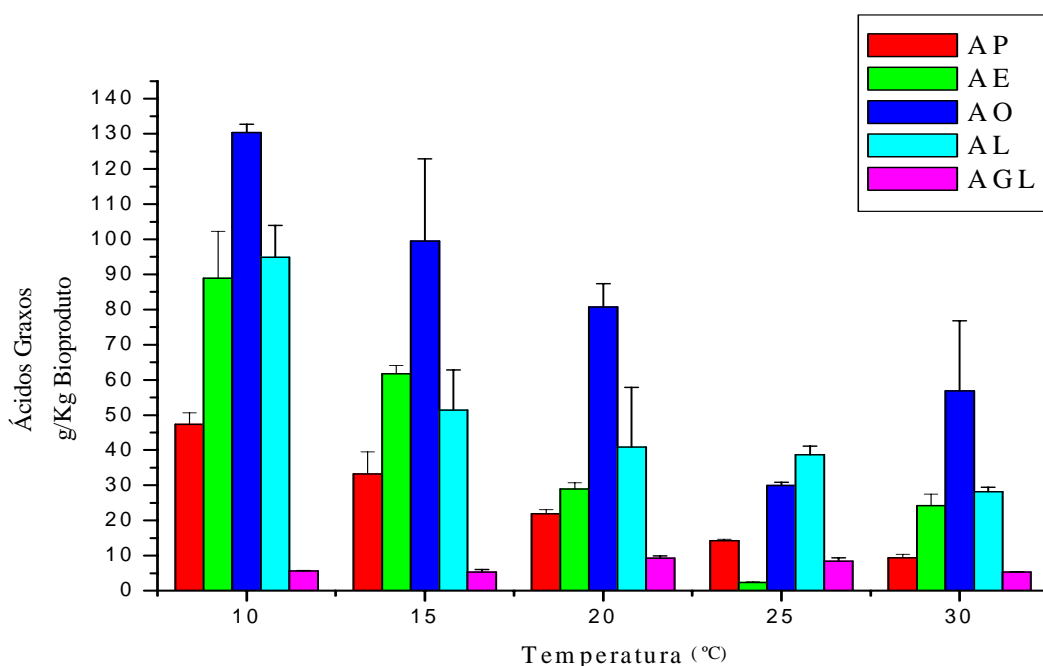


Figura 20. Efeito da temperatura sobre o perfil de ácidos graxos em farinha de soja acrescida de casca de arroz (3:2 p/p) e suplementada com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) cultivado por *M. circinelloides*, após 144 horas. Legenda: AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AGL: ácido gama linolênico.

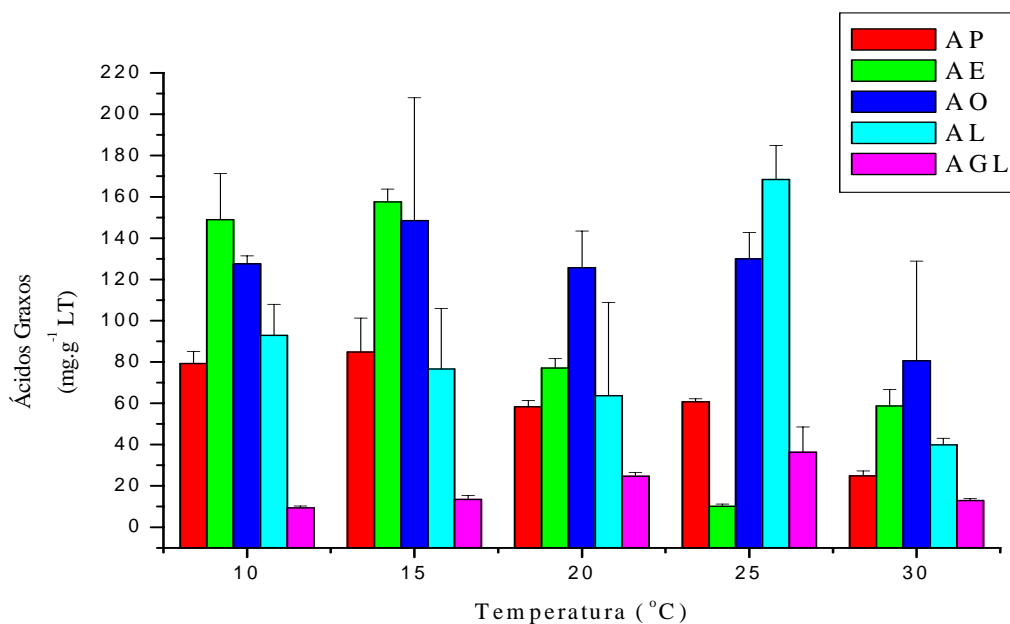


Figura 21. Efeito da temperatura sobre o perfil de ácidos graxos nos lipídios totais obtidos do cultivo de *M. circinelloides* em farinha de soja acrescida de casca de arroz (3:2 p/p) e suplementada com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p), após 144 horas. Legenda: LT: lipídios totais; AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AGL: ácido gama linolênico.

O AL apresenta-se como a maior proporção da fração lipídica. Os resultados demonstram que o AL foi obtido em maior quantidade somente na temperatura de 25 °C (38,7 g.Kg⁻¹ Bioproduto e 70,53 % nos LT). Nas demais temperaturas, o AL foi a terceira maior proporção de ácido graxo variando de 9,80% – 33,23% (p/p de Bioproduto) e 9,60% – 19,56% (p/p LT). Estes valores corresponderam a um decréscimo de 40,83% comparado ao teor de AL encontrado no substrato controle (**TABELA 15**) com o teor de AL encontrado no bioproduto cultivado a 25 °C. Na temperatura de 30 °C, houve decréscimo de aproximadamente 62% de AL encontrado nos LT. O perfil de AL encontrado apresentou características distintas quanto ao perfil dos ácidos graxos encontrado em fungos filamentosos utilizando CSm ou CSS (JANG et al., 2000; JANG et al., 2005). Estes resultados estão relacionados ao fato de que *M. circinelloides* é potencialmente produtora de lipases, que promoveriam a utilização dos lipídios como precursor para a produção de AGL (GEMA et al., 2002).

Tabela 21. Porcentagem relativa de ácidos graxos nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, após 144 horas em diferentes temperaturas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (C:G 1:1 p/p). Legenda: LT: lipídios totais; AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AGL: ácido gama linolênico.

Temperatura (°C)	Porcentagem (mg.g ⁻¹ LT)					Porcentagem (g.Kg ⁻¹ Bioproduto)				
	AP	AE	AO	AL	AGL	AP	AE	AO	AL	AGL
10	13,26	24,93	21,34	15,53	1,55	16,57	31,14	45,64	33,23	1,96
15	21,97	40,24	37,92	19,56	3,44	11,64	21,61	34,86	17,98	1,86
20	15,52	20,55	33,49	16,94	6,58	7,65	10,13	28,72	10,11	3,25
25	25,92	4,34	21,82	28,17	15,52	4,97	0,83	17,91	23,18	5,00
30	6,03	14,24	19,55	9,67	3,13	3,26	8,47	19,9	9,86	1,86

O AGL variou de acordo com o aumento da temperatura tendo a maior produção entre as temperaturas de 20 °C e 25 °C (9,28 g.Kg⁻¹ Bioproduto e 8,42 g.Kg⁻¹ Bioproduto, respectivamente), não havendo diferença significativa ao nível de 5 % (**TABELA 26**). A concentração de AGL nos LT foi de 24,7 mg.g⁻¹ de LT e 36,3 mg.g⁻¹ de LT, correspondendo a 6,58 % e 15,5 % nas temperaturas de 20 °C e 25 °C, respectivamente.

Pode-se observar que os conteúdos de AO e AL diminuíram conforme houve a produção de AGL. O conteúdo de AGL decresceu aproximadamente 35% nos LT quando comparou-se o resultado obtido a 25 °C em relação àquele verificado a 30 °C. Entre as temperaturas de 20 °C e 25 °C as diferenças de AGL no Bioproduto foram de 1,25% e 8,92%, respectivamente, nos LT. Estudos realizados em CSm utilizando diferentes temperaturas têm demonstrado que as melhores temperaturas de crescimento, produção e acumulação de AGL estão entre 20 °C e 28 °C (CARVALHO et al., 1999; CONTI et al., 2001; GUI-YOU et al., 2004).

Jang et al. (2005) utilizaram CSm cultivado com *M. alpina* testando diferentes temperaturas para produção de AGI. Observaram que as melhores temperaturas para formação de biomassa variaram entre 15 °C e 25 °C (6,0 – 7,2 g.L⁻¹). Temperaturas acima de 25 °C houve decréscimo na formação de biomassa e, conseqüentemente, decréscimo no acúmulo de lipídios na biomassa. A acumulação de AGI aumentou com o decréscimo da temperatura. Os maiores valores de AL e AGL foram obtidos em temperatura de 12 °C (131,4 mg. L⁻¹ e 164,9 mg. L⁻¹, respectivamente). Ahamed et al. (2006) observaram que as maiores

concentrações de AGL foram encontradas utilizando temperaturas de 25 °C (6,9 % biomassa) e 20 °C (8,2 % biomassa).

Na **Tabela 22** e **Figuras 22** e **23** estão os resultados dos LT e ácidos graxos encontrados nos cultivos utilizando as temperaturas de 20 °C e 25 °C durante 144 horas, baixando-a para 12 °C mantendo-se por 24 horas.

A composição de LT encontrada no bioproduto em que a temperatura de cultivo inicial foi de 20 °C seguida pelo decréscimo para 12 °C (**TABELA 22**) resultou em redução de aproximadamente 47% nos LT comparado com a composição de LT encontrada nos cultivos realizados em temperatura de 20 °C (**TABELA 20**). Foi observada diferença significativa entre o teor de LT obtida tanto no substrato cultivado em temperatura de 20 °C como no substrato cultivado em temperatura de 25 °C seguido de 12 °C por vinte e quatro horas (20,92 mg.g⁻¹ e 23,14 mg.g⁻¹ de Bioproduto, respectivamente) (**TABELAS 22** e **26**).

Tabela 22. Lipídios totais extraídos de farinha de soja acrescida com casca de arroz (3:2 p/p), suplementado com óleo de canola e óleo de gergelim 2 % (1:1 p/p) durante o cultivo de *M. circinelloides*, em temperatura de 20 °C e 25 °C após 144 horas, seguido de 12 °C por 24 horas. Legenda: LT: lipídios totais.

