

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

MILLENA ARAUJO DE SOUZA SIQUEIRA

**Avaliação da composição nutricional de biomassa fermentada
de aveia em flocos por culturas mistas de fungos filamentosos**

Palmas

2019

MILLENA ARAUJO DE SOUZA SIQUEIRA

Avaliação da composição nutricional de biomassa fermentada de aveia em flocos por culturas mistas de fungos filamentosos

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de pesquisa: Biotecnologia aplicada à indústria de alimentos.

Orientador: Dr. Alex Fernando Almeida.

Coorientadora: Dra. Caroline Roberta Freitas Pires.

Palmas

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- S618a Siqueira, Milena Araujo de Souza .
Avaliação da composição nutricional de biomassa fermentada de aveia em flocos por culturas mistas de fungos filamentosos . / Milena Araujo de Souza Siqueira. – Palmas, TO, 2019.
80 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2019.
Orientador: Alex Fernando Almeida
Coorientadora : Caroline Roberta Freitas Pires
1. Fungos okaginosos. 2. Biomassa fermentada. 3. Cultivo em estado sólido. 4. Cultivo submerso. I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

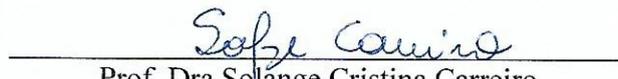
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
MILLENA ARAUJO DE SOUZA SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE BIOMASSA
FERMENTADA DE AVEIA EM FLOCOS POR CULTURAS MISTAS DE
FUNGOS FILAMENTOSOS**

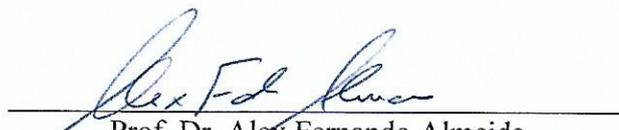
Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 28 de agosto de 2019 pela Banca
Examinadora constituída pelos membros:



Dr. Fabrício de Paula Coutinho
UFT



Prof. Dra Solange Cristina Carreiro
UFT



Prof. Dr. Alex Fernando Almeida
Orientador- UFT

Dedico a ti Deus.

*Toda honra, toda glória e todo louvor
sejam dados a ti.*

AGRADECIMENTOS

Á Deus e seu filho Jesus pelo dom da vida por me guiar a cada dia e por nunca permitir que eu me sentisse sozinha nessa jornada.

Ao meu esposo Gleison que sempre esteve comigo durante todos os desafios e sempre me apoia na realização dos meus sonhos. Te amo infinitamente!

Aos meus pais Claudemiro e Geneci pessoas simples e honestas que sempre me ensinaram o caminho do bem e o valor da educação, que abriram mão de seus próprios sonhos e expectativas para que eu pudesse estudar e ter um futuro melhor. É claro a minha irmã Jakellini, por ser minha primeira “cobaia” de todos os testes da vida por todo carinho e dedicação. Amo vocês 3.000!

Ao meu orientador professor Dr. Alex Fernando de Almeida por me acolher, por toda paciência, ensinamentos e por acreditar em mim, mas principalmente por me dar a oportunidade de conhecer a biotecnologia e a microbiologia. Minha imensa gratidão!

Á Lohana que se tornou minha amiga durante esse processo, obrigada por sempre me estender a mão, os ouvidos e seu conhecimento te admiro pessoal e profissionalmente.

Ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA), por ter sido meu QG durante o desenvolvimento da minha pesquisa. A professora DraClaúdiaCristina Auler do Amaral Santos por todo apoio, incentivo, ensinamento e carinho durante minha estadia no laboratório. A toda família LMA em especial Jéssica Durães, Priscila Furon, Paola Maciel e Ianna Kelly meninas, sem vocês essa caminhada não teria graça, obrigada por cada palavra.

A cada docente do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, quanto aprendizado em cada disciplina! Aos meus colegas de pós-graduação por todo conhecimento compartilhado.

A cada técnico de laboratório e colegas de outros programas de pós-graduação da UFT, que se dispuseram em me ensinar e auxiliar nas análises realizadas.

A UFT por abrir suas portas para minha formação acadêmica desde a graduação.

A CAPES pelo auxílio financeiro durante a realização dos experimentos.

“Deus se deleita em ocultar as coisas; os estudiosos em descobrir as coisas.”

Provérbios 25.2- A Mensagem

RESUMO

O uso de microrganismos em bioprocessos é comum para extração de metabólitos de interesse sendo mais utilizados os fungos. Existem fungos capazes de produzir e acumular ácidos graxos, principalmente os poli-insaturados. As linhagens utilizadas nesse trabalho para produção de lipídios foram *Cunninghamella echinulata*, *Mucor circinelloides* ATCC 38313, *Pleurotus ostreatus*. Testes para determinação do crescimento das linhagens foram realizados para avaliar a influência de nutrientes no crescimento. Posteriormente foi realizado teste de compatibilidade *in vitro* entre as linhagens de fungos filamentosos. As interações entre *M. circinelloides* ATCC 38313 e *C. echinulata* foi do tipo entrelaçamento mútuo em ágar batata dextrose e inibição ao ponto de contato em ágar extrato de malte. A interação *P. ostreatus* e *C. Echinulata* apresentou invasão/substituição em ágar batata dextrose e entrelaçamento parcial em ágar extrato de malte; a interação *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313 apresentou entrelaçamento parcial em ágar batata dextrose e invasão em ágar extrato de malte. Para avaliar a capacidade desses fungos em acumular lipídeo, utilizou-se duas técnicas: o cultivo submerso e o cultivo em estado sólido. Como substrato em cultivo submerso foi utilizado caldo batata dextrose e para cultivo em estado sólido aveia. O cultivo submerso de *C. echinulata* apresentou os maiores teores de lipídeo (34%), seguido por *M. circinelloides* ATCC 38313 (14,33%) e a cultura mista de *C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313 (6,73% de lipídeo) *P. ostreatus* apresentou o menor teor de lipídeo em cultura pura (1,19%) e nas culturas mistas (0,37% e 0,52%). O cultivo em estado sólido apresentou enriquecimento em todas as culturas para os parâmetros fibras e cinzas e maiores teores de proteínas, exceto para cultura pura de *P. ostreatus*. Nos parâmetros carboidratos e quilocalorias houveram reduções quando comparados com o substrato, exceto para a cultura mista de *M. circinelloides* e *C. echinulata*. Os lipídios apresentaram teores de 4,29 % para *C. echinulata* e 3,91% em *M. circinelloides* ATCC 38313, *P. ostreatus* apresentou o menor teor de lipídios (0,11%). A biomassa obtida após fermentação tem potencial para utilização no desenvolvimento de produto alimentício por possuir características de alimento funcional.

Palavras chave: Fungos oleaginosos; biomassa fermentada; parâmetros nutricionais; cultivo em estado sólido; cultivo submerso.

ABSTRACT

The use of microorganisms in bioprocesses is common for extraction of metabolites of interest being the fungi the most used. There are fungi capable of producing and accumulating fatty acids, especially polyunsaturated ones. The strains used in this work for lipid production were *Cunninghamella echinulata*, *Mucor circinelloides* ATCC 38313 and *Pleurotus ostreatus*. The growth rates of strains were performed to evaluate the influence of nutrients on growth. Subsequently, in vitro compatibility test was performed among filamentous fungi strains. The interactions among *M. circinelloides* ATCC 38313 and *C. echinulata* were interleaved in potato dextrose agar and contact point inhibition in malt extract agar. The interaction *P. ostreatus* and *C. echinulata* presented invasion/substitution in potato dextrose agar and partial interlacing in malt extract agar; the interaction *P. ostreatus* and *M. circinelloides* ATCC 38313 presented partial entanglement in potato dextrose agar and invasion in malt extract agar. The ability of these fungi to accumulate lipid was evaluated using two techniques: submerged cultivation and solid-state cultivation. As substrate in submerged cultivation was used potato dextrose broth and for solid-state cultivation oats flakes. Submerged cultivation of *C. echinulata* presented the highest lipid content (34%), followed by *M. circinelloides* ATCC 38313 (14.33%) and mixed culture of *C. echinulata* and *M. circinelloides* ATCC 38313 (6.73% lipid). *P. ostreatus* presented the lowest lipid content in pure culture (1.19%) and in mixed cultures (0.37% and 0.52%). The solid-state cultivation showed enrichment in all cultures for fiber and ash parameters and higher protein contents, except for *P. ostreatus* single culture. For the carbohydrate and kilocalories parameters there was a reduction when compared to the substrate, except for the mixed culture of *M. circinelloides* and *C. echinulata*. Lipids presented 4.29% for *C. echinulata* and 3.91% for *M. circinelloides* ATCC 38313, *P. ostreatus* had the lowest lipid content (0.11%). Biomass obtained after fermentation has potential for use in food product development because it has functional food characteristics.

Keywords: Oleaginous fungi; fermented biomass; nutritional parameters; solid-state cultivation; submerged cultivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de um lipídeo	15
Figura 2. Ácido Linoleico numeração dos átomos de carbono.	17
Figura 3. Representação estrutural ácido oléico e palmitoléico.	18
Figura 4. Representação estrutural dos ácidos linoleico e araquidônico.	18
Figura 5. Estudos publicados nas principais plataformas de busca num período de 10 anos com o indexador "microbial lipidproduction"	22
Figura 6. Estudos publicados nas plataformas Science direct e Google Scholar de 2009-2019 com o indexador "microbial lipidproduction".	22
Figura 7. <i>Cunninghamella echinulata</i> cultivado em ágar batata dextrose	23
Figura 8. <i>Mucor circinelloides</i> CCM 8328, célula contendo ácido graxo.	24
Figura 9. Via biosintética de acumulação de lipídios por fungos filamentosos	26
Figura 10. Cultivo em estado sólido por um fungo filamentoso.	30
Figura 11. Cultivo submerso por um fungo filamentoso.	30
Figura 12. Diagrama esquemático das interações entre duas linhagens diferentes de fungos filamentosos crescidos em ágar batata dextrose e ágar extrato de malte.	38
Figura 13. Extração lipídica de biomassa fermentada por fungos filamentosos.	41
Figura 14. Bloco aquecedor para digestão de fibra em detergente neutro.	42
Figura 15. Filtração de amostras para extração de fibra em detergente neutro.	42
Figura 16. Taxa de crescimento diário <i>C. echinulata</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>M. circinelloides</i> ATCC 38313 dias 3, 9 e 12 dias em diferentes meios.	44
Figura 17. Interações do tipo entrelaçamento parcial e mútuo em diferentes meios.	46
Figura 18. Incompatibilidade do tipo inibição por contato <i>C. echinulata</i> e <i>M. circinelloides</i> ATCC 38313 em meio MEA.	47
Figura 19. Incompatibilidade do tipo invasão/substituição entre <i>P. ostreatus</i> e <i>C. echinulata</i> e <i>P. ostreatus</i> e <i>M. circinelloides</i> ATCC 38313 em diferentes meios.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura IUAPAC dos principais ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados.	16
Tabela 2. Principais fungos produtores de ácidos graxos.....	21
Tabela 3. Principais cultivos em estado sólido e líquido de 2009 a 2019.	28
Tabela 5. Comparativo entre cultivo em estado sólido e cultivo Submerso	32
Tabela 4. Culturas mistas utilizadas na obtenção de produtos desejáveis.....	35
Tabela 6. Modelos de interação entre fungos filamentosos.....	38
Tabela 7. Taxa de crescimento diário <i>P. ostreatus</i> , <i>C. echinulata</i> e <i>M. circinelloides</i> ATCC 38313 em diferentes meios de cultura.....	43
Tabela 8. Classificação de tipos de interação entre <i>C. echinulata</i> , <i>M. circinelloides</i> ATCC 38313 e <i>P. ostreatus</i> nos meios de cultura BDA e MEA.	46
Tabela 9. Diâmetro máximo das colônias controle e co-cultura de fungos no 3º, 12º e 21º dia de cultivo.	49
Tabela 10. Produção lipídica por fungos filamentosos em condições de cultivo submerso.....	51
Tabela 11. Produção de lipídios por fungos filamentosos em cultivo em estado sólido.	54
Tabela 12. Composição centesimal de biomassa seca fermentada por fungos filamentosos.....	57

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AGL	Ácido γ -linolênico
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
ALA	Ácido α -linolênico
ALC	Ácido linolênico conjugado
AMP	Adenosina mono fosfato
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
ARA	Ácido araquidônico
ATP	Adenosina Trifosfato
BDA	Ágar batata dextrose
CBD	Caldo de batata dextrose
CE	<i>C. echinulata</i>
CES	Cultivos em estado sólido
CS	Cultivos em condições submersas
DHA	Ácido docosahexanóico
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FBA	Frutose-bifosfatoaldolase
FDN	Fibra detergente neutro
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LA	Ácido graxo linoléico
LTs	Leucotrienos
MC	<i>Mucor circinelloides</i> ATCC 38313
MEA	Ágar extrato de malte
n-3	Ômega 3
n-6	Ômega 6
n-9	Ômega 9
PGs	Prostaglandinas pró-inflamatórias
PO	<i>P. ostreatus</i>
TG	Triacilgliceróis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
Objetivo Geral.....	14
Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 Lipídios e perfil de ácidos graxos	15
3.2 Importância dos ácidos graxos essenciais na alimentação.....	19
3.3 Fungos filamentosos produtores de lipídios	20
3.4 Biossíntese de lipídeo microbiano	24
3.5 Técnicas de cultivo para obtenção de lipídios	27
3.5.1 Cultivos submersos e cultivos em estado sólido	29
3.6 Culturas puras <i>versus</i> culturas mistas	33
4. METODOLOGIA.....	36
4.1 Linhagens microbianas, manutenção e inóculo	37
4.2 Desenvolvimento de cultura mista para produção de lipídios	37
4.2.1 Determinação do crescimento fúngico.....	37
4.2.2 Teste de compatibilidade <i>in vitro</i>	37
4.2.3 Desenho experimental para os testes de compatibilidade	39
4.3 Produção de biomassa fermentada.....	39
4.3.1 Cultivos submersos	39
4.3.2 Cultivo em estado sólido.....	40
4.4 Caracterização química dos cultivos em estado sólido.....	40
4.4.1 Extração de Lipídios dos cultivos em estado sólido e submerso	40
4.4.2 Extração de Fibra em detergente neutro.....	41
4.5 Análise estatística	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Determinação do crescimento fúngico	43
5.2 Teste de compatibilidade <i>in vitro</i>	45
5.3. Conteúdo de lipídio nos cultivos submersos.....	50
5.4 Conteúdo de lipídeo nos cultivos em estado sólido.....	53
5.5 Aspectos nutricionais da biomassa fermentada	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Alguns microrganismos são capazes de produzir e acumular lipídios no meio intracelular, sendo os principais grupos destes as leveduras, fungos filamentosos e microalgas. Os principais ácidos graxos produzidos por esses microrganismos são os chamados ácidos graxos essenciais ou poli-insaturados (AGPI). Alguns gêneros de fungos filamentosos são considerados oleaginosos, principalmente *Mortierella*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Thamnidium*, *Pythium* e *Thraustochytrium* são relatados como bons produtores de AGPI (BÉLIGON et al., 2016; CERTIK et al., 2006).

O cultivo desses microrganismos para a produção de lipídios em processos industriais requer o uso de técnicas que visam potencializar esta produção. Duas técnicas que são conhecidas e descritas são os cultivos em estado sólido e submersos. A escolha da técnica depende dos objetivos específicos para aplicação, como alimentação e complementos alimentares, usos médicos e farmacêuticos e cosméticos aditivos. Além disso, é necessária atenção não só para a economia do processo de fermentação, mas também para a segurança dos produtos microbianos finais em termos de linhagens utilizadas e seus metabólitos tóxicos indesejados (CERTÍK, ADAMECHOVÁ e LAOTENG, 2012).

Os AGPI e seus benefícios descritos para a saúde os tornam indispensáveis para um desenvolvimento saudável. Os AGPI são de grande importância, pois servem como precursores para a síntese de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos), substâncias com uma variedade de efeitos, incluindo regulação da agregação plaquetária, trombose e inflamação (PADILHA e AUGUSTO-RUIZ, 2010; PEÑUELA-SIERRA, CASTAÑEDA-SERRANO e SANMIGUEL, 2015).

Os ácidos graxos essenciais não são produzidos pelos humanos, por isso é necessário adquirir através da dieta. Eles estão reunidos em três famílias: ômega 3 (n-3), ômega 6, ômega 9. A família ômega-3 inclui ácido α -linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA), a família ômega-6 (n-6) reúne o ácido γ -linolênico (GLA), ácido linoléico (LA), ácido araquidônico (ARA) e ácido linolênico conjugado (CLA), enquanto que a família ômega 9 (n-9) incluem o ácido oléico e o ácido palmitoléico. As principais fontes desses ácidos graxos são peixes de águas profundas e algumas fontes vegetais disponíveis são derivadas de sementes de primula noturna (8-10% de GLA), sementes de borragem (24-25% de GLA) e sementes

de groselha preta (16-17% de GLA) (BÉLIGON et al., 2016; CERTÍK, ADAMECHOVÁ e LAOTENG, 2012).

Os cereais estão associados à história da civilização, pois desde o início da escrita já é descrito o cultivo e consumo de cereais. Quando se trata dos lipídios, os grãos de cereais são muito baixos em gorduras com uma média de 3,6% em seu conteúdo calórico total. Enquanto o ácido linoleico é o principal ácido graxo da família n-6 encontrada nos grãos, o ácido γ -linolênico (família n-3) é detectado apenas em pequenas quantidades nos cereais. Portanto, as dietas à base de cereais tendem a ter uma alta razão n-6/n-3 e, além disso, são deficientes em outros ácidos graxos poli-insaturados essenciais (CERTIK et al., 2006; BRANDT, 2014).

A aveia (*Avena sativa* L.) é um cereal de importância entre os alimentos devido ao aporte energético e de nutrientes balanceados em aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, minerais e fibras alimentares. A aveia contém antioxidantes como tocoferol, ácido caféico, ácido ferúlico e avenasterol, compostos indispensáveis na saúde humana (KARAM, GROSSMANN e SILVA, 2001; GUIMARAES e SILVA, 2009; GUTKOSKI et al., 2009; SCHMIELE et al., 2011; DIAS et al., 2016).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a interação entre diferentes culturas de fungos filamentosos produtores de ácidos graxos na elaboração de uma biomassa fermentada enriquecida.

Objetivos específicos

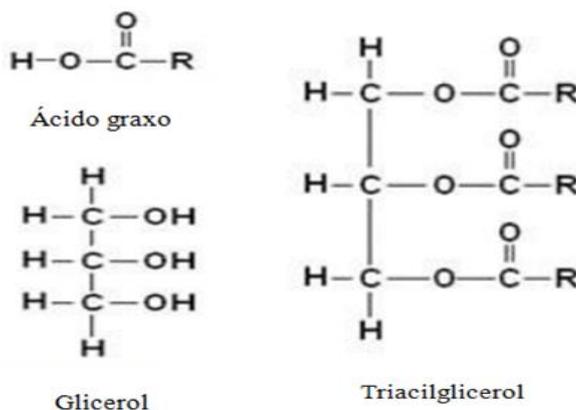
- Desenvolver culturas mistas de fungos filamentosos para a produção de ácidos graxos insaturados;
- Avaliar a acumulação de lipídios dos fungos filamentosos *C. echinulata*, *M. circinelloides* ATCC 38313 e *P. ostreatus* em culturas puras e mistas em cultivos submersos e em estado sólido com aveia em flocos;
- Caracterizar a composição nutricional das biomassas fermentadas por fungos filamentosos quanto ao teor de cinzas, carboidratos, proteínas e valor calórico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Lipídios e perfil de ácidos graxos

Os lipídios consumidos pelos seres humanos originam-se de fontes animal (carne de boi e derivados, e peixes) e vegetal. A forma estrutural da maioria dos lipídios da dieta possui três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e é conhecida como triacilgliceróis (Figura 1). Com relação ao tamanho da cadeia carbônica, do número e da posição das duplas ligações e linearidade (que pode gerar estereoespecificidade, e configuração espacial *cis* e *trans*), os lipídios apresentam diferentes propriedades físicas e químicas. Os ácidos graxos apresentam diferentes tamanhos de cadeia de 3 a 24 átomos de carbono. Podem ainda ser classificados como saturados formados por ligações simples ou insaturados que apresentam ligações duplas. As ligações duplas em ácidos graxos insaturados os tornam quimicamente mais instáveis (BELL et al., 1997).