Temperatura °C	LT (mg.g ⁻¹ Bioproduto)	% LT (p/p)
20 °C – 12 °C	20,92±4,3	2,09
25 °C – 12 °C	23,14±6,1	2,31

A mudança de temperatura para 12 °C por 24 horas durante o período de cultivo alterou o perfil dos ácidos graxos tanto em temperatura de 20 °C como em 25 °C. Esta alteração se dá devido à adaptação dos ácidos graxos de membrana para baixas temperaturas, ocorrendo dessaturação dos AGS à AGI tornando a membrana mais flexível na menor temperatura (SUUTARI e LAASKO, 1994).

Tabela 23. Análise da variância para a produção de LT da linhagem M1 para o modelo fatorial considerando como fatores de variação sete temperaturas. Legenda: GL = grau de liberdade; SQ = desvio padrão; QM = quadrado médio; F = freqüência de distribuição; Pr = probabilidade.

<i>Causas Variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>
Temperatura	6	406811,33	67801,88	21,20	0,0001
Resíduo	14	44779,47	31385,98		
Total	20	451590,81			

A concentração de AP decresceu de 15,32% (**TABELA 21**) para 10,31% nos LT quando a temperatura foi baixada de 20 °C para 12 °C, e 25,92% (**TABELA 21**) para 19,1% nos LT quando a temperatura de cultivo foi de 25 °C e diminuída para 12 °C (**TABELA 24**). O AE decresceu de 20,55% (77,13 mg.g⁻¹ LT) para 2,41% (24,03 mg.g⁻¹ LT) quando utilizado temperatura de 20 °C diminuída para 12 °C após 144 horas de cultivo. Estes resultados representaram decréscimo de aproximadamente 31% entre os valores de AE. A concentração de AE nos LT, quando utilizado temperatura de 25 °C seguido de 12 °C durante 24 horas, não foi afetada quando analisada nos LT (5,38% nos LT). Entre os AGS AP e AE, mostrado na **Figura 22**, houve decréscimo de aproximadamente 49% (18,02 g.Kg⁻¹ Bioproducto) e 39% (4,19 g.Kg⁻¹ Bioproducto), respectivamente, entre as temperaturas de 20 °C – 12 °C e 25 °C – 12 °C mantida por 24 horas nos lipídios obtidos dos bioproductos. Entre os LT os decréscimos variaram entre 54% e 43% entre o AP (103,78 mg.g⁻¹ LT) e o AE (24,03 mg.g⁻¹ LT), respectivamente, quando utilizado temperatura de 20 °C – 12 °C, mantido por 24 horas (**FIGURA 23**).

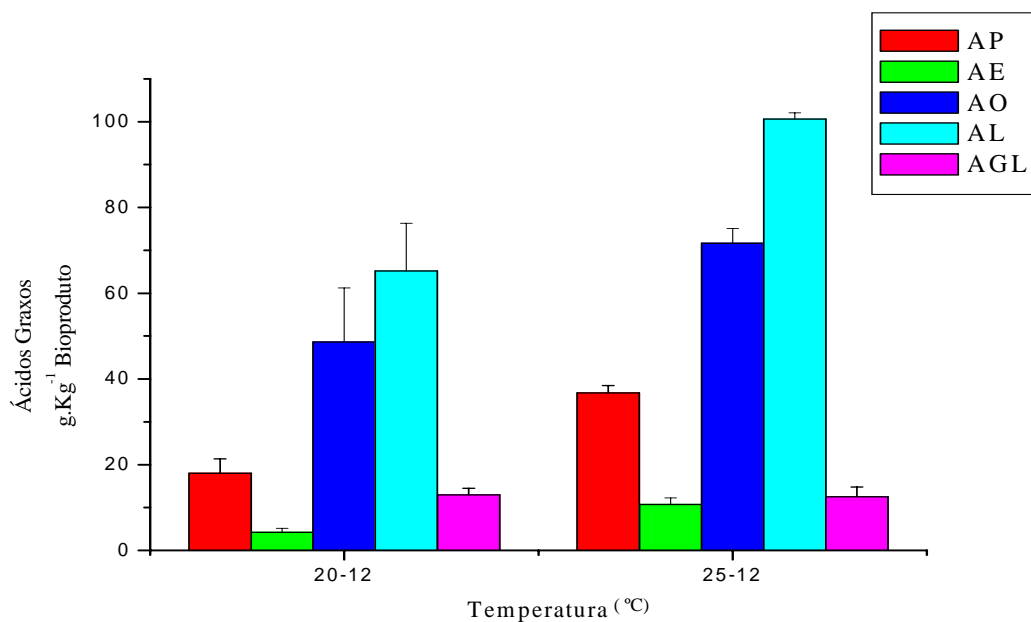


Figura 22. Efeito do ciclo da temperatura sobre o perfil de ácidos graxos em farinha de soja acrescida de casca de arroz (3:2 p/p) e suplementada com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) cultivado por *M. circinelloides*, em temperatura de 20 °C e 25 °C após 144 horas, seguido de 12 °C por 24 horas. Legenda: AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AGL: ácido gama linolênico.

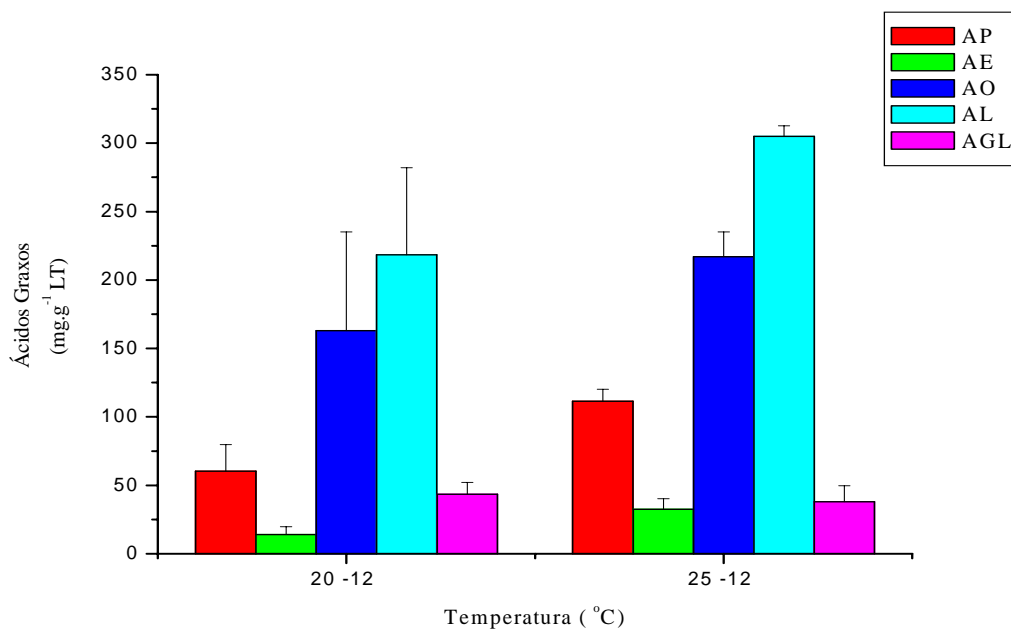


Figura 23. Efeito do ciclo da temperatura sobre o perfil de ácidos graxos nos lipídios totais obtidos do cultivo de *M. circinelloides* em farinha de soja acrescida de casca de arroz (3:2 p/p) e suplementada com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) em 20 °C e 25 °C após 144 horas, seguido de 12 °C por 24 horas. Legenda: LT: lipídios totais; AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AGL: ácido gama linolênico.

Houve redução de aproximadamente 60% do AO (48,63 g.Kg⁻¹ Bioproduto) quando a temperatura de crescimento diminuiu de 20 °C para 12 °C. Em temperatura de 25 °C, houve acréscimo de aproximadamente 140,0% (71,63 g.Kg⁻¹ Bioproduto) quando a temperatura foi de 12 °C, representando 25,10% dos lipídios obtidos do Bioproduto (TABELA 24). Quando comparado à concentração de AO entre os LT houve acréscimo de aproximadamente 102,0% (162,96 mg.g⁻¹ LT) nos cultivos realizados a 20 °C com decréscimo para 12 °C, representando 27,91% nos LT. Nos cultivos realizados a 25 °C houve acréscimo de aproximadamente de 324,0% de AO (217,05 mg.g⁻¹ LT) quando a temperatura foi de 12 °C, representando 37,17% nos LT (TABELA 24). O decréscimo de 25 °C para 20 °C resultou em redução de aproximadamente 48,0% entre o AO nos lipídios do bioproduto e de aproximadamente 33,0% nos LT com decréscimo para 12 °C. Suutari (1995) observou que o grau de insaturação em *Aspergillus niger* aumentou quando houve variação de temperatura de 25 °C para 10 °C. As concentrações de AP e AO aumentaram com a mudança de temperatura de cultivo.

Tabela 24. Porcentagem relativa de ácidos graxos nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, em temperatura de 20 °C e 25 °C durante 144 horas, seguido de 12 °C por 24 horas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (C:G 1:1 p/p). Legenda: LT: lipídios totais; AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AGL: ácido gama linolênico.

Temperatura (°C)	Porcentagem (mg.g ⁻¹ LT)					Porcentagem (g.Kg ⁻¹ Bioproduto)				
	AP	AE	AO	AL	AGL	AP	AE	AO	AL	AGL
20 °C-12 °C	10,31	2,41	27,91	37,41	7,45	6,29	1,47	17,10	22,83	4,55
25 °C-12 °C	19,1	5,58	27,73	38,94	6,51	12,88	3,76	25,10	35,23	4,38

A mudança de temperatura durante os cultivos de *M. circinelloides* resultou no aumento do AL em 44,2% (65,19 g.Kg⁻¹ Bioproduto) quando decresceu de 20 °C para 12 °C, correspondendo a 22,83% nos lipídios do bioproduto. No cultivo a 25 °C com posterior decréscimo para 12 °C houve aumento de aproximadamente 160,0% (100,6 g.Kg⁻¹ Bioproduto) (FIGURA 22). Quanto à concentração de AL nos LT houve acréscimo de

aproximadamente 434,0% (218,43 mg.g⁻¹ LT) e de 360,0% (304,83 mg.g⁻¹ LT) a 20 °C e 25 °C, respectivamente, baixando-a para 12 °C por 24 horas (**FIGURA 23**). O teor de AL foi a maior concentração dos AGI encontrado tanto nos LT como nos bioprodutos utilizando as temperaturas de 20 °C e 25 °C.