Figura 1. Estrutura de um lipídeo



Fonte: Adaptado de Graça, 2015.

A classificação dos ácidos graxos através do número de carbonos e de duplas ligações denomina como monoinsaturados que possuem apenas uma dupla ligação os que possuem duas ou mais duplas ligações são chamados de poli-insaturados (Tabela 1). Os ácidos graxos poli-insaturados caracterizam-se por possuírem 18 ou mais átomos de carbono em sua estrutura química (BELL et al., 1997; BÉLIGON et al., 2016; COSTA et al., 2017).

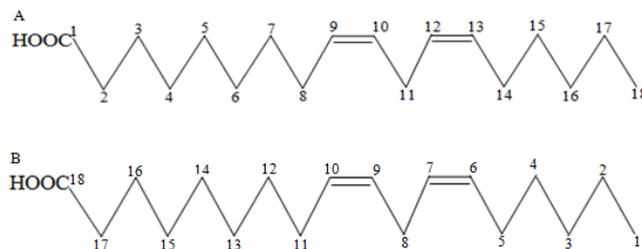
Tabela 1. Nomenclatura IUAPAC dos principais ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados.

Nome comum	Nomenclatura IUPAC	Simbologia	Fórmula Estrutural	Fonte
Mono-insaturados				
Ácido Palmitoléico	Ácido 9-hexadenóico	C16: 1 n-7: cis-9	C15H33COOH	Gordura láctea
Ácido Oléico	Ácido 9-octadecenóico	C18: 1 n-9: cis-9	C17H33COOH	Azeite
Ácido Elaídico	Ácido <i>trans</i> 9-octadecenóico	C18: 1 n-9 trans-9	C17H33COOH	Gordura láctea
Poli-insaturados				
Ácido Linoléico	Ácido 9,12-octadecadienóico	C18: 2 n-6 9,12	C17H31COOH	Óleo de amendoim, soja e milho
Ácido α -linolênico	Ácido 9,12,15-octadecatrienóico	C18: 3 n-3 (9, 12, 1)	C17H29COOH	Óleo de soja
Ácido γ -linolênico	Ácido 6,9,12-octadecatrienóico	C18: 3 n-6 (6, 9, 12)	C17H29COOH	Borragem (<i>Boragoofficinallis</i>)
Ácido Araquidônico	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico	C20: 4 n-6 (5, 8, 11, 14)	C19H31COOH	Gordura animal (banha)
Ácido eicosapentaenóico	Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico	C20: 5 n-3 (5, 8, 11, 14, 1)	C19H29COOH	Peixe
Ácido docosahexaenóico	Ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico	C22: 6 n-3 (4, 7, 10, 13, 16, 19)	C21H31COOH	Peixe

Fonte: Adaptado de Souza, Matsushita e Visentainer (1998)

A nomenclatura química, comumente utilizada é a sistemática proposta pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), na qual se inicia a numeração dos átomos de carbonos pelo grupo carboxila terminal (Figura 2A). Os átomos de carbono de número 2 e 3 em relação ao grupo carboxila, são denominados de carbonos α e β , respectivamente e o último carbono é o ômega ou n-carbono. A posição da dupla ligação é indicada pelo símbolo Δ , seguido por um número. A nomenclatura leva ainda em consideração o comprimento da cadeia hidrocarbonada, o número de ligações duplas existentes e a sua configuração geométrica [*cis* (c-) ou *trans* (t-)] (Tabela1). Porém quando se trata de ácidos graxos uma prática é aceita na identificação das moléculas iniciando pela numeração dos carbonos no grupo metil (ω - ou n-). Sendo assim a classificação ômega feita com base à posição da primeira dupla ligação, que se inicia a partir do grupo metílico final da molécula (Figura 2B), os ácidos graxos poli-insaturados n-3 apresentam a primeira ligação dupla entre o terceiro e o quarto átomo de carbono, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados n-6 têm a primeira ligação dupla entre o sexto e o sétimo átomo de carbono (ROSE e CONNOLY, 1999; COSTA et al., 2017).

Figura 2.Ácido Linoleico numeração dos átomos de carbono.

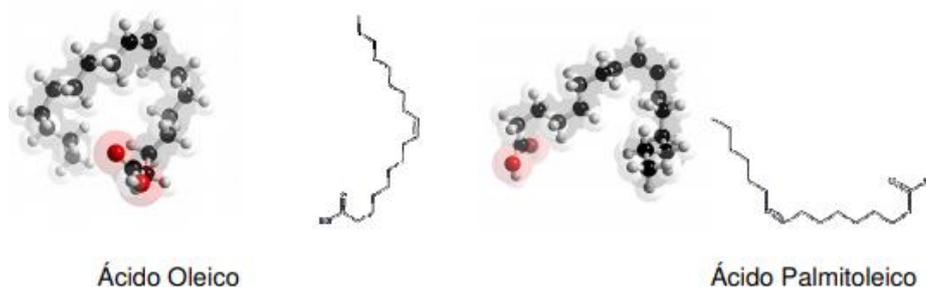


Legenda: A: Ácido Linoleico 9, 12 *cis*, contagem a partir de grupo carboxílico; B: Ácido Linoleico 6, 9 *cis* contagem a partir de grupo metila.

Fonte: o autor, 2019

Os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) possuem apenas uma dupla ligação, sendo a principal justificativa para serem normalmente líquidos à temperatura ambiente. Os AGMI podem ser sintetizados pelos mamíferos ao contrário dos AGPI, porém sua importância por atuarem na prevenção e tratamento da hipercolesterolemia. O ácido oléico e o palmitoléico (Figura 3) são os principais representantes dos AGMI, tem uma dupla ligação localizada entre os carbonos 9 e 10 do grupo metil final, e é designado como ômega 9 (ou n-9), sua principal fonte é o azeite de oliva (BÉLIGON et al., 2016; ROSE e CONNOLY, 1999).

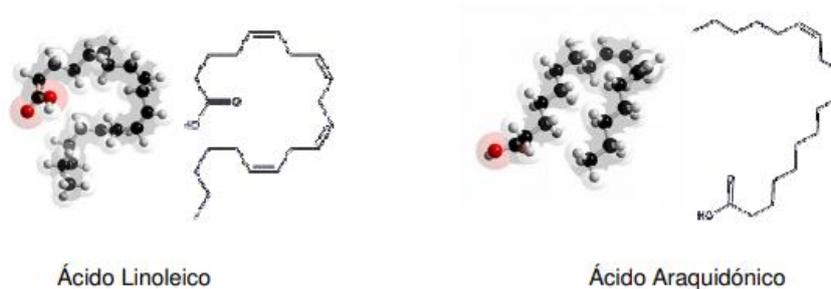
Figura 3. Representação estrutural ácido oléico e palmitoléico.



Fonte: Albuquerque, 2009.

Os AGPI mais estudados são os ômega 3 (n-3) e 6 (n-6). Trata-se de ácidos graxos essenciais, pois não são produzidos por humanos e, portanto, é necessário adquirir através da dieta. Os principais representantes da família ômega-3 incluem o ácido α -linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA). A família (n-6) reúne o ácido graxo linoléico (LA), ácido γ -linolênico (AGL), ácido araquidônico (ARA) (Figura 4) e ácido linolênico conjugado (ALC). As principais fontes desses ácidos graxos são peixes de águas profundas e algumas fontes vegetais disponíveis são derivadas de sementes de prímula noturna (8-10% de AGL), sementes de borragem (24-25% de AGL) e sementes de groselha preta (16-17% de AGL) (CERTÍK, ADAMECHOVÁ e LAOTENG, 2012; BÉLIGON et al., 2016; COSTA et al., 2017).

Figura 4. Representação estrutural dos ácidos linoleico e araquidônico.



Fonte: Albuquerque, 2009.

3.2 Importância dos ácidos graxos essenciais na alimentação

Os AGPI de cadeia longa, principalmente os ômega-3(n-3), sendo o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3) os principais representantes desse grupo, têm sido associados a uma diminuição do risco de doença crônica, em particular a mortalidade cardiovascular e o declínio cognitivo. Seus benefícios foram reconhecidos pela primeira vez no final dos anos 1960, quando evidências epidemiológicas da população Inuit, que consumiam uma dieta rica em n-3 mostrou que eles têm uma baixa incidência de infarto do miocárdio (STARK et al., 2016; ENDO e ARITA, 2016).

As ações dos AGPI contra doenças cardiovasculares têm sido demonstradas, pois reduzem a liberação de LDL-colesterol arterial na resposta inflamatória através da geração de resolvinas e neuroprotectinas e suprimem a proliferação de células musculares lisas vasculares reduzindo assim a capacidade de formação de trombos ateroscleróticos. É também componente estrutural importante da substância cinzenta do cérebro e da retina ocular. Os mecanismos ainda não foram elucidados, porém o consumo de ácidos graxos EPA e o DHA está associado a menor incidência de diabetes tipo 2. Ao contrário o consumo dietético insuficiente de AGPI leva ao aumento da ocorrência de eczema atópico, anormalidades nos sistemas cardiovascular, endócrino, nervoso, inflamatório, imunológico, respiratório e reprodutivo. Estima-se que menos de 20% da população mundial consuma ≥ 250 mg/dia, enquanto a recomendação de ingestão diária seja de 11 a 18,6 g/dia a depender da faixa etária que está inserido o indivíduo (IOM, 2005; CERTIK et al., 2006; BELIGON et al., 2016; STARK et al., 2016; ZHENG et al., 2018;).

O principal mecanismo protetor dos AGPI contra doenças cardiovasculares está no fato de que a membrana celular é composta de fosfolipídios que contêm vários tipos de ácidos graxos. Acredita-se que o comprimento e a saturação dos ácidos graxos presentes nos fosfolipídios afetam as propriedades das membranas celulares, alterando regiões que funcionam como plataformas de sinalização. Isso pode levar a ocorrência da supressão da sinalização de proteína cinase C α e a produção de interleucina 2 e o rompimento da dimerização e recrutamento do receptor *Toll-like* 4. Quando essa mudança ocorre no microambiente lipídico nos cardiomiócitos, leva a modulação da função do canal iônico, levando a efeitos antiarrítmicos (ENDO e ARITA, 2016; LANDS, BIBUS e STARK, 2018).