Tabela 25. Análise da variância para a produção de AGL da linhagem M1 para o modelo fatorial considerando como fatores de variação sete temperaturas. Legenda: GL = grau de liberdade; SQ = desvio padrão; QM = quadrado médio; F = frequência de distribuição; Pr = probabilidade.

<i>Causas Variação</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>
Temperatura	6	3463,41	577,23	1562,11	0,0001
Resíduo	14	5,17	0,36		
Total	20	3468,59			

Suutari (1995), utilizando *P. chrysogenum*, quando a temperatura foi diminuída de 20 °C para 15 °C observou aumento do AL de 16,6 para 26,7 mg.g⁻¹ de biomassa seca, representando 44,0% da composição dos ácidos graxos totais. Observou que a mudança da composição dos ácidos graxos esteve relacionada com a alteração do crescimento do microrganismo com a variação da temperatura. Jang et al. (2000) também verificaram alteração na composição do AL cultivado a 20 °C durante 120 horas e 12 °C durante 72 horas.

Tabela 26. Resultados da aplicação do teste Tukey 5% nos cultivos da linhagem M1 para temperatura. Legenda: AGL: ácido gama-linolênico.

Temperatura (°C)	Grupo de Tukey	
	AGL g.Kg⁻¹ Bioproduto	AGL mg.g⁻¹ LT
10	A	A
15	A	B
20	B	C
25	B	D
30	A	B
20 – 12	C	D
25 – 12	C	E

A composição de AGL variou de acordo com a mudança da temperatura para 12 °C, mantida por 24 horas. A concentração de AGL aumentou aproximadamente 49,0% no bioproduto e 33,0% nos LT em cultivo a 25 °C e aproximadamente 39,0% no bioproduto e 55,0% nos LT a 20 °C quando as temperaturas foram baixadas para 12 °C e nela mantido por 24 horas. Na **Figura 22**, pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre as composições de AGL nos cultivos a 20 °C e 25 °C, sendo suas composições de 4,55% e 4,38% nos bioprodutos (12,97 g.Kg⁻¹ Bioproduto e 12,51 g.Kg⁻¹ Bioproduto), respectivamente. A composição de AGL nos LT foi significativamente diferente quando produzido em cultivo a 20 °C e 25 °C, ambas posteriormente decrescidas para 12 °C obtendo-se 7,45% e 6,51%. Estes valores corresponderam, respectivamente a 43,48 mg.g⁻¹ de LT e 37,92 mg.g⁻¹ de LT (**FIGURA 23**), correspondendo a um aumento de 118,0% e 153,5%, respectivamente, em relação aos valores encontrados nos cultivos onde não houve decréscimo da temperatura.

Carvalho et al. (1999) estudaram a produção de AGL cultivando linhagens de *Mucor* sp a 28 °C, posteriormente decrescendo para 12 °C. Observaram que as proporções de AGL dos ácidos graxos totais aumentaram 15,90% seguidas pela depleção das fontes de carbono e suplemento de energia. O efeito da mudança de temperatura foi observado por outros autores analisando o aumento de AGI (JANG et al., 2000). Esses estudaram o efeito do incremento de AEP e AA cultivando *M. alpina* a 20 °C durante 120 horas e a 12 °C durante 120 horas. Esses observaram nestas condições um incremento de 125,8 mg.g⁻¹ de substrato e de 26,93 mg.g⁻¹ de substrato de AEP e AA, respectivamente.

O aumento dos AGI do substrato cultivado com *M. circinelloides* em temperaturas baixas (12 °C) foi de 41,14% comparado com o cultivo em temperatura de 25 °C, correspondendo a 184,7 g.Kg⁻¹ de Bioproduto, e de 25,1% em temperatura de 20 °C, correspondendo a 146,7 g.Kg⁻¹ de Bioproduto. A concentração dos AGI nos LT corresponderam a um aumento de 67,25% comparado a temperatura de 25 °C, correspondendo a 526,4 mg.g⁻¹ de LT, e de 240,9% comparado à temperatura de 20 °C, correspondendo a 424,8 mg.g⁻¹ de LT.

Singh e Ward (1997) relataram que o aumento da síntese de AGI em temperaturas baixas, observada em microrganismos, é devido ao aumento da solubilidade do oxigênio em CSm disponibilizando-o para as enzimas dessaturases. Em CSS a baixa temperatura pode ter efeitos semelhantes dado que os cultivos são realizados em níveis de umidade de aproximadamente 70%, mantendo uma disponibilidade de água suficiente para que possa ocorrer o desenvolvimento do microrganismo. Carvalho et al. (1999) relataram que

a acumulação de ácidos graxos insaturados em temperatura baixa pode ser uma alternativa para aumentar a biossíntese de AGI, em especial AGL, na qual utiliza para este processo proteínas carregadoras de *acil* (PCA), acetil coenzima A, NADH₂ e NADPH₂. Jang et al. (2005) relataram que baixas temperaturas estimulam a produção de ácidos graxos altamente insaturados como AGL, AA e AEP. Nesses estudos utilizando *M. alpina* foi verificada mudança na composição de ácidos graxos com respeito à temperatura. Geralmente o grau de insaturação aumentou com o decréscimo da temperatura, sendo este efeito notado principalmente sobre o AGL.

5.7 Influência de Diferentes Concentrações de Esporos para Produção de Ácidos Graxos Insaturados

Os teores de LT encontrados nos substratos utilizando diferentes concentrações de esporos (TABELA 27) foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). A concentração de $2 \cdot 10^7$ esporos.mL⁻¹ foi a que produziu maior concentração de LT no substrato (20,9 mg.g⁻¹ Bioproduto). A segunda melhor concentração foi de $5 \cdot 10^5$ esporos.mL⁻¹ obtendo-se 16,8 mg.g⁻¹ de Bioproduto. Tanto a concentração de $3 \cdot 10^6$ como de $3 \cdot 10^8$ esporos.mL⁻¹ apresentaram teores de aproximadamente 13 mg.g⁻¹ de LT nos Bioproduto.

Tabela 27. Lipídios totais extraídos de farinha de soja acrescida com casca de arroz (3:2 p/p), suplementado com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) durante o cultivo de *M. circinelloides*, em temperatura de 20 °C durante 144 horas, seguido de 12 °C por 24 horas, utilizando diferentes concentrações de esporos. Legenda: LT: lipídios totais.

Inóculo (Esporos.mL ⁻¹)	LT (mg.g ⁻¹ Bioproduto)	% LT (p/p)
$5 \cdot 10^5$	16,8±3,9b	1,68
$3 \cdot 10^6$	12,9±2,0a	1,20
$2 \cdot 10^7$	20,9±4,3c	2,09
$3 \cdot 10^8$	12,7±1,9a	1,26

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O estudo com diferentes concentrações de esporos tem sido realizado em trabalhos visando à produção de enzimas e proteínas (QINNGHE et al., 2004; SIMÕES, 2006). Em estudos verificando a produção de AGI tem sido pouco analisado a variação de esporos (GUI-YOU et al., 2004). Pode-se observar que o aumento de esporos inoculados nos substratos aumentou o conteúdo tanto de AGI como de AGS. A maior proporção de AGI encontrada nos bioprodutos foi de $182,3 \text{ g.Kg}^{-1}$ (18,23% p/p) juntamente com o aumento de AGS ($59,1 \text{ g.Kg}^{-1}$ Bioproduto, 5,91% p/p), utilizando 3.10^8 esporos.mL⁻¹. O AO foi o maior constituinte da composição de ácidos graxos encontrado nos bioprodutos, correspondendo a $99,7 \text{ g.Kg}^{-1}$ de Bioproduto (34,9% p/p), nesta concentração (**TABELA 28**). A menor proporção de AO foi encontrada utilizando 2.10 esporos.mL⁻¹ representando $48,6 \text{ g.Kg}^{-1}$ de Bioproduto (17,10% p/p). O AL foi o segundo maior constituinte representando $68,4 \text{ g.Kg}^{-1}$ de Bioproduto (23,96% p/p), não havendo diferença quando comparado com a concentração de esporos 2.10^7 esporos.mL⁻¹ ($65,2 \text{ g.Kg}^{-1}$ Bioproduto, 22,83% p/p). Utilizando suspensão de 5.10^5 esporos.mL⁻¹, o AL representou a menor proporção no bioproduto ($27,1 \text{ g.Kg}^{-1}$ Bioproduto, 9,51%). Nestas proporções, observa-se que tanto AO como AL não foram influenciadas pelo aumento da concentração da suspensão de esporos. Este efeito também pode ser observado no conteúdo de AGS que também variaram independentemente da concentração de esporos.

A quantidade de AGL nos bioprodutos apresentou diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5%, em relação ao acréscimo da concentração de esporos, tendo variação de 1,76% a 4,95%. Assim, o maior conteúdo de AGL ($14,2 \text{ g.Kg}^{-1}$ Bioproduto, 4,95% p/p) foi obtido utilizando 3.10^8 esporos.mL⁻¹ (**TABELA 28**). As maiores concentrações na suspensão de esporos tornam-se, portanto, inviáveis quando se consideram as quantidades de esporos e de substrato utilizado.

Tabela 28. Teor de ácidos graxos nos bioprodutos e porcentagem relativa nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, em temperatura de 20 °C durante 144 horas, seguido de 12 °C por 24 horas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (CG 1:1 p/p), utilizando diferentes concentrações de esporos. Legenda: AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AGL: ácido gama linolênico.

Inóculo (esporos.mL ⁻¹)	g.Kg ⁻¹ Bioproduto				
	AP	AE	AO	AL	AGL
5.10 ⁵	14,9±4,9 5,25%	12,4±3,5 4,35%	63,1±19,4 21,73%	27,1±12,1 9,51%	5,0±2,2a 1,76%
3.10 ⁶	26,2±6,9 9,18%	23,4±3,7 8,19%	93,5±11,7 32,75%	54,9±16,4 19,21%	9,7±2,7b 3,38%
2.10 ⁷	18,0±3,4 6,29%	4,2±1,0 1,47%	48,6±12,6 17,10%	65,2±11,1 22,83%	12,9±1,5c 4,55%
3.10 ⁸	35,1±10,3 12,31%	24,0±24,0 8,43%	99,7±9,9 34,9%	68,4±12,2 23,96%	14,2±3,5d,c 4,95%

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O conteúdo de AGS nos LT utilizando 2.10⁷ esporos.mL⁻¹ foi inferior comparado às outras concentrações. Na concentração de 3.10⁸ esporos.mL⁻¹ foi encontrado maior conteúdo de AGS representando 20,74% dos LT obtido após o cultivo de *M. circinelloides*. Na concentração de esporos de 2.10⁷ esporos.mL⁻¹ houve produção de 7,76% (p/p), sendo a menor proporção de AGS nos LT. Quanto aos AGI houve produção de 753,7 mg.g⁻¹ de LT utilizando 3.10⁸ esporos.mL⁻¹, representando 75,37% dos LT, seguido pela concentração de esporos 3.10⁶ esporos.mL⁻¹, representando 74,09% (741,1 mg.g⁻¹ LT). A menor proporção de AGI nos LT foi encontrada utilizando concentração de esporos de 5.10⁵ esporos.mL⁻¹ obtendo-se 388,5 mg.g⁻¹ LT, representando 33,0% (p/p).