A elucidação dos benefícios do ômega-3 sobre o ômega-6 desde a década de 1970 se dá devido à prevenção da conversão do ácido araquidônico (n-6) em prostaglandinas pró-inflamatórias (PGs) e leucotrienos (LTs) podendo gerar uma resposta inflamatória mais expressiva se comparado ao n-3, ou a sua capacidade de servir como substrato alternativo, produzindo mediadores menos potentes, tais como PGs e tromboxanos e LTs, porém atualmente já se sabe que estes produzem mediadores específicos para n-3 e n-6 que possuem estruturas químicas distintas e exercem seus efeitos anti-inflamatórios de maneira estereoespecífica. Dessa forma é possível determinar que é essencial o equilíbrio entre a razão da ingestão de n-3 e n-6 (ENDO e ARITA, 2016; LANDS, BIBUS e STARK, 2018)

Atualmente nas sociedades ocidentais desenvolvidas é estimado que a ingestão média provê relações n-6/n-3 de 20:1 a 25:1, muito distante das que consumiam nossos antepassados (n-6/n-3 de 2:1 a 3:1) e das atualmente recomendadas pela WHO/FAO (5:1 a 10:1). A esta importante consideração se agrega um aumento sustentado do consumo de gorduras em geral (além dos 30% da ingestão recomendada) que se correlaciona com um aumento na mortalidade por enfermidades cardiovasculares, consideradas como a primeira causa de morte no mundo ocidental desenvolvido e em desenvolvimento. Havendo assim a necessidade de um consumo de consciente de ácidos graxos, com uma razão n-6/n-3 balanceada (FAO, 1994; KATAN, 1995; EATON et al., 1998; ENDO e ARITA, 2016; LANDS, BIBUS e STARK, 2018).

3.3 Fungos filamentosos produtores de lipídios

Os microrganismos acumuladores de lipídios ou microrganismos oleaginosos possuem a capacidade de produzir e acumular conteúdo lipídico superior a 20% (especialmente triacilgliceróis, TG) de biomassa seca, podendo chegar até 80% de seu peso seco em algumas linhagens. Diversos gêneros microbianos, especialmente fungos e leveduras são amplamente conhecidos como produtores de alto teor lipídico sob condições específicas de cultivo (Tabela 2) (SANTAMAURO et al., 2014; LOPES et al., 2018; LI et al., 2019).

Tabela 2. Principais fungos produtores de ácidos graxos.

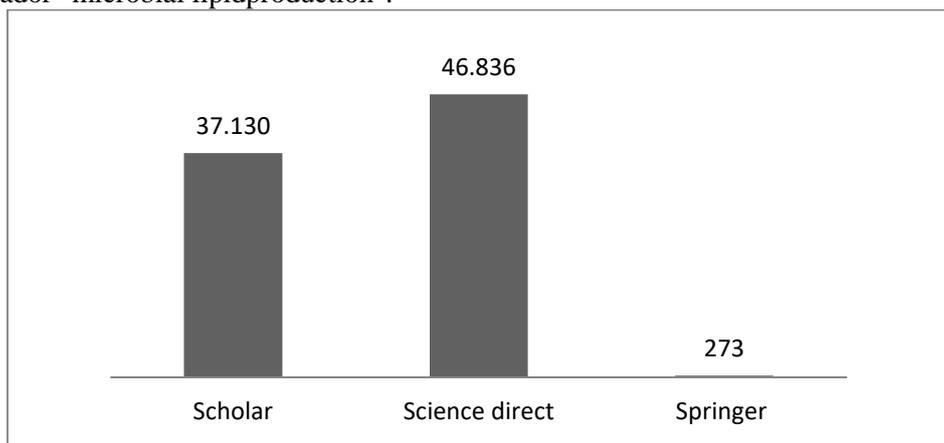
Microrganismo	% lipídeo total	% AGPI ou AGMI	Autor
<i>Cunninghamella echinulata</i>	32-35	11-18 AGL	Alakhras et al. (2015)
<i>Mucor circinelloides</i>	25	17-32 AGL	Kendrick e Ratledge (1992)
<i>Mucor circinelloides</i> WJ11	36	-	Tang et al. (2016)
<i>Mucor circinelloides</i> URM 4182	-	25,3 oléico 19,3 linoleico 18,3 α - linolênico	Carvalho et al. (2018)
<i>Mucor circinelloides</i> CBS 108.16	25	-	
<i>Mortierella alpina</i> CBS 696.70	40	-	Tang et al. (2015)
<i>Mucor circinelloides</i> CBS 277.49	15	-	
<i>Mucor fragilis</i> UBOCC-A-109196	10-32	24,5 AGL	
<i>Cunninghamella echinulata</i> VKM F-470	32-35	24 AGL	Kosa et al. (2018)
<i>Mucor flavus</i>	10-32	13 α - linolênico	
<i>Mortierella alpina</i> ATCC 32222	44,5	41,1 araquidônico	

Legenda: AGL- ácido gama linolênico. Valores expressos em % de peso seco. – dados não informados na fonte.

Fonte: dados da literatura.

Devido ao seu uso como aditivos alimentares ou suplementos nutricionais para a promoção da saúde, a produção de lipídios microbianos tem atraído atenção crescente devido a muitas vantagens, incluindo a utilização de uma ampla gama de substratos, o curto período de crescimento, clima e principalmente porque produz óleos semelhantes aos vegetais, porém não requer terras agrícolas para ser cultivado, evitando o deslocamento da produção de alimentos. Como é possível observar na Figura 5, nos últimos 10 anos houve cerca de 84.000 estudos com o tema “produção de lipídios por microrganismos” e na Figura 6 é possível visualizar o aumento no número de estudos a cada ano podendo ser justamente por seu potencial de utilização (CARVALHO et al., 2015; LI et al., 2019).

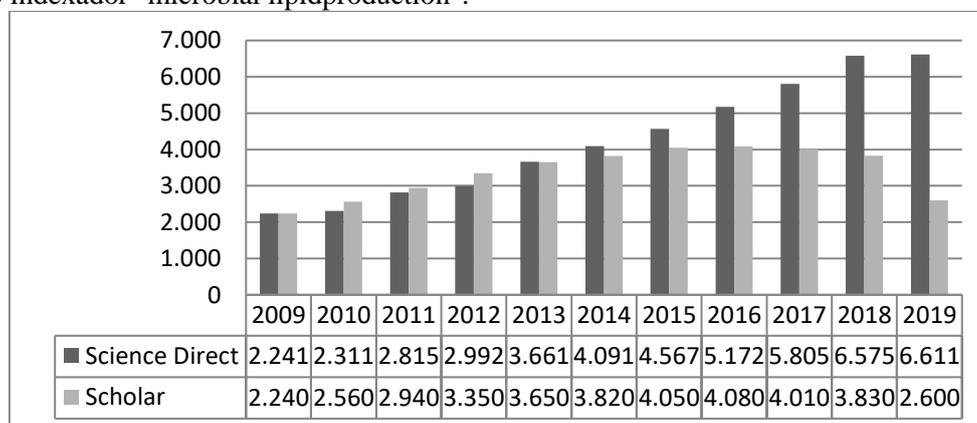
Figura 5. Estudos publicados nas principais plataformas de busca num período de 10 anos com o indexador "microbial lipidproduction".



Fonte: Base de dados Google Scholar, Science direct e Springer.

Os lipídios fúngicos representam uma fonte potencial de gordura comestível, e sua produção é particularmente atraente quando substratos de custo baixo ou negativo são utilizados. Em particular, os fungos filamentosos oleaginosos têm a capacidade de produzir e acumular quantidades de lipídios e são considerados fontes alternativas para a produção de AGPI. A composição dos lipídios produzidos por fungos filamentosos é semelhante ao óleo vegetal, incluindo ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido γ -linolênico (C18:3) e ácido docahexanoico (C22:6) de grande interesse para a indústria de alimentos devido seu potencial impacto na saúde do consumidor (CHEN e CHANG, 1996; CHEN e LIU, 1997; KAVADIA et al., 2001; GEMA et al., 2002; FAKAS et al., 2006; SANTAMAURO et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; LI et al., 2019).

Figura 6. Estudos publicados nas plataformas Science direct e Google Scholar de 2009- 2019 com o indexador "microbial lipidproduction".



Fonte: Base de dados Google Scholar, Science direct.

A linhagem de fungo filamentososo *C. echinulata* (Figura 7), é uma espécie de fungo que é capaz de sintetizar AGL (Tabela 2), quando é cultivada sob condições de nitrogênio limitado em meio contendo fonte de carbono (normalmente glicose) e energia. Apresenta alto rendimento na produção de lipídios sendo capaz de acumular entre 30 e 32% do seu peso seco, utiliza principalmente glicose para conversão de lipídios de cerca de 0,11 g por grama de glicose consumida gera uma produção de lipídios de 5 g/L (ALAKHRAS et al., 2015).

Figura 7. *Cunninghamella echinulata* cultivado em ágar batata dextrose



Fonte: o autor.

Um dos organismos mais promissores para a produção de lipídios é o fungo zigomiceto *M. circinelloides* (Figura 8), pois é capaz de produzir óleo rico em ácidos graxos poli-insaturados, principalmente AGL, sendo este o primeiro microrganismo a ser usado comercialmente para produzir um óleo para consumo humano, óleo este rico em AGL. Sua exploração para produção de óleo microbiano começou por volta de 1985. Este microrganismo é o mais estudado, portanto mais bem elucidado seu mecanismo de síntese de lipídios. É considerado como um microrganismo potencial para produção comercial devido ao seu alto poder de acumulação de lipídios (Tabela 2) (CARVALHO et al., 2015; TANG et al., 2016).

Figura 8. *Mucor circinelloides* CCM 8328, célula contendo ácido graxo.



Fonte: Kosa et al., 2018.

Outro fungo filamentososo de interesse na alimentação humana devido suas características nutricionais e principalmente o perfil de ácidos graxos é o *P. ostreatus*. Por se tratar de um basidiomiceto, o *P. ostreatus* possui corpos de frutificação que popularmente o torna conhecido como cogumelos comestíveis, estes por sua vez têm teor total de lipídios por volta de 2% a 6% do peso seco com uma prevalência em ácidos graxos insaturados além de que seu consumo diminui a concentração de triglicérides e de colesterol em seres humanos, o que é atribuído à presença de ácido linoleico, ergosterol e ergosta-derivados. É considerado um alimento funcional devido à sua composição em metabólitos bioativos gerados durante seu crescimento (ALAM et al., 2008; KALAC, 2009; SÁNCHEZ, 2010; BENAVIDES CALVACHE et al., 2015).

Um fator que influencia a composição da fração de lipídios em basidiomicetos cultivadas é a temperatura durante a fase de frutificação, o qual para ser inferior a 17 °C pode aumentar a concentração total de lipídios e ácidos graxos insaturados (BENAVIDES CALVACHE et al., 2015).

3.4 Biossíntese de lipídio microbiano

O estudo da produção, acumulação de lipídios advindos de fungos filamentosos é crucial para obter os detalhes da biossíntese de lipídeos e sua regulação em eucariotos. Para produção de lipídios por microrganismos oleaginosos, duas vias metabólicas diferentes estão envolvidas: a de acúmulo lipídico (a partir de substratos hidrofóbicos) e síntese lipídica (a partir de substratos hidrofílicos). Enquanto o acúmulo de lipídios é um processo anabólico primário que ocorre de forma simultânea com o crescimento celular, a síntese é um contraste, sendo assim uma biomodificação de óleos e gorduras

por microrganismos oleaginosos da composição de ácidos graxos da gordura usada como substrato influencia grandemente o processo de produção de lipídios (SANTAMAURO et al., 2014; LOPES et al., 2018).

O processo de lipogênese para leveduras, fungos filamentosos e microalgas produtores de lipídios é uma atividade metabólica secundária, fortemente afetada pelas condições de cultura. A temperatura, o pH e a disponibilidade de oxigênio são alguns dos parâmetros que influenciam o crescimento e a acumulação de lipídios, modificando a atividade das enzimas envolvidas na assimilação de nutrientes e na síntese lipídica (BÉLIGON et al., 2016; BELLOU et al., 2016).

O principal fator de controle da lipogênese nesses organismos é a disponibilidade de nutrientes e se dá quando um nutriente essencial, normalmente o nitrogênio, sofre saturação total, ocorrendo interrupção no crescimento celular microbiano. A partir dessa limitação o microrganismo passa a utilizar-se de outras fontes alternativas, geralmente uma fonte de carbono, que supre sua demanda energética e o excedente é desviado para síntese lipídica, que leva a um acúmulo de triacilgliceróis dentro das células microbianas. Porém, altas concentrações de fonte de carbono pode ter efeito inibitório no crescimento e lipogênese (BELLOU et al., 2016; BÉLIGON et al., 2016).

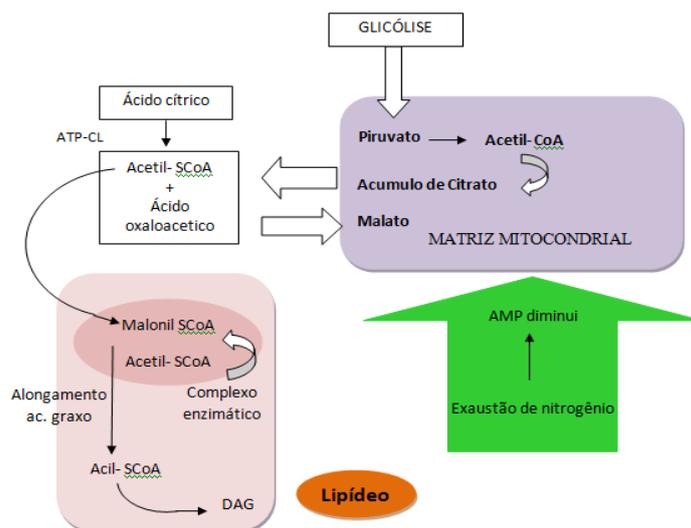
O mecanismo de acumulação de ácidos graxos parece ser semelhante em todos os fungos filamentosos, ou seja, o metabolismo e o fluxo de carbono são críticos para o acúmulo de lipídios podendo crescer bem e acumular lipídios usando glicose como fonte única de carbono e quantidades controladas de nitrogênio. Porém, cada fungo tem uma expressão diferencial de proteínas envolvidas na via metabólica do carbono central que é estimulada em pontos diferentes (BOTHAM e RATLEDGE, 1979; TANG et al., 2016).

A via glicolítica fornece piruvato, um precursor chave para o acetil-CoA, que é o principal substrato para a biossíntese de ácidos graxos. A frutose-bifosfatoaldolase (FBA), uma enzima essencial envolvida na glicólise que catalisa uma reação de clivagem reversível da frutose 1,6-bifosfato em gliceraldeído 3-fosfato e fosfato de dihidroxiacetona, que torna a regulação aumentada da FBA sob deficiência de nitrogênio. A atividade aumentada de FBA pode estimular a glicólise e triacilglicerol. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, enolase e piruvato quinase, enzimas-chave na via glicolítica, que também são reguladas sob deficiência de nitrogênio. Um aumento na expressão destas enzimas conduz ao aumento da produção de piruvato. Além disso, a

expressão da piruvato desidrogenase torna-se aumentada e, portanto, aumento da conversão de piruvato em acetil-CoA na mitocôndria. Esse acetil-CoA em excesso é metabolizado em lipídios (TANG et al., 2016; RODRIGUES REIS et al., 2019).

Outro mecanismo bioquímico de metabolização do conteúdo lipídico (Figura 9), onde a depleção de nitrogênio diminui a quantidade de adenosina mono fosfato (AMP) na célula, aumentando a proporção Adenosina Trifosfato (ATP)/AMP, o que acaba por aumentar a quantidade de citrato intracelular, via ciclo de Krebs, também pode ocorrer nos fungos oleaginosos. O citrato é transportado para fora da mitocôndria onde é clivado em acetil-CoA e oxaloacetato pela enzima ATP citrato-liase (ATP-CL). Essa etapa é controlada pela alta concentração dos ésteres de acetil-CoA, que são usados na biossíntese de ácidos graxos enquanto o oxaloacetato é convertido em piruvato. Outros dois pontos de controle para a biossíntese lipídica estão na via da glicólise, em que as duas enzimas (fosfofrutoquinase e piruvato quinase) são inibidas pela alta concentração citrato, levando ao aumento do conteúdo lipídico. Porém esta inibição pode ser revertida pela presença de íons amônio, presentes em fontes nitrogênio. Os precursores imediatos para a biossíntese dos triacilgliceróis são os ésteres graxos de acil-CoA e os fosfatos de glicerol, que são metabolizados no retículo endoplasmático (BELLOU et al., 2016; BÉLIGON et al., 2016; PARK et al., 2018).

Figura 9. Via biosintética de acumulação de lipídios por fungos filamentosos



Fonte: Adaptado de Martínez et al., 2015.

Li et al. (2018) relatam em seu trabalho que o uso de trealose como fonte de carbono aumenta significativamente a produção de AGL por *C. echinulata*, isso porque a trealose poderia influenciar a expressão das enzimas dessaturases que regulam de forma positiva a delta-6 dessaturase. O aumento do GLA é assim transferido para o ambiente extracelular através de canal iônico ativo, que tem maior afinidade por cadeias de acil poli-insaturados. Ao passo que, a trealose pode prevenir a peroxidação do AGL formando um complexo de AGPI com trealose, sugerindo assim que a acumulação lipídica fúngica pode variar conforme o substrato utilizado para cultivo.

O ponto principal na regulação da produção de ácidos graxos por *M. circinelloides* foi a descoberta do papel da enzima málica. A descarboxilação irreversível do malato em piruvato, formando NADPH a partir de NADP. O NADPH é vital para a biossíntese de ácidos graxos, pois parece fornecer o poder redutor necessário para que a síntese de ácidos graxos funcione (RODRIGUES REIS et al., 2019).

Outra variável importante no desenvolvimento de populações microbianas é a temperatura, já que esta é um fator ambiental onipresente, que afeta processos, tais como expressão gênica, atividade enzimática e metabólitos. O controle das insaturações lipídica e regulação entre a relação entre a bicamada e o espaço amorfo para se adaptar à temperatura ambiente. Sendo, a temperatura mais baixa limitante do crescimento celular, porém gera aumento da proporção de ácidos graxos insaturados e a temperatura mais alta atua na fluidez da membrana e regula os níveis de expressão de alguns genes. Dessa forma, entender o processo de resposta fúngica às mudanças de temperatura é importante para produção industrial de lipídios (TERESHINA, MEMORSKAYA e KOTLOVA, 2011; ZHENG et al., 2011; LI et al., 2019).

3.5 Técnicas de cultivo para obtenção de lipídios

A produção de lipídios microbianos pode ser realizada utilizando dois processos típicos cultivos em condições submersas (CS) e cultivos em estado sólido (CES). A escolha da técnica a ser utilizada depende do produto que se deseja obter e a finalidade a qual será destinado o produto gerado nesse processo (SOCCOL et al., 2017).

Ao longo dos anos houve uma alteração na escolha de técnicas utilizada para obtenção de compostos de interesse (Tabela 3), sendo que os CES vem substituindo os CS, devido principalmente ao fato de que os cultivos em estado sólido são sustentáveis,

pois se assemelham a condições existentes na natureza e utilizarem-se principalmente de resíduos agroindustriais, diminuindo a geração de resíduos sólidos gerados apesar de o CS ser amplamente utilizado na indústria e ter vantagens no controle do processo e no rendimento da produção, o CES representa uma alternativa interessante para produzir compostos industriais de interesse a custos mais baixos (RAMOS-SANCHEZ et al., 2015; BEHERA e RAY, 2016; YAZID et al., 2017;).

Tabela 3. Principais cultivos em estado sólido e líquido de 2009 a 2019.