O conteúdo de AO nos LT variou independente das concentrações de esporos utilizadas no estudo. A maior proporção deste ácido graxo foi encontrada na concentração de esporos de 3.10⁶ esporos.mL⁻¹, obtendo 43,89% (p/p) representando 438,9 mg.g⁻¹ de LT. A segunda maior proporção de AO foi utilizando 3.10⁸ esporos.mL⁻¹ obtendo-se 41,27% nos LT (412,7 mg.g⁻¹ LT). A menor proporção de AO foi encontrada na concentração de esporos de 2.10⁷ esporos.mL⁻¹ representando 42,35% (p/p de LT) que compreende 162,9 mg.g⁻¹ LT (TABELA 29).

A composição de AL nos LT foi distinta do encontrado no AO. A maior quantidade de AL, $282,9\text{mg.g}^{-1}$, foi encontrada no LT, no cultivo a partir de inóculo contendo 3.10^8 esporos.mL⁻¹, correspondendo a 28,29%. Na segunda maior proporção de AL, obteve-se $257,2\text{ mg.g}^{-1}$ de LT, correspondendo a 25,70% dos LT. Na concentração de 2.10^7 esporos.mL⁻¹ foi obtido $218,4\text{ mg.g}^{-1}$ de LT (21,80% p/p) (TABELA 29). A menor proporção de AL foi encontrada também na menor concentração de esporos ($112,8\text{ mg.g}^{-1}$ LT; com 5.10^5 esporos.mL⁻¹, respectivamente).

As proporções de AGL não corresponderam ao aumento da concentração de esporos como apresentado na Tabela 28. Apesar da menor proporção de AGL ter sido encontrada em 5.10^5 esporos.mL⁻¹ ($17,4\text{ mg.g}^{-1}$ LT; 1,74% p/p LT) e a maior proporção em 3.10^8 esporos.mL⁻¹ ($58,1\text{ mg.g}^{-1}$ LT, 5,81% p/p), a segunda maior proporção de AGL foi encontrada na concentração de 3.10^6 esporos.mL⁻¹ representando 4,50% p/p dos LT ($45,0\text{ mg.g}^{-1}$ LT) e diferenças significativas entre os testes aplicados ao nível de 5% (TABELA 29).

Tabela 29. Produção de ácidos graxos nos lipídios totais e porcentagem relativa de ácidos graxos nos cultivos realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, em temperatura de 20 °C durante 144 horas, seguido de 12 °C por 24 horas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (CG 1:1 p/p), utilizando diferentes concentrações de esporos. Legenda AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AGL: ácido gama linolênico.

Inóculo (esporos.mL ⁻¹)	mg.g ⁻¹ LT				
	AP	AE	AO	AL	AGL
5.10⁵	122,0±35,1 12,02%	51,7±25,2 5,1%	258,3±48,6 25,8%	112,8±86,8 11,28%	17,4±6,1a 1,74%
3.10⁶	122,9±64,4 12,2%	109,0±34,2 10,95%	438,9±108,2 43,89%	257,2±152,1 25,70%	45,0±25,7b 4,50%
2.10⁷	60,3±19,5 6,03%	14,0±5,7 1,40%	162,9±72,2 16,22%	218,4±63,6 21,80%	43,5±8,6b,c 4,35%
3.10⁸	145,4±72,9 14,54%	99,3±70,4 9,93%	412,7±70,6 41,27%	282,9±86,8 28,29%	58,1±24,6b,d 5,81%

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Gui-you et al. (2004) observaram que a melhor concentração de esporos inoculada para a produção de AGL em arroz glutinoso foi utilizando $4,90.10^6$ esporos.mL⁻¹, na qual obtiveram 2,4% de AGL nos LT. Observaram que o aumento da concentração do inóculo diminuiu a concentração de AGI no substrato se não otimizado o tempo de cultivo.

5.8 Influência da Otimização das Condições de Cultivo de *M. circinelloides* sobre a Produção de Ácidos Graxos Insaturados

Após todos os passos para otimizar a produção de AGL ter sido realizado, analisou-se o tempo de cultivo de *M. circinelloides* em temperatura de 20 °C seguida por temperatura de 12 °C por 24 horas. As amostras colhidas a partir de 72 horas de cultivo mostraram que houve decréscimo contínuo dos LT dos substratos, acentuando-se a partir de 120 horas de cultivo (**TABELA 30**). Esta característica pode estar relacionada a um melhor aproveitamento dos lipídios do substrato através da liberação de lipases. A concentração de LT em 72 horas foi de 50,10 mg.g⁻¹ de substrato decrescendo para 12,70 mg.g⁻¹ de substrato com 144 horas de cultivo. Emelyanova (1996) relatou que o teor de LT nos substratos cultivados com *C. japonica* decresceu à medida que o período de cultivo se prolongava, utilizando os LT do substrato para a formação de biomassa e/ou conversão dos ácidos graxos do substrato em ácidos graxos microbiano.

Tabela 30. Lipídios totais extraídos de farinha de soja acrescida com casca de arroz (3:2 p/p), suplementado com óleo de canola e óleo de gergelim 2% (1:1 p/p) após o cultivo de *M. circinelloides*, em temperatura de 20 °C, seguido de 12 °C por 24 horas. Legenda: LT: lipídios totais.

Tempo (Horas)	LT (mg.g ⁻¹ Bioproduto)	% LT (p/p)
72	50,10±1,71c	5,01
96	41,03±5,90b	4,10
120	15,14±0,86a,e	1,51
144	12,70±1,92a,d	1,26

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O conteúdo de AGS nos bioprodutos decresceu com desenvolvimento microbiano durante os períodos de cultivos. O maior conteúdo de AGS foi obtida durante 72 horas de cultivo ($141,2 \text{ g.Kg}^{-1}$ Bioproduto, correspondendo a 10,58% p/p), enquanto que o menor conteúdo foi encontrado durante 144 horas de cultivo ($59,1 \text{ g.Kg}^{-1}$ Bioproduto, correspondendo a 20,65% p/p). Nos LT o menor conteúdo foi obtido durante 144 horas de cultivo seguido por 72 horas ($182,3 \text{ g.Kg}^{-1}$ e $192,3 \text{ g.Kg}^{-1}$ Bioproduto, respectivamente). O maior conteúdo foi obtido durante 96 horas de cultivo obtendo $492,4 \text{ mg.g}^{-1}$ de LT (33,19% p/p) (**TABELA 30**).

Quanto aos AGI, o maior conteúdo foi obtido com 72 horas de cultivo ($338,2 \text{ g.Kg}^{-1}$ Bioproduto, 33,82% p/p) e o menor conteúdo obtido com 120 horas de cultivo obtendo-se $69,9 \text{ g.Kg}^{-1}$ de Bioproduto (5,24% p/p). O segundo maior conteúdo de AGI foi obtido com 96 horas de cultivo, no qual se obteve $120,8 \text{ g.Kg}^{-1}$ de Bioproduto (9,06% p/p) (**TABELA 31**). Nos LT foram encontrados $827,3 \text{ mg.g}^{-1}$ (82,75% p/p) de AGI durante 120 horas de cultivo. O menor conteúdo de AGI foi obtido durante 72 horas de cultivo obtendo-se 47,56% p/p nos LT ($461,2 \text{ mg.g}^{-1}$ LT). Após 96 horas de cultivo obteve-se $803,6 \text{ mg.g}^{-1}$ de LT de AGI, representando o segundo maior conteúdo nos LT. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para a produção de AGL nos bioprodutos durante o período e cultivo ao nível de 5% de significância aplicando o teste de Tukey, com exceção do cultivo com 120 horas, o qual obteve-se $17,1 \text{ g.Kg}^{-1}$ de Bioproduto (**TABELA 31**).

Tabela 31. Produção de ácidos graxos nos lipídios dos bioprodutos e porcentagem relativa de ácidos graxos nos cultivos de *M. circinelloides* realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, em temperatura de 20 °C, seguido de 12 °C por 24 horas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (CG 1:1 p/p). Legenda: AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AGL: ácido gama linolênico.

Tempo (Horas)	g.Kg ⁻¹ Bioproduto				
	AP	AE	AO	AL	AGL
72	76,7±0,3 5,75%	64,5±12,5 4,83%	32,3±4,7 24,22%	146,9±14,6 11,01%	13,1±3,6a 4,56%
96	71,6±3,9 5,36%	49,4±27,6 3,70%	278,6±58,2 20,87%	148,7±44,5 11,14%	15,7±4,7a 5,14%
120	46,2±9,1 3,46%	23,7±3,4 1,78%	178,5±18,9 13,37%	130,8±13,4 9,80%	17,1±1,9a,b 5,96%
144	35,1±10,3 12,31%	24,0±24,0 8,43%	99,7±9,9 34,9%	68,4±12,2 23,96%	14,2±3,5a 4,95%

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Entre os AGI, o AO manteve-se como o maior constituinte entre os ácidos graxos. Durante o período de cultivo, a maior produção nos bioprodutos ocorreu com 96 horas de cultivo (278,6 g.Kg⁻¹ Bioproduto) tendo decréscimo até 144 horas chegando a 99,7 g.Kg⁻¹ de Bioproduto (34,9% p/p) (**TABELA 31**). A maior proporção de AO nos LT também foi obtida com 96 horas de cultivo (493,9 mg.g⁻¹ LT) (**TABELA 32**). O AL manteve o mesmo perfil do AO durante o período de cultivo.

A maior concentração de AL foi obtida também com 96 horas de cultivo onde obteve-se 148,7 g.Kg⁻¹ de Bioproduto, com 11,14% (**TABELA 31**). Nos LT, a maior concentração de AL foi obtida em 72 horas de cultivo obtendo-se 351,9 mg.g⁻¹ de LT, correspondendo a 35,91% dos LT. A segunda maior concentração foi obtida com 120 horas de cultivo na qual se obteve 330,9 mg.g⁻¹ de LT, com 33,10% p/p de LT (**TABELA 32**).

Tabela 32. Produção de ácidos graxos nos lipídios dos bioprodutos e porcentagem relativa de ácidos graxos nos cultivos de *M. circinelloides* realizados em farinha de soja acrescida de casca de arroz, em temperatura de 20 °C por seis dias, seguido de 12 °C por 24 horas, com adição de casca de arroz e suplementação com óleos vegetais 2% (CG 1:1 p/p). Legenda: LT: lipídios totais; AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oléico; AL: ácido linoléico; AGL: ácido gama linolênico.

Tempo (Horas)	mg.g ⁻¹ LT				
	AP	AE	AO	AL	AGL
72	183,7±0,8 18,37%	154,5±30,0 15,45%	77,4±11,3 7,74%	351,9±34,9 35,91%	31,9±8,7a 3,91%
96	127,0±11,5 12,70%	87,6±8,9 8,76%	493,9±70,7 49,39%	263,6±30,4 26,36%	46,0±13,9b 4,60%
120	116,6±69,2 11,66%	57,9±25,9 5,79%	450,9±144,2 45,10%	330,9±102,2 33,10%	45,5±4,1b,c 4,55%
144	145,4±72,9 14,54%	99,3±70,4 9,93%	412,7±70,6 41,27%	282,9±86,8 28,29%	58,1±24,6b,d 5,81%

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferiram pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O tempo de cultivo após a otimização do processo de cultivo foi reduzido em 24 horas a produção de AGL. Tal redução está relacionada com a adição de casca de arroz ao substrato, com a redução da temperatura e com o aumento da concentração de esporos. O conteúdo de AGL foi de 17,1 g.Kg⁻¹ de Bioproduto, correspondendo a 5,96% com 120 horas de cultivo (**TABELA 31**). A concentração nos LT foi de 45,5 mg.g⁻¹ de LT, correspondendo a 4,55% nos LT, sendo que a maior concentração foi encontrada com 144 horas de cultivo (58,1 mg.g⁻¹ LT), correspondendo a 5,81%. Esta diferença é devido ao teor de LT extraído durante 120 horas de cultivo (15,14 mg.g⁻¹ LT) comparado com o teor de LT obtido com 144 horas de cultivo (12,70 mg.g⁻¹ LT). A concentração de AGL nos LT foi maior durante 144 horas de cultivo, diferentemente do encontrado na **Tabela 31**, obtendo-se 58,1 g.mg⁻¹ dos LT, havendo diferenças significativas com os demais dias de cultivo ao nível de 5% aplicando-se o teste de Tukey.

Gui you et al. (2004) observaram que o AGL começou a ser acumulado após 24 horas de cultivo com picos de produção com 54 horas, utilizando arroz glutinoso cultivado com *C. japonica*. Dyal e Narine (2005) relataram que, em cultivos realizados em CSm alimentado, a produção de AGI, como AA, aumenta com o tempo de cultivo, sendo que foi

observado aumento na proporção relativa de triacilgliceróis e diferenças nas proporções de estearil ester dos lipídios neutros, não havendo diferenças nos lipídios polares. Ahamed et al. (2006) estudaram a produção de AGL em CSm e observaram que a maior produção ocorreu com 168 horas de cultivo, obtendo 5,8% de AGL dos ácidos graxos totais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos estudos realizados em cultivo submerso, selecionou-se a linhagem M1 de *Mucor circinelloides* isolada do solo de área de caatinga para os experimentos realizados com substratos sólidos de origem vegetal, por apresentarem maior produção de ácido gama-linolênico, naquelas condições. Houve crescimento distinto do fungo nos diferentes substratos testados, produzindo esporos em tempos distintos. Dentre os substratos utilizados, verificou-se que a farinha de soja e o farelo de trigo foram melhores para cultivo da linhagem M1.

No cultivo de *M. circinelloides* em farinha de soja houve constante decréscimo no conteúdo de ácido linoléico, o qual pode ter sido utilizado como precursor para a biossíntese de ácido gama-linolênico, pois este teve produção crescente durante as 144 horas de cultivo. Em todos os substratos utilizados, observou-se decréscimo do conteúdo de lipídios totais, provavelmente, devido à ação de enzimas lipolíticas, provavelmente, para obtenção de

energia de crescimento microbiano. Acrescenta-se que o perfil dos ácidos graxos insaturados, durante 168 horas de cultivo, foi alterado havendo incremento de 430,5% para ácido oléico, após 144 horas de cultivo, quando comparado ao substrato controle.

A suplementação da farinha de soja com óleos vegetais 2% (óleo de canola:óleo de gergelim 1:1 p/p) no cultivo da linhagem M1 acarretou em acréscimo do conteúdo de ácido gama-linolênico após 144 horas de cultivo, porém compactando o substrato e dificultando seu uso por este fungo, impedindo melhor crescimento deste microrganismo. Agregando-se casca de arroz (3:2 acrescido de óleo de canola:óleo de gergelim 1:1 p/p) à este substrato suplementado, observou-se melhor aproveitamento do substrato impedindo sua compactação e, portanto, formação de possíveis regiões de anaerobiose. Estas dificultariam o processo, principalmente em escalas maiores. Nestas condições, obteve-se acentuada produção de ácido gama-linolênico e menor teor de lipídios totais no substrato.

Observou-se que diferentes temperaturas de cultivo influenciaram nos conteúdos de ácidos graxos saturados e ácidos graxos insaturados, metabolismo ligado à ação da ativação de enzimas. Na temperatura de 10° C houve maiores teores de lipídios totais, ácidos graxos saturados, ácido oléico e ácido linoléico, enquanto que a 25° C houve menores teores de lipídios totais, ácidos graxos saturados, ácido oléico e maior teor de ácido linoléico. Estes resultados foram intimamente ligados à temperatura de crescimento do fungo, juntamente a melhor utilização do substrato e provavelmente com a ativação de enzimas ligadas ao seu metabolismo. Verificou-se que durante os crescimentos do fungo em temperaturas de 20° C e 25° C, seguidas de decréscimo para 12° C por 24 horas, houve maior produção de ácido gama-linolênico no cultivo realizado durante 144 horas. Na literatura encontra-se citado que tais conversões foram realizadas por meio de enzimas dessaturases juntamente com acetil coenzima A (CoA), proteína carregadora de *acil* (PCA) e NADH₂ e NADPH₂ como forma de adaptação da membrana citoplasmática do microrganismo para se desenvolver em temperaturas baixas (CARVALHO et al., 1999).

A combinação do uso de inóculo com suspensão de esporos a 10⁸, com a temperatura de cultivo a 20° C até 120 horas, seguido de 12° C por 24 horas e o uso de substrato suplementado com óleo vegetal (casca de arroz 3:2 acrescido de óleo de canola:óleo de gergelim 1:1 p/p) reduziu 24 horas do processo, encontrando a produção máxima de 17,1 g.Kg⁻¹ de ácido gama-linolênico no bioproduto. Nestas condições de cultivo, pôde-se obter redução de 48 horas na produção de ácidos graxos da família w-6 (ácido linoléico e ácido gama-linolênico) correspondendo a 164,4 g.Kg⁻¹ e 278,6 g.Kg⁻¹ de ácido oléico no bioproduto.

A quantidade de ácidos graxos saturados (ácido palmítico e ácido esteárico) encontrada foi de 69,9 g.Kg⁻¹ de bioproduto (174,5 mg.g⁻¹ nos lipídios totais) em 120 horas de cultivo.

A aplicação do processo em escalas maiores de produção deve ser investigada utilizando diferentes modelos de reatores para avaliar o rendimento real e custo/viabilidade do processo de produção. Estudos comparativos de incremento do substrato com fontes alternativas de w-6, aceitação do produto para ração, testes de digestibilidade e ganho de peso e valor nutricional do produto final devem também ser elaborados com o propósito de reduzir os custos de produção e obter um alimento mais saudável com baixos teores de colesterol.

A farinha de soja foi selecionada por ser a principal fonte protéica de origem vegetal em rações para peixes e frangos devido a sua disponibilidade no mercado e pelo elevado valor nutricional. A utilização de microrganismos em produtos e subprodutos agroindustriais, que ajudam na digestibilidade de certos nutrientes, tem sido aplicada em diferentes substratos como alternativa de seu enriquecimento, podendo tornar o processo mais economicamente viável em termos de aplicação de enzimas, reduzindo compostos que prejudicam a absorção de alguns nutrientes, como fitato presente na soja, e acentuando a disponibilidade de nutrientes que antes não estavam presentes no substrato original (GARCIA et al., 2000; SILVA et al., 2005).

5. REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH, Y.R.; OLAMA, Z.A. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, London, **38**, 115-122, 2002.

ABU, O.A.; TEWE, O.O.; LOSEL, D.M.; ONIFADE, M A.A. Changes in lipid, fatty acids and protein composition of sweet potato (*Ipomoea batatas*) after solid-state fungal fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, **72**, 182-192, 2000.

AGGELIS, G.; PAPADIOTIS, G.; KOMAITIS, M. Microbial fatty acid specificity. **Folia Microbiologica**, Praha, **42** (2), 117-120, 1997.

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

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4 ed., New York: John Wiley e Sons, 1996. 869p.

ALLMAN-FARINELLI, M. A.; GOMES, K.; FAVALORO, E.J.; PETOCZ, P. A diet rich in high-oleic-acid sunflower oil favorably alters low-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and factors VII coagulant activity. **Journal American Dietetic Association**, Chicago, **105** (7), 1071-1079, 2005.

ANDRADE, V.S.; SARUBBO, L.A.; FUKUSHIMA, K. Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, **33** (2), 106, 2002.

ANTCZAK, T.; PATURA, J.; SZCZESNA-ANTCZAK, M.; HILER, D.; BIELECKI, S. Sugar ester synthesis by a mycelium-bound *Mucor circinelloides* lipase in a micro-reactor equipped with activity sensor. **Journal Molecular Catalysis**, Lausanne, **29**, 155-161, 2004.

ASCHERIO, A.; WILLETT, W.C. Health effects of *trans* fatty acids. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, **66**, 1006S-1010S, 1997.

AUED-PIMENTEL, S.; CARUSO, M.S.F.; CRUZ, J.M.M.; KUMAGAI, E.E.; CORRÊA, D.U.O. Ácidos graxos saturados *versus* ácidos graxos *trans* em biscoitos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, **62** (2), 131-137, 2003;

BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A.N. An endo β -1-4 xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biotechnological characterization. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, **29**, 328-334, 2001.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos: lípidios**. Cap. 2, 2ª. Ed., 175-269, 1992.