Microrganismo	Substrato	Produto obtido	Autor
<i>Trametes versicolor</i> <i>Bjerkandera adusta</i> <i>Ganoderma applanatum</i> <i>Phlebia rufa</i>	Palha de trigo	Enzima	Dinis et al., 2009
<i>Phanerochae techryso sporium</i>	Haste de algodão	Enzima	Shi, Sharma-Shivappa, Chinn, 2009
<i>Aspergillus oryzae</i> IAM 2706	Meio líquido Czapek-Dox e extrato de dextrina-peptona-extrato de levedura	Enzima (proteases e α -amilase)	Imanaka et al., 2010
<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus oryzae</i>	Casca de soja e farelo de trigo	Enzima (celulase)	Brijwani, Oberoi e Vadlani, 2010
<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Magnaporthe grisea</i> <i>Phanerochae techryso sporium</i>	Caldo meio mínimo de <i>Aspergillus</i> + 1% de farelo de trigo	Enzimas	Hu et al., 2011
<i>Fomitopsis sp.</i> O RCK2010	Farelo de trigo, Caseína e Farelo de soja	Enzima (celulase)	Deswal, Khalsa e Kuhad, 2011.
<i>Aspergillus niger</i> NS-2	Espigas de milho, cascas de cenoura, compósitos, grama, folhas, cascas de laranja, cascas de abacaxi, cascas de batata, casca de arroz, bagaço de cana, pó de serra, farelo de trigo, palha de trigo	Enzima (celulase)	Bansal et al., 2012
<i>Aspergillus fumigatus</i> SK1	Tronco de dendê	Enzima (celulase e xilanase)	Ang et al., 2013
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> Kefir	Mistura de resíduos da agroindústria	Proteína, lipídios e compostos voláteis	Aggelopoulos et al., 2014
<i>Trichoderma reesei</i> FNCC 6012	Palha	Enzima (celulase)	Rosyida et al., 2015

<i>Aspergillus tubingensis</i> TSIP9	Cachos de frutos secos e bolo de sementes de palma	Lipídios	Cheirsilp e Kitcha, 2015
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de <i>Sambucus nigra</i> L. e <i>Sambucus buxifolia</i> L. berry.	Lipídios e compostos fenólicos	Dulf et al., 2015.
<i>Aspergillus niger</i> e <i>Rhizopus oligosporus</i>	Bagaço de ameixa	Lipídios e compostos fenólicos	Dulf, Vodnar e Socaciu, 2016
<i>Aspergillus oryzae</i>	Polpa cítrica e bagaço de cana-de-açúcar	Enzima (pectinase)	Biz et al., 2016
<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus kumm.</i>	Casca de batata	Enzima (lignolíticas)	Ergun e Urek, 2017
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Resíduo de frutas e vegetais hidrolisados	Ácido succínico	Dessie et al., 2018
<i>Lentinula edodes</i>	Bagaço e folha de mandioca	Proteínas	Morales et al., 2018
<i>Trichoderma viride</i> ATCC 36316	Casca de abacaxi	Proteína	Aruna, 2019
<i>Clostridium termitidis</i> e <i>Clostridium intestinale</i>	Casca de arroz	Biohidrogênio ácidos acético, butírico, propiônico e láctico	Tosuner, Taylan e Ozmiççi, 2019

Fonte: dados da literatura.

A técnica de CES é amplamente utilizada para obtenção de lipídios por microrganismos, principalmente quando se objetiva utilizar-se de fungos filamentosos, pois são os organismos mais adaptados para crescer no ambiente da CES (CHEIRSILP e KITCHA, 2015; DULF et al., 2015; RAMOS-SANCHEZ et al., 2015; DULF, VODNAR E SOCACIU, 2016; YAZID et al., 2017).

3.5.1 Cultivos submersos e cultivos em estado sólido

O cultivo em estado sólido (CES) (Figura 10) é um processo no qual microrganismos crescem em um ambiente sem água livre, ou com baixo teor de água livre. Tem importância histórica para a humanidade, pois esse processo data de milhares de anos atrás, principalmente para processamento de alimentos, tanto em países ocidentais (pão e queijo) como orientais (Koji). Considerando o último século e nas últimas décadas ainda é usado para a produção de importantes biomoléculas e produtos para muitas indústrias, incluindo alimentícia, farmacêutica, têxtil, bioquímica e

bioenergia, entre outros. Quando esse bioprocesso é realizado por fungos e combina a utilização fúngica com materiais sólidos úmidos e permite que os materiais produzidos possam ser usados diretamente para aplicações, não havendo necessidade de extração do composto de interesse do meio (CERTÍK, ADAMECHOVÁ E LAOTENG, 2012; SOCCOL et al., 2017; ALJAMMAS, FATHI e HALKALAF, 2018;).

Figura 10. Cultivo em estado sólido por um fungo filamentoso.



Fonte: o autor, 2019.

O processo oposto ao CES é o cultivo submerso (CS) (Figura 11), um processo no qual os microrganismos crescem em meio líquido, com alto teor de água livre. Processos biológicos realizados em CS têm vantagens notáveis em termos de instrumentação e controle (monitoramento de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de moléculas solúveis em água), separação da biomassa após a fermentação, mistura, aeração e escalonamento, porém o substrato é rapidamente consumido, necessitando de reposição constante (CERTÍK, ADAMECHOVÁ E LAOTENG, 2012; FARINAS, 2015; SOCCOL et al., 2017; ALJAMMAS, FATHI e HALKALAF, 2018).

Figura 11. Cultivo submerso por um fungo filamentoso.



Fonte: o autor, 2019.

Quando comparadas a CES tem uma produtividade mais alta em relação à CS, além de que o uso de matérias-primas e resíduos agroindustriais como substrato na CES reduz o problema da poluição e o custo do material. Por ter menor atividade de água no meio de fermentação reduz o risco de contaminação, especialmente por bactérias e leveduras. O custo com capital, o gasto de energia e o custo do processamento são menores do que a CS. Os substratos são consumidos de forma lenta e constante, não havendo dessa forma, necessidade de fornecer o substrato por mais tempo. O CES não requer tecnologia altamente avançada, o que consome menos energia e ocupa menos espaço, além de imitar o habitat natural da maior parte de microrganismos (principalmente fungos filamentosos) (RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015; SOCCOL et al., 2017; ALJAMMAS, FATHI e HALKALAF, 2018).

A Tabela 5 apresenta algumas diferenças importantes entre os cultivos em estado sólido e condições submersas.

Tabela 4. Comparativo entre cultivo em estado sólido e cultivo Submerso

Cultivo em estado sólido	Cultivo Submerso
Meio de cultivo não é fluido	Meio de cultivo fluido
Substrato absorve água e os nutrientes são disponibilizados por estes sólidos umedecidos	Nutrientes dissolvidos em água
Formação de gradiente de concentração e temperatura	Uniformidade do meio através de agitação
Quantidade de água é restrita e padronizada	Água abundante
Sistema possui fases líquida, sólida e gasosa	Sistema com fase líquida e gasosa
Fase líquida descontínua	Fase líquida contínua
Microrganismos crescem aderindo ao substrato	Células crescem uniformemente no líquido pela agitação e formam colônias

Fonte: adaptado de Mitchell e Losane, 1992.

Os substratos para utilização em CES normalmente incluem resíduos agrícolas e florestais, que são muito abundantes e normalmente subutilizados. Os resíduos agrícolas que podem ser utilizados como substratos para CES incluem bagaço de cana, bagaço de mandioca, farelo de cereais como, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de aveia e farelo de soja, polpa e casca de café, cascas de frutas e polpas, espigas de milho, palhas e cascas de origens diferentes. Esses materiais são compostos basicamente por celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e outras fibras (FARINAS, 2015; SOCCOL et al., 2017).

A escolha dos microrganismos mais apropriados a serem cultivados no resíduo agropecuário depende muito de sua composição e para permitir a utilização do subproduto biotransformado como alimento, o microrganismo deve ser comestível. No caso dos resíduos lignocelulósicos, os fungos da podridão da madeira são geralmente os mais indicados. Os fungos da podridão da madeira podem ser classificados em fungos da podridão branca (Basidiomicetos e alguns Ascomicetos), que degradam preferencialmente lignina, fungos (Basidiomicetos), que degradam celulose e hemiceluloses, e os fungos da podridão mole (*Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*) que secretam um sistema completo de celulasas (YOON et al., 2014; SOCCOL et al., 2017; MORALES et al., 2018).

Normalmente, esses resíduos agrícolas não são apenas um suporte sólido para a absorção de nutrientes e crescimento de biomassa, mas também são uma fonte de

carbono e nutrientes. Às vezes, a suplementação é necessária para fornecer todos os nutrientes necessários para o crescimento ideal. Macro e micronutrientes que são geralmente adicionados ao meio incluem fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto e iodo (FARINAS, 2015; SOCCOL et al., 2017; MORALES et al., 2018).

Custo e disponibilidade são os principais fatores a serem considerados na escolha de um resíduo como substrato, porém outras características, como cristalinidade, área acessível, área de superfície, porosidade e tamanho de partícula, são aspectos importantes a serem considerados no processo de CES (SOCCOL et al., 2017).

3.6 Culturas puras *versus* culturas mistas

Os microrganismos vivem na natureza de forma conjunta em um ecossistema, sendo assim esses microrganismos não agem como indivíduos, mas atuam como uma comunidade microbiana que muda dinamicamente, onde todas as células interagem e se comunicam umas com as outras. Para utilização ou estudo de uma única espécie de microrganismo há necessidade do isolamento de cada membro da comunidade microbiana. Dessa forma cultura pura, é um conjunto de células de um mesmo microrganismo que foi isolado de uma comunidade de microrganismos (DE ROY et al., 2013).

Culturas puras e comunidades microbianas complexas são convencionalmente usadas, no entanto, os ecossistemas sintéticos com complexidade intermediária e alto controle são muito populares, sendo essa última sua maior vantagem de utilização porém apenas uma pequena porção de microrganismos presentes em uma comunidade pode ser cultivada em laboratório, além disso, o comportamento dos microrganismos em culturas puras é diferente do observado quando em culturas em que há uma comunidade, sendo assim o estudo de culturas mistas tem se tornado crescente (DE ROY et al., 2013).

A principal desvantagem no uso de culturas puras para obtenção de produtos desejáveis ocorre justamente pelo fato de na natureza os microrganismos viverem em comunidade, podendo assim interferir negativamente na produção de compostos desejáveis, gerando rendimentos mais baixos. Além disso, culturas puras são mais suscetíveis a contaminações por outras culturas e requerer um maior nível de

treinamento para sua manipulação, precisando ainda de um ambiente muito controlado (pH, temperatura, substrato) para evitar a perda o microrganismo (HESSELTINE, 1992; DE ROY et al., 2013;).