BIANCHI, G.; BURGUEÑO, J.; ABELLA, D.F.; ROSARIO, G.G.; CESAR, C.R.; JONES, G. Post weaning feeding management and performance of merino ewes grazing on natural and improved pastures at mating season. **Ciência Rural**, Santa Maria, **31** (1), 2001.

BIESEBEKE, R.T.E.; RUIJTER, G.; RAHARDJO, YSP. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations, Progress report on a multi-disciplinary project. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, **2**, 245-248, 2002.

BIJL, H.L.; WOLF, J.H.; SCHAAP, A.; VISSER, J.M.J. Microbial polyunsaturated fatty acid containing oil from pasteurized biomass. US Patent no. 5340594. 2001.

BINKOSKI, A.E.; KRIS-ETHERTON, P.M.; WILSON, T.A.; MOUNTAIN, M.L.; NICOLOSI, R.J. Balance of unsaturated fatty acids is important to a cholesterol-lowering diet: comparison of mid-oleic sunflower oil and olive oil on cardiovascular disease risk factors. **Journal American Dietetic Association**, Chicago, **105** (7), 1080-1086, 2005.

BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M.E.; PADIELLA, S.S.; CANTERO, D.; Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, Toronto, **36** (6), 527-543, 2003.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, Toronto, **37** (8), 911-917, 1959.

- BONONI, V.L. **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biológicas**. 1999. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 184p.
- BOTHA, A.; KOCK, J.L.F.; COETZEE, D.J.; BOTES, P.J. Physiology properties and fatty acid composition in *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*. **Antonie van Leeuwenhaek**, Amsterdam, **71**, 201-206, 1997.
- BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C.R.; CHRISTEN, P.; REVAH, S. Fruit aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in a solid cultures from agro-industrial wastes. **Review Microbial**, New York, **28**, 208-212, 1998.
- BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SOCCOL, C.R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme Microbiology Technology**, New York **27**, 127-133, 2000.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução ANVISA. RDC 360/03, de 23 de dezembro de 2003. **Diário Oficial da União**. Brasília, de 26 de dezembro de 2003.
- BUARRAJ, M.C.; SDEPANIAN, V.L.; SPERIDIÃO, P.G.L.; FAGUNDES NETO, U. Terapia nutricional na doença inflamatória intestinal. **The Electronic J. of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases**, **8** (4), 2004. Disponível em: <http://www.e-gastroped.com.br/deco4/indexdec04.htm>. Acesso em: 08/01/2007.
- CALDER, P.C.; GRIMBLE, R.F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **European Journal Clinical Nutrition**, London, **56** (3), 514-519, 2002.
- CAMPOS, A.R.N.; SANTANA, R.A.C.; DANTAS, J.P.; OLIVEIRA, L.S.C.; SILVA, F.L.H. Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju por cultivo semi-sólido, **Revista Biologia Ciência**, Santa Maria, **5** (2), 2005.
- CARVALHO, P.O. **Produção de ácido gama linolênico por nova linhagem de *Mucor sp* e estudo das condições de fermentação**. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1994.
- CARVALHO, P.O.; OLIVEIRA, J.G.; PASTORE, G.M. Enhancement of gamma-linolenic acid production by the fungus *Mucor* SP LB-54 by growth temperature. **Revista Microbiologia**, São Paulo, **30**, 170-175, 1999.
- CASTILHO, L.R.; MEDRONHO, R.A.; ALVES, T.L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, **71**, 45-50, 2000.
- CASTRO, A.P.M.; JACOB, C.M.A.; PASTORINO, A.; GRUMACH, A.S. Ácidos graxos na dermite atópica: etiopatogenia e terapêutica. **Pediatria**, Rio de Janeiro, **17** (2), 79-85, 1995.
- CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal Bioscience Bioengineering**, **87** (1), 1-14, 1999.

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

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a gás**. 2 ed. Oxford: Pergamon Press, 207p. 1982.

CHAUDHURI, S.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D.K.; BANDYOPADHYAY, S. Effect of mustard meal on the production of arachidonic acid by *Mortierella alengata* SC-208. **JAOCs**, Chicago, **75** (8), 1998.

CHRISTIE, W.W. (Ed.). **Lipid analysis**. Oxford: Pergamon Press, 1982. cap. 3, p. 25-49: Chromatographic and spectroscopic analysis of lipids: general principles.

CHEN; H.C.; LIU, T.M. Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulta*. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, **21**, 137-142, 1997.

CHEN, H.; XU, F.; LI, Z. Solid-state production of biopulp by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded wheat straw as substrate. **Bioresource Technology**, Essex, **81**, 261-263, 2002.

CHOWDARY, G.V.; PRAPULLA, S.G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. **Process Biochemistry**, London, **38**, 393-397, 2002.

COLIN, A.; REGGERS, J.; CASTRONOVO, V.; ANSSEAU, M. Lipids, depression and suicide. **Encephale**, Paris, **29** (1), 49-58, 2003.

CONTI, E.; STREDANSKY, M.; STREDANSKA, S.; ZANETTI, F. γ -linolenic acid production by solid-state fermentation of mucorales strains on cereals. **Bioresource Technology**, Essex, **76**, 283-286, 2001.

CORDIAN, L. Cereal grains: humanity's double-edged sword. **World Review Nutrition Dietetic**, Basel, **84**, 19-73, 1999.

COURI, S.; TERZI, S.C.; PINTO, G.A.S.; FREITAS, S.P.; COSTA, C.A. Hydrolitic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, London, **36**, 255-261, 2000.

DAMASO, M.C.T.; ANDRADE, C.M.M.C.; PEREIRA JR, N. Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lonuginosus* IOC-4145. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, **84** (86), 821-835, 2000.

DRENOVSKY, R.E.; ELLIOTT, G.N.; GRAHAM, K.J.; SCOW, K.M. Comparison of phospholipids fatty acid (PFLA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, New York, **36**, 1793-1800, 2004.

DU PREEZ, J.C.; IMMELMAN, M.; KOCK, J.L.C.; KILIAN, S.G. Production of gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides* and *Mucor rouxii* with acetic acid as carbon substrate. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, **17** (9), 933 – 938, 1995.

DU PREEZ, J.C.; IMMELMAN, M.; KOCK, J.L.F.; KILIAN, S.G. The effect of acetic acid concentration on the growth and production of gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides* CBS 203.28 in fed-batch culture. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, **13**, 81-87, 1997.

DYAL, S.D.; NARINE, S.S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food Research International**, Toronto, **38**, 445-467, 2005.

EMELYANOVA, E. γ -linolenic acid production by *Cunninghamella japonica* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, **31** (5), 431-434, 1996.

EMELYANOVA, E.V. Lipid and γ -linolenic acid production by *Mucor inaquisporus*. **Process Biochemistry**, London, **32** (3), 173-177, 1997.

EROSHIN, V.K.; SATROUTDINOV, A.D.; DEDYUKHINA, E.G.; CHISTYAKOVA T.I. Arachidonic acid production by *Mortierella alpine* with growth-coupled lipid synthesis. **Process Biochemistry**, London, **35**, 1171-1175, 2000.

FAKAS, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Compositional shifts in lipids fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, **40**, 1321-1327, 2007.

FENG, K.C.; LIU, B.L.; TZENG, Y.M. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. **Bioproduction Engineering**, Kobe, **23**, 25-29, 2000.

FENICE, M.; SERMANNI, G.G.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, **100**, 77-85, 2003.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, Maryland, **226**, p. 497-509, 1957.

FRASURE-SMITH, N.; LESPÉRANCE, F.; JULIEN, P. Major depression is associated with lower omega-3 fatty acid levels in patients with recent acute coronary syndromes. **Biology Psychiatry**, New York, **55**, 891-896, 2004.

GARCIA, E.R.M.; MURAKAMI, A.E.; BRANCO, A.F.; FURLAN, A.C.; MOREIRA, I. Efeito da Suplementação Enzimática em Rações com Farelo de Soja e Soja Integral Extrusada sobre a Digestibilidade de Nutrientes, o Fluxo de Nutrientes na Digesta Ileal e o Desempenho de Frangos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, **29** (5), 1414-1426, 2000.

GAWANDE, P.V.; KAMAT, M.Y. Production of xylanases by immobilized *Aspergillus sp.* Using lignocellulosic waste. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, **16**, 111-112, 2000.

GEMA, H.; KAVADIA, A.; DIMOU, D.; TSAGOU, V.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, **58**, 303-307, 2002.

GILL, C.O.; HALL, M.J.; RATLEDGE, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida 107*) growing on glucose in single-stage continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, New York, **33** (2), 231-239, 1977.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part I: occurrence, biological activities and application. **Trends Biotechnology**, Cambridge, **15**, 401-409, 1997.

GOMES, D.J.; GOMES, J.; STEINER, W. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, **33**, 87-94, 1994.

GÓMEZ, A.M.; OSSA, E.M. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, **88**, 103-109, 2002.

GRAHAM, J.H.; HODGE, N.C.; MORTON, J.B. Fatty acids methyl esters profiles for characterization of Glomealean fungi and their endomycorrhizae. **Applied Environmental Microbiology**, New York, **61** (1), 58-64, 1995.

GRAHAM, T.O.; KANDIL, H.M. Nutritional factors in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinical Nutrition American**, **31**, 203-218, 2002.

GUI-YOU, L.; SHENG, Y.; CHUAN-CHAO, D. Factors affecting γ -linolenic acid content in fermented glutinous rice brewed by *Rhizopus sp.* **Food Microbiology**, London, **21**, 299-304, 2004.

HADDADIN, M.S.; ABDULRAHIM, S.M.; AL-KHAWALDEH, G.Y.; ROBINSON, R.K. Solid state fermentation of waste pomace from olive processing. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, Oxford, **74**, 613-618, 1999.

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 Environmental Microbiology**, New York, **33** (3), 577-584, 1977.

HANSSON, L.; DOSTALEK, M. Effect of culture condition on mycelial and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, **28**, 240-246, 1988.

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, New York, **90** (1), 420-426, 1978.

HEIPIEPER, H.J.; MEULENBELD, G.; van OIRSCHOT, Q.; BONT, J.A.M. Effect of Environmental factors on the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. **Applied Environmental Microbiology**, New York, **62** (8), 2773-2777, 1996.

HERBERT, R.A.; KEITH, S.M. Microbiological production of essential fatty acids. United States Efamol 4851343. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/4851343.html>. Acesso em: 15/03/2007

HIGASHIYAMA, K.; YAGUCHI, T.; AKIMOTO, K.; FUJIKAWA, S.; SHIMIZU, S. Effects of mineral addition on the growth morphology of and arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. **JAOCS**, Chicago, **75** (12), 1815-1819, 1997.

HIGASHIYAMA, K.; YAGUCHI, T.; AKIMOTO, K.; FUJIKAWA, S.; SHIMIZU, S. Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. **JAOCS**, Chicago, **75** (11), 1501-1505, 1998.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, **64**, 175-186, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion Microbiology**, Oxford, **8**, 310-306, 2005.

HORAKOVA, K.; GREIFOVA, M.; SEEMANNOVA, Z.; GONDOVA, B.; WYATT, G. M.A. Comparison of the traditional method of counting viable cells and a quick microplate method for monitoring the growth characteristic of *Listeria monocytogenes*. **Letters Applied Microbiology**, London, **38**, 181-184, 2003.

HORNUNG, E.; KORFEI, M.; PERNSTICH, C.; STRUSS, A.; KINDL, H.; FULDA, M.; FEUSSNER, H. Specific formation of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by a front-end Δ^5 - desaturase from *Phytothora megasperma*. **Biochimica Biophysica**, Amsterdam, **1686**, 181-189, 2005.

HUANG, Y.S.; PEREIRA, S.L.; LEONARD, A.E. Enzyme for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Biochemical**, London, **86**, 793-798, 2004.

ILUYEMI, F.B.; HANAFI, M.M.; RADZIAH, O.; KAMARUDIN, M.S. Fungal solid state culture of palm kernel cake. **Bioresource Technology**, Essex, **97** (3), 447-482, 2006.

IMMELMAN, M.; du PREEZ, J.C.; KILIAN, S.G. Effect of C:N ration on gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* grown on acetic acid. *System. Applied Microbiology*, Washington, **20**, 158-164, 1997.

IWASHITA, K. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokio, **62**, 1938-1946, 2002.

JANG, H.D.; LIN, Y.Y.; YANG, S.S. Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpina* by substrate fermentation. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, **41**, 41-48, 2000.

JANG, H.D.; LIN, Y.Y.; YANG, S.S. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. **Bioresource Technology**, Essex, 2005.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland. 6^a ed., p. 635. 2000. Chapter 7: Fermentation and Fermented Dairy Food. pp, 113-130.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, **11**, 1-5, 2000

JEFFERY, J.; KOCK, J.L.F.; BOTHA, A.; COETZEE, D.J.; BOTES, P.J.; NIGAM, S. Enhanced sunflower oil utilization and gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* CBS 108.16 in presence of acetate. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, **13**, 357-358, 1997.

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

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

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAFKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Performance of an intermittent agitations rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, Essex, **86**, 207-213, 2003.

KATCH, F. I.; McARDLE, W. D. **Nutrição, exercício e saúde**. 4^a.ed. Rio de Janeiro. Medsi, 1996.

KENNEDY, M.J.; READER, S.L.; DAVIES, R.J. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. **Biotechnology Bioengineering**, New York, **42**, 625-634, 1993.

KENNY, F.S.; PINDER, S.E.; ELLIS, I.O.; GEE, J.M.W.; NICHOLSON, R.I.; BRYCE, R.P.; ROBERTSON, J.F.R. Gamma linolênico acid with tamoxifen as primary therapy in breast cancer. **International Journal Cancer**, New York, **85**, 643-648, 2000.

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

KONOVA, I.V., SULTANOVICH, Y., PANKINA, O.I., RUDAKOVA, I.V. Unsaturation of *Cunninghamella japonica* lipids in connection with physiological peculiarities of the fungus development. **Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiologiya**, Moscow, **24**, 542-548, 1988.

KRIS-ETHERTON, P.M.; PEARSON, T.A.; WAN, Y.; HARGROVE, H.; MORIARTY, K.; FISHELL, V.; ETHERTON, T. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma

cholesterol and triacylglycerol concentrations. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, **70**, 1009-1015, 1999.

KRIS-ETHERTON, P.M.; TAYLOR, D.S.; YU-POTH, S.; HUTH,P.; MORIARTY, K.; FISHELL, V.; HARGROVE, R.L.; ZHAO, G.; ETHERTON, T.D. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, **71**, 179S-188S, 2000.

KRISHNA, C. Solid state fermentation systems. **An Overview Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, **25** (12), 1-30, 2005.

LEITE, C.E. **Nutrição e doença: um estudo da conexão entre alimentos e moléstias**. Ibrasa, São Paulo, SP, 1999, 2 ed., p. 72-85.

LEMAN, J. Oleaginous microorganisms: An assessment of potential. **Advances Applied Microbial**, New York, **43**, 195-243, 1997.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2a. ed. São Paulo, Sarvier, 1995, 839p.

LISOWSKA, K.; PALEXZ, B.; DLUGONSKI, J. Microcalorimetry as a possible tool for phenanthrene toxicity evaluation to eukaryotic cells. **Thermochemical Acta**, Amsterdam, **411**, 181-186, 2004.

LOGAN, A. C. Omega-3 fatty acids and major depression: a primer for the mental health professional, *Lipids Health Disease*, 3(25), 2004. Disponível em: [http:// www.lipidworld.com](http://www.lipidworld.com)

MADIGAN; M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo, Printice Hall., 10ª ed., 608 pp., 2004.

MANCINI FILHO, J.; CHEMIN, S. Implicações nutricionais dos ácidos graxos *trans*. **Óleos & Grãos**, São Caetano do Sul, **31**, 41-45, 1996.

MARGOLLES-CLARK, E.; IHNEN, M.; PENTTIÄ, M. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon source. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, **57**, 167-179, 1997.

MARQUES, B.C.; BARGA, M.C.; BALMANT, W.; LUZ, F.L.D.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A. A model of the effect of the microbial biomass on the isotherm of the fermentation solids in solid-state fermentation. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, **44**, 457-463, 2006.

MARÍN, S.; RAMOS, A.; SANCHIS, V. Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *International Journal Food Microbiology*, London, **99**, 329-341, 2005.

MARTIN, C.A.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E. Ácidos graxos *trans*: implicações nutricionais e fontes na dieta. **Revista Nutrição**, Rio de Janeiro, **17** (3), 361-368, 2004.

MARZZOCO, A.; TORRES, G.B. **Bioquímica básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2ª. Ed.; 1999, 360p.

MAYES, P.A.; BOTHAN, K.M. Biosynthesis of Fatty Acids. IN: MURRAY, R.K.; DRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Haper's Illustrated Biochemistry**. McGraw-Hill Companies, Inc., 26ªed., cap. 21, 173-179, 2003 a.

MAYES, P.A.; BOTHAN, K.M. Metabolism of Unsaturated Fatty Acid & Eicosanoids. IN: MURRAY, R.K.; DRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Haper's Illustrated Biochemistry**. McGraw-Hill Companies, Inc., 26ªed., cap. 23, 190-196, 2003 b.

MELETIADIS, J.; MEIS, J.F.G.M.; MOUTON, J.W.; VERWEIJ, P.E. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrition media. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, **32** (2), 478-484, 2001.

MENDONÇA, L. L.A.; PIMENTEIRA, T.A.C. Lipídios em terapia nutricional pediátrica. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**, São Paulo, **16** (4), 135-138, 2001.

MIR, Z.; GOONEWARDENE, L.A.; OKINE, E.; JAEGAR, S.; SCHEER, H.D. Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, **33** (2), 137-143, 1999.

MISRA, A.K.; MISHRA, A.S.; TRIPATHI, M.K.; JAKHMOLA, R.C. Optimization of solid state fermentation of mustard (*Brassica campestris*) straw for production of animal feed by white rot fungi (*Ganoderma lucidum*). **Asian-Australian Journal Animal Sciences**, Seoul, **20** (2), 208-213, 2007.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances Biochemistry Engineering Biotechnology**, Berlin, **68**, 131-138, 2000.

MONDINI, L.; MONTEIRO, C.A. Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira (1962-1988). **Revista Saúde Pública**, São Paulo, **28** (6), 433-439, 1994.

MURANO, P.S. **Understanding food science and technology**. Wadsworth/Thomson Learning, Belmont, CA, USA, pp.71, 2003.

MURATA, N.; LOS, D. Membrane fluidity and temperature perception. **Plant Physiology**, Washington, **115**, 875-879, 1997.

NEMEC, T.; JERNEJC, K.; CIMERMAN, A. Sterols and fatty acids of different *Aspergillus* species. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, **149**, 201-205, 1997.

NWE, N.; CHANDRAKRACHANG, 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**, Barking, **49** (2), 235-237, 2002.

NELSON, J.G. Isolation and purification of lipids from biological matrices. IN: PERKINS, E.G. (Ed.) **Analyses of fats, oils and lipoproteins**. Champing: American Oil Chemists' Society (AOCS), cap. 2, 20-59, 1991.

NUERNBERG, K.; FISCHER, K.; NUERNBERG, G.; KUECHENMEISTER, U.; KLOSOWSKA, D.; ELIMINOWSKA-WENDA, G.; FIEDLER, I.; ENDER, K. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. **Meat Science**, Barking, **70**, 63-74, 2005.

O'BRIEN, D.J.; STINSON, E.E.; WESSINGER, E.W.; SOMKUTI, G.A. Production of eicoseapentaenoic acid from filamentous fungi utilizing lactose as a primary carbon source. US Patent no. 5246842. 1993. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/5246842.html>. Acesso em: 16/03/2007

OOIJKAAS, L.P.; WEBER, F.J.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Tibtech**, London, **18**, 356-360, 2000.

OYAMA, L.M.; ESTADELLA, D.; SILVA, M.S.; SILVA, M.H.G.G.; NASCIMENTO, C.M.O. Metabolismo lipídico. IN: DÂMASO, A. **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Editora Medsi, Rio de Janeiro, RJ, p. 81-88, 2001.

PALMA, M.B.; MARIOTTO, J.R.; FURIGO-JUNIOR, A. Utilização de reatores de coluna para produção de endo β -1,4 xilanase por cultivo em meio sólido. IN: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – **Anais**, DEQ, UFRN, Natal, RN, 2002.

PALMA, M.B.; MILAGRES, A.M.;F.; PRATA, A.M.R.; MANCILHA, I.M. Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. **Process Biochemistry**, London, **31** (2), 141-145, 1996.

PALMA, M.B.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINITIZ, S.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Totowa, **84** (86), 1137-1145, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, CR.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, **35**, 1153-1169, 2000.