Culturas mistas são aquelas em que o inóculo consiste sempre de dois ou mais organismos. As culturas mistas podem ser de espécies conhecidas, com exclusão de todas as outras, ou podem ser compostas de misturas de espécies desconhecidas. Podem ainda ser todas de um grupo microbiano ou podem consistir em uma mistura de organismos (de fungos e bactérias ou fungos filamentosos e leveduras) ou outras combinações nas quais os componentes não estão relacionados. Comumente na natureza ocorre esse tipo de interação (HESSELTINE, 1992).

Tabela 5. Culturas mistas utilizadas na obtenção de produtos desejáveis.

Cultura mista	Produto obtido	Autor
<i>Citrobacter, Pectinatus, Clostridium</i>	Etanol	Dennis et al., 2013
<i>Clostridium spp. e V. propionispira spp e V. zymophilusspp.;</i> <i>Clostridium spp e V. propionispira spp e V. zymophilussppe</i> <i>Bacteroides spp;</i> <i>V. propionispira spp e V. zymophilusspp e Enterobacter spp. e</i> <i>Klebsiella spp. e Citrobacter spp. e Leclercia spp.</i> <i>Lactobacillus spp e Shewanella spp. e Clostridium spp.</i>	Etanol	Xafenias, Anunobis e Mapelli, 2015.
<i>Cladosporiumcladosporioides e Geotrichumcandidum</i>	Proteases Ácidos orgânicos	Jakovljevic e Vrvic, 2018.
<i>Trichodermareesei e Aspergillusniger</i>	Enzimas	Gutierrez- Correia et al., 1998
<i>Trichodermareesei e Aspergillusoryzae</i>	Enzimas celulolíticas	Brijwani, Oberoie Vadlani, 2010.
<i>Trichodermareesei RutC30 e Aspergillusniger CBS 554.65</i> <i>Trichodermareesei RutC30 e Aspergillussaccharolyticus AP</i> <i>Trichodermareesei RutC30 e Aspergillus carbonarius 5010</i>	Enzimas	Kolasa et al., 2014.
<i>Euglena gracilis e Selenastrum</i> <i>Euglena gracilis e C. sorokiniana</i> <i>Selenastrum e C. sorokiniana</i> <i>Euglena gracilis e Selenastrum e C. sorokiniana</i>	Lipídios	Tossavainen et al., 2018.
<i>Rhodospidiumtoruloides e Chlorella vulgaris</i>	Lipídios	Zheng et al., 2018.
<i>Rhodospidiumtoruloides e Chlorellapyrenoidosa</i>	Lipídios	Ling et al., 2014.
<i>Pseudomonas composti e Characium spp.</i>	Lipídios	Berthold et al., 2019

Fonte: dados da literatura.

O uso de culturas mistas tem sido amplamente utilizadas na obtenção de diversos produtos desejáveis ao longo dos anos, como é possível observar na Tabela 4. A utilização de culturas mistas apresenta diversas vantagens, pois por se tratar de uma relação entre mais de um tipo de organismo apresenta um meio de crescimento competitivo o que pode ser responsável pelo maior desenvolvimento dos microrganismos envolvidos, levando-os a produzir uma maior quantidade e maior diversidade de compostos metabólicos que podem alterar a composição do meio e isso pode ser benéfico para o outro microrganismo. Culturas mistas são capazes ainda de provocar transformações em várias etapas que seriam impossíveis para um único microrganismo, permitindo uma melhor utilização do substrato. Além de serem menos suscetíveis a contaminações indesejadas e a produção estável de compostos desejados diminuindo os custos associados à manutenção de culturas puras (HESSELTINE, 1992; DENNIS et al., 2013; FUJIKAWA, MUNAKATA e SAKHA, 2014).

4. METODOLOGIA

4.1 Linhagens microbianas, manutenção e inóculo

As linhagens de fungos filamentosos *C. echinulata*, *M. circinelloides* ATCC 38313, *P. ostreatus*, foram cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia, Análise de Alimentos e Produtos, da Habite – Incubadora de Empresas de Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, campus universitário de Gurupi. As linhagens são mantidas em meio de cultivo ágar batata dextrose (BDA) após cultivo por 4 a 15 dias, a 25°C. A manutenção das linhagens será realizada utilizando o método Castellani, retirando-se discos de 1 cm das colônias de fungos e colocadas em frascos contendo água destilada esterilizada. Os frascos serão mantidos em refrigerador a 4 °C.

O inóculo foi preparado por meio da reativação das linhagens fúngicas em placas contendo BDA. As linhagens de *C. echinulata*, *M. circinelloides* ATCC 38313 foi realizada uma suspensão de esporos em solução salina (NaCl 0,85%) e padronizada a 10^7 esporos por mL, utilizando câmara de Neubauer. As linhagens de *P. ostreatus* foram retirados de 6 discos (1 cm) contendo micélio em placa contendo BDA.

4.2 Desenvolvimento de cultura mista para produção de lipídios

4.2.1 Determinação do crescimento fúngico

Para determinação do tipo de crescimento, um disco de micélio (aproximadamente 5 mm) dos fungos analisados foi repicado ao centro da placa de Petri nos meios de cultivo BDA e MEA, incubadas a 25 °C. Foi feita medição diária utilizando-se régua de 30 cm. Os isolados foram classificados em dois grupos: crescimento lento ou crescimento rápido. Foram considerados crescimento rápido os que levaram até 5 dias para crescer por toda extensão da placa de Petri e crescimento lento os que levaram mais de 5 dias.

4.2.2 Teste de compatibilidade *in vitro*

As interações foram realizadas por oposição direta entre culturas duplas de micélio, conforme descrito por Skidmore e Dickinson (1976); Stahl e Christensen,

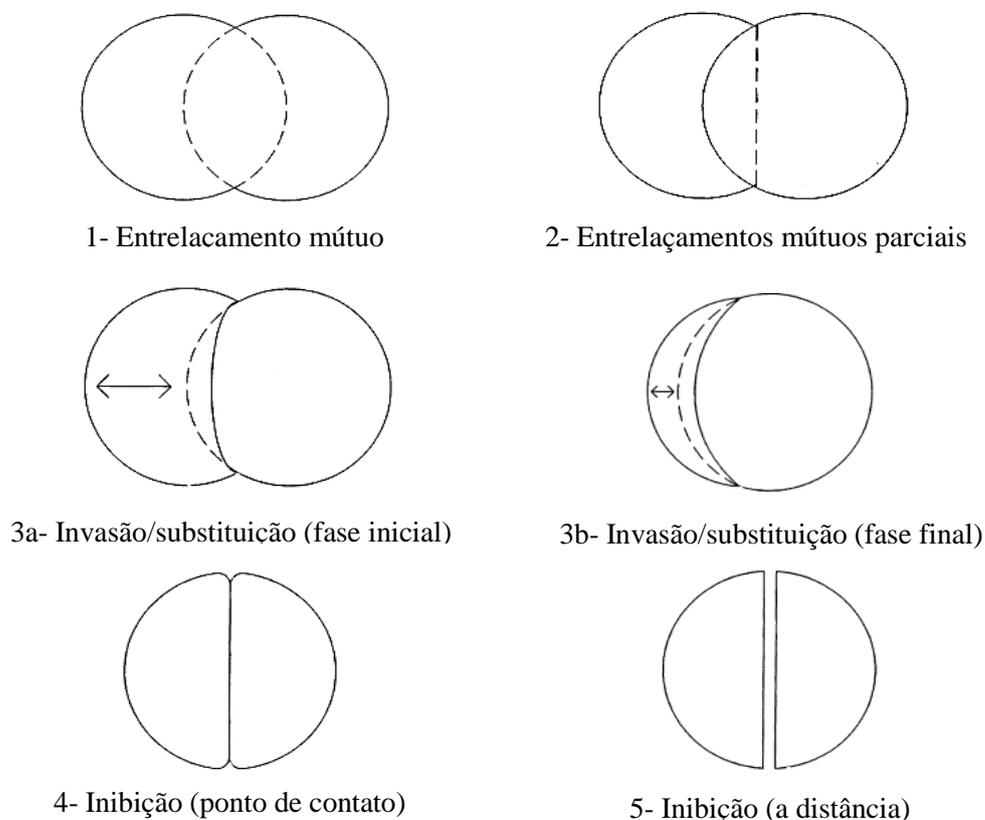
(1992) e Molla et al. (2001). Os cinco modos de interações entre fungos filamentosos são mostrados na Tabela 6. As representações gráficas são mostradas na Figura 12.

Tabela 6. Modelos de interação entre fungos filamentosos.

Interação	Definição
1 Entrelaçamento mútuo	Crescimento em que ambos os fungos crescem sem sinal macroscópico de interconexões.
2 Entrelaçamento mútuo parcial	Crescimento onde o fungo cresce acima ou abaixo do outro sem qualquer zona de inibição.
3 Invasão/substituição	Um micélio cresce sobre o outro e começa consumi-lo, podendo substituí-lo.
4 Inibição (ponto de contato)	Os fungos aproximam-se um do outro até com uma linha de demarcação de 1 a 2 mm, entre as duas colônias claramente visíveis.
5 Inibição (a distância)	Inibição a uma distância > 2 mm.

Fonte: adaptado de Molla et al. 2001.

Figura 12. Diagrama esquemático das interações entre duas linhagens diferentes de fungos filamentosos crescidos em ágar batata dextrose e ágar extrato de malte



Fonte: Adaptado de Stahl e Cristensen, 1992.

4.2.3 Desenho experimental para os testes de compatibilidade

A avaliação das possíveis interações entre os fungos foi realizada em meio de cultura BDA e MEA. Dois discos (5mm) de diferentes fungos foram cultivados de forma oposta um do outro na mesma placa de Petri para avaliar as consequências de diferentes interações fúngicas. Os controles foram realizados em cultura pura inoculados no canto da placa.

Para cada interação, os isolados de crescimento rápido foram inoculados mais tarde que a linhagem de crescimento lento. Os cultivos foram mantidos a 25 °C e observados diariamente até ser possível identificar o tipo de interação. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3 Produção de biomassa fermentada

4.3.1 Cultivos submersos

Os cultivos foram realizados utilizando *C. echinulata*, *M. circinelloides* ATCC 38313, *P. ostreatus* e as três diferentes combinações de cultura mista. Para preparação do meio de cultura utilizou o caldo de batata dextrose (CBD), onde para a preparação de 1 litro utilizou-se 200 g de batata e 20 g de dextrose. Estes foram realizados em frascos de Erlenmeyer (125 ml) onde adicionou-se 20 ml do meio de cultura esterilizado e foi adicionado 1 ml do inóculo (padronizado com a relação de 10^7 esporos/g) para os microrganismos esporulados e 6 fragmentos de micélio para *P. ostreatus* e incubados por 5 dias para fungos de crescimento rápido e 7 dias para fungos de crescimento lento a 150 rpm a 25°C.