PAPACHARILAOU, E.; PISANO, M.A. Changes in the lipid composition of *Paecilomyces persicinus* P-10 M1 during growth and Cephalosporin C production. **Applied Environmental Microbiology**, New York, **48** (6), 1084-1087, 1984.

PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. **Bioresource Technology**, Essex, **95** (3), 287-291, 2004.

PEREIRA, S.L.; LEONARD, A.E.; MUKERJ, P. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Midlothian, **68** (2), 97-106, 2003

PIETERSE, Z.; JERLING, J.C.; OOSTHUIZEN, W.; KRUGER, H.S.; HANEKOM, S.M.; SMUTS, C.M.; SCHUTTE, A.E. Substitution of high monounsaturated fatty acid avocado for

mixed dietary fats during an energy-restricted diet: effects on weight loss, serum lipids, fibrinogen, and vascular function. **Nutrition**, New York, **21**, 67-75, 2005.

PUPIN, A.M.; MESSIAS, C.L.; PIEDRABUENA, D.W. Total lipids and fatty acids of strains of *Metarhizium anisopliae*. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, **31**, 121-128, 2000.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by White-rot fungi *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, London, **39**, 1561-1566, 2004.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrates fermentation. **EJB Electronic Journal Biotechnology**, Valparaiso, **1** (3), 174-184, 1998.

RAHARDJO, Y.S.P.; JOLINK, F.; HAEMERS, S.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Significance of bed porosity, bran and specific surface area in solid-state cultivation of *Aspergillus oryzae*. **Biomolecular Engineering**, New York, **22**, 133-139, 2005.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. **Biotechnology Advances**, Oxford, **24**, 161-179, 2006.

RATLEDGE, C. Single cell oils – have they a biotechnological future? **Trends Biotechnology**, Amsterdam, **11**, 278-284, 1993.

RATLEDGE, C. Yeast, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. IN: Kamel, B.S.; KAKUDA, Y. **Technological advances in improved and alternative sources of lipids**, Blackie Academic and Professional, London, pp.235-291, 1994.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. **Biochemistry Society Trans.**, London, **30** (6), 1047-1050, 2002.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, Paris, **86** (11), 807-815, 2004.

RIBEIRO, L.G.T.; BURKETT, S.L. Efeitos cardiovasculares dos ácidos graxos omega 3: sua importância na prevenção da aterosclerose e da doença coronária. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, São Paulo, **52** (4), 217-225, 1989.

RIDDER, E.R.; NOKES, S.E.; KNUTSON, B.L. Optimization of solid-state fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. **American Society of Agricultural Engineers**, Texas, **42** (6), 1785-1790, 1999.

ROBERT, R.A.; KEITH, S.M. Microbiological production of essential fatty acids. 1989. United States Efamol 4851343. Disponível em: www.freepatentsonline.com/4851343.html. Acesso em: 16/03/2007.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, **55**, 284-289, 2001.

ROCHE, H.M. Unsaturated fatty acids. **Proceedings Nutritional Society**, Wallingford, **58**, 397-401, 1999.

RODRIGUEZ, Z.; BOUCOURT, R.; ELIAS, A.; HERRERA, F.R.; NUNEZ, O. Effect of layer height on the fermentation dynamics of sugarcane (*Saccharum officinarum*) and sweet potato (*Ipomea batata* Lam) mixtures. **Cuban J. Agricultural Science**, La Habana, **40** (2), 161-170, 2006.

ROUKAS, T.; Citric and glucanic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentations. **New Jersey Industrial Microbiology Biotechnology**, New Jersey, **25**, 298-304, 2000.

ROUX, M.P.; KOCK, J.L.F.; BOTHA, A.; DU PREEZ, J.C.; WELLS, G.V.; BOTES, P.J. *Mucor* – a source of cocoa butter and gamma-linolenic acid. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, **10**, 417-422, 1995.

RUEGGER, M. J. S. **Atividade enzimática e produção de ácido γ -linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itains, SP.** (Tese de Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 82p. 2001.

RUESS, L.; HÄGGBLÖM, M.M.; ZAPATA, E.J.G.; DIGHYON, J. Fatty acids of fungi and nematodes – possible biomarkers in the soil food chain? **Soil Biology & Biochemistry**, Kindlington, **34**, 745-756, 2002.

SANDERS, T.A.B. Polyunsaturated fatty acids in the food chain Europe. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, **71**, 176S-178S, 2000.

SAKAMOTO, T.; BRYANT, D.A. Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002. **Molecular Microbiology**, Mississipi, **23**, 1281-1292, 1997.

SCHIPPER, M.A.A.. **On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species.** *Studies in Mycology*, 12, 1-40, 1976.

SENTHILSELVAN, A.; ZHANG, Y.; DOSMAN, J.A.; BARBER, E.M.; HOLFELD, L.E.; KIRYCHUK, S.P.; CORMIER, Y.; HURST, T.S.; RHODES, C.S. Positive human health effects of dust suppression with canola oil in swine barns. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, **156** (2), 410-417, 1997.

SERRANO-CARREON, L.; HATHOUT, Y.; BESOUSSAN, M.; BELIN, J.M. lipid accumulation in *Trichoderma* species. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, **93** (2), 181-187, 1992.

SHOJAOSADATI, S.A.; BABAEIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Process Biochemistry**, London, **37** (8), 909-914, 2002.

SILVA, M.; MANFIO, G.P.; CANHOS, V.P. Characterization of selected strains of mucorales using fatty acid profiles. **Revista Microbiologia**, São Paulo, **29**, 276-281, 1998.

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

SILVA, T.S.C.; FURUYA, W.M.; SANTOS, V.G.; BOTARO, D.; SILVA, L.C.R.; SALES, P.J.P.; HAYASHI, C.; SANTOS, L.D.; FURUYA, V.R.B. Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes do farelo de soja integral sem e com fitase para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, Maringá, **27** (3), 371-376, 2005.

SIMÕES, M.L.G.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. (a) Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automático no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de área de caatinga. **Holos Environment**, Rio Claro, **5** (2), 94-103, 2005 a.

SIMÕES, M.L.G.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Optimization of xylanase biosynthesis by *Aspergillus japonicus* isolated from a "caatinga" area in the Brazilian State of Bahia. **African Journal Biotechnology**, Nairobi, **5** (11), 1135-1141, 2005 b.

SIMOPOULOS, A.P.; LEAF, A.; SALEM Jr., N. Workshop on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. **Journal American College Nutrition**, New York, **18** (5), 487-489, 1999.

SINGH, A.; WARD, O.P. Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). **Advances Applied Microbiology**, New York, **45**, 271-313, 1997.

SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Fruit flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, **35**, 857-861, 2000.

SOMASHEKAR, D.; VENMKATESHWARAN, G.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. **Process Biochemistry**, London, **38**, 1719-1724, 2002.

SOUZA, M.C.O.; ROBERTO, I.C.; MILAGRES, A.M.F. Solid state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, **52**, 768 - 772, 1999.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. **Polytechnisches Journal**, Stuttgart, **232** (5), 461-465, 1879.

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; SALARIS, A. Production of polyunsaturated fatty acids by *Pythium ultimum* in solid-state cultivation. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, **26**, 304-307, 2000 a.

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; STREDANSKA, S.; ZANETTI, F. γ -linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. **Bioresource Technology**, Essex, **73**, 41-45, 2000 b.

SUUTARI, M. Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*), **Archives of Microbiology**, 164 (3), 1995.

SUUTARI, M.; LAASKO, S. Microbial fatty acids adaption and thermal adaptation. **Critical Review Microbiological**, Philadelphia, **20**, 285-328, 1994.

URSIN, V.M.; VOELKER, T.; FROMAN, B. Fatty acid desaturases from fungi. United States Technology 20060156435. 2006. Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/20060156435.html>. Acesso em: 16/03/2007

VALINO, E.L.; ELIAS, A.; TORRES, V.; CARRASCO, T.; ALBELO, N. Improvement of sugarcane bagasse composition by the strain *Trichoderma viride* MS-2 in a solid-state fermentation bioreactor. **Cuban Journal Agricultural Science**, La Habana, **38** (2), 143-150, 2004.

VALSTA, L.M.; TAPANAINEN, H.; MÄNNISTÖ, S. Meat fats in nutrition. **Meat Science**, Barking, **70**, 525-530, 2005.

VANDENBERGHE, L.P.S., SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, 74 (2), 175-178, 2000.

VEGA, E.Z.; GLATZ, B.A.; HAMMOND, E.G. Optimization of banana juice fermentation for the production of microbial oil. **Applied Environmental Microbiology**, New York, **54** (3), 748-752, 1988.

VICINI, G.; MANNICH, M.; CAPALBO, D.F.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R., MITCHELL, D.A. Spore production in solid-station fermentation of rice by *Clanostachys rosea*, a biopesticide for bray mold of strawberries. **Process Biochemistry**, London, 2006.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C.N.; ROMERO-GOMEZ, S.J.; DÍAS-GODINEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemistry Engineering Journal**, Manchester, 13, 157-167, 2003.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, 13, 42-43, 1956.

XIAN, M.; NIE, J.; MEN, Q.; LIU, J.; ZHOU, C.; KANG, Y.; ZHEN, K. production of γ -linolenic acid by disrupted mycelia of *Mortierella isabelina*. **Letters Applied Microbiology**, London, **36**, 182-185, 2003.

WARD, O. Microbial production of long-chain PUFAs. **Informatives**, Columbus, **6**, 683-688, 1995.

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

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

YAQOUB, P.; PALA, HS; CORTINA-BORJA, M.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. Encapsulated fish oil enriched in α -tocopherol alters plasma phospholipids and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. **European Journal Clinical Investigations**, Oxford, **30**, 260-274, 2000.

ZHANG, Q.; LI, M.; MA, H.; SUN, Y.; XING, L. Identification and characterization of a novel Δ^6 – fatty acid desaturase gene from *Rhizopus arrhizus*. **FEBS LETTERS**, Amsterdam, **556** (1-3), 81-85, 2004.

ZHANG, G.; VENKATACHALAM, M.; HAMAKER B.R. Structural basis for the slow digestion property of native cereal starches. **Biomacromolecules**, Washington, **7** (11), 3259 - 3266, 2006.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edoddes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, London, **35**, 825-830, 2000.

ZHU, M.; ZHOU, P.P.; YU, L.J. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. **Bioresource Technology**, Essex, **84**, 93-95, 2002.

ZHU, M.; YU, L.J.; LI, W.; ZHOU, P.P.; LI, C.Y. Optimization of arachidonic acid production by fed-batch culture of *Mortierella alpina* based on dynamic analysis. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, **38**, 735-740, 2006.