Para avaliação do rendimento lipídico utilizou-se a seguinte equação:

$$y = \frac{\text{lipídio total}(g)}{\text{biomassa}(g)}$$

Para verificar o rendimento da biomassa utilizou-se equação abaixo:

$$Q = \frac{y(g)}{\text{tempo de cultivo}(h)}$$

4.3.2 Cultivo em estado sólido

Os cultivos foram realizados conforme a metodologia de Morales et. al. (2018) com modificações, onde utilizou-se sacos de polipropileno contendo uma mistura de 5 g de aveia em flocos e 5 gramas de aveia em flocos finos a umidade foi ajustada com 5 ml de CBD. Os substratos foram autoclavados por 20 minutos a 121°C. Após o resfriamento, os sacos de polipropileno contendo aveia foram inoculados com 1 ml da suspensão de esporos (10^7 esporos/g) de *C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313 e 6 fragmentos de micélio para *P. ostreatus*, e incubados por 5 dias quando possuíam apenas culturas puras e combinação de fungos de crescimento rápido (*C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313) e 10 dias quando continham *P. ostreatus*, pois primeiro foi feita sua inoculação por 5 dias, para adição da linhagem de crescimento rápido para combinação, e incubados a 25°C.

4.4 Caracterização química dos cultivos em estado sólido.

O teor de umidade foi determinado por gravimetria a 105°C em estufa até obtenção de peso constante segundo método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2006). A concentração de proteína foi determinada por nitrogênio total utilizando fator de conversão para cereais: 5,83 (MARCHINI et. al., 1998) por meio da técnica de Kjeldahl, conforme método 991.20 da Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 1998). Cinzas foram determinadas por incineração em mufla conforme método 930.22 da AOAC (1998).

Os carboidratos foram estimados por diferença, subtraindo-se os valores obtidos para umidade, proteínas, lipídios, fibra e cinzas do total de 100%. O valor energético total da biomassa foi estimado considerando-se os fatores de conversão de Atwater de 4 kcal/g de proteína, 4 kcal/g de carboidrato e 9 kcal/g de lipídeo.

4.4.1 Extração de Lipídios dos cultivos em estado sólido e submerso

Os CES foram secos 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). Os CS foram filtrados em aparato de filtração a vácuo e

levados a estufa conforme descrito anteriormente para CES. A fração de lipídeo foi extraída seguindo a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1954), utilizando-se clorofórmio – metanol (2:1 v/v).

Foram pesadas 5 gramas de cada CES seco e o conteúdo total de biomassa seca obtida em cada CS em Erlenmeyers de 250 mL com tampa, adicionando-se inicialmente 10 mL de metanol 20 mL de clorofórmio e 8 ml de água destilada e a foi levado a mesa agitadora por 30 min. Após esse processo foi adicionado 10 ml de clorofórmio e 10 ml solução de sulfato de sódio anidro a 1,5%. A mistura foi filtrada por gravimetria (Figura 11), no filtro foi adicionado 5 gramas de sulfato de sódio anidro. Os filtrados foram mantidos em repouso por cerca de 30 minutos. A fase inferior, ou seja, o extrato de clorofórmio contendo os lipídios foi removido para um tubo de ensaio com tampa. O filtrado foi concentrado em secagem estufa. Em seguida, as amostras foram pesadas em balança analítica até a obtenção do peso constante.

Figura 13. Extração lipídica de biomassa fermentada por fungos filamentosos.



Fonte: o autor.

4.4.2 Extração de Fibra em detergente neutro

O conteúdo de fibra foi determinado pelo método de fibra em detergente neutro (FDN) de Van Soest (1967) com adaptações, onde pesou-se 0,5 g da amostra seca, no tubo de digestão. Adicionou-se 40 ml de solução detergente neutra, previamente preparada com água destilada, ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico di-hidratado, fosfato de sódio anidro e sulfato láurico de sódio. Levou-se ao bloco aquecedor para digestão em recipiente contendo água (Figura 12). O bloco aquecedor deve estar em

temperatura de ebulição (aproximadamente 100° C) assim que a água no recipiente com os tubos digestores entrar em ebulição, permanece por 2 horas.

Figura 14. Bloco aquecedor para digestão de fibra em detergente neutro.



Fonte: o autor.

Após 2 horas no bloco aquecedor, transferiu-se o conteúdo dos tubos digestores para aparato de filtração a vácuo (Figura 13). O filtro de papel utilizado foi previamente mantido por 2 horas em estufa a 50°C e pesado. Procedeu-se a filtragem a vácuo, lavando o resíduo 3 vezes com água fervente. A amostra foi levada a estufa de secagem a 50°C por 24 horas.

Figura 15. Filtração de amostras para extração de fibra em detergente neutro.



Fonte: o autor.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados com delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados das análises da composição nutricional foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico SISVAR, havendo diferença significativa o teste de Tukey foi aplicado ao nível de 5% de significância (FERREIRA, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do crescimento fúngico

As linhagens de fungos filamentosos utilizadas neste trabalho foram selecionadas de acordo com informações obtidas na literatura para a produção de ácidos graxos essenciais e acúmulo de proteínas. A linhagem *C. echinulata* pode acumular até 30 – 50% de lipídios com altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, com ênfase no ácido γ -linolênico (CHEN e CHAN, 1996; GEMA et al., 2002; FAKAS et al., 2006; LI et al., 2019); enquanto que a linhagem *M. circinelloides* ATCC 38313 é relatada na literatura como importante produtora de ácidos graxos γ -linolênico, araquidônico (WYNN et al., 2001; ZHAO et al., 2016). O gênero *Pleorotus*, conhecido popularmente como Shimeji, é muito utilizado na culinária por apresentar altos valores nutricionais como vitaminas, aminoácidos essenciais e lipídios, além de propriedades medicinais (SARDAR et al., 2017; ZHOU et al., 2019).

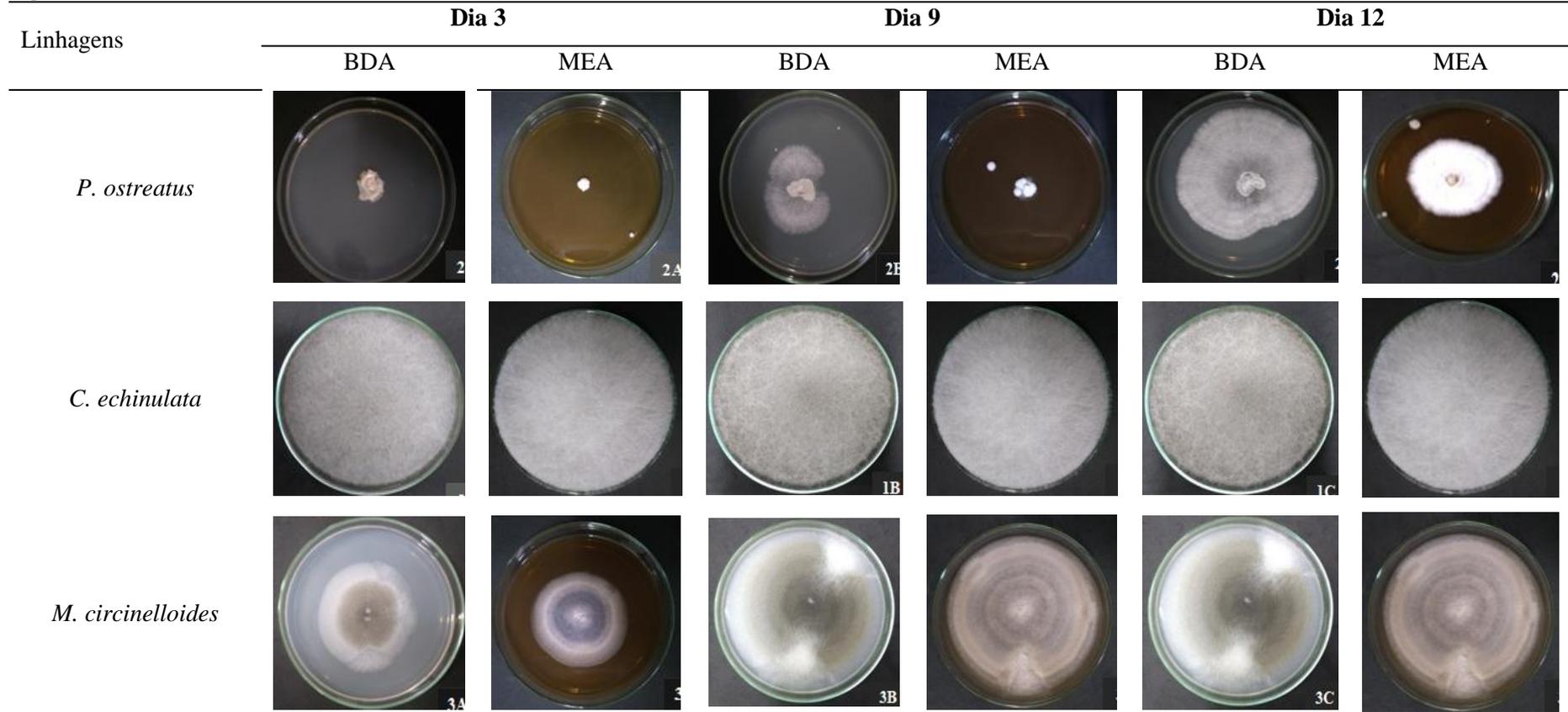
Inicialmente, as linhagens selecionadas foram cultivadas em dois meios de cultura distintos, ágar batata dextrose (BDA); ágar extrato de malte (MEA), para avaliar a taxa de crescimento diário e classificar o tipo de crescimento dos fungos. Os fungos que ocuparam a placa por completo após 5 dias de cultivo foram considerados de crescimento rápido e os que precisaram de mais que 5 dias, de crescimento lento (Tabela 7 e Figura 16).

Tabela 7. Taxa de crescimento diário *P. ostreatus*, *C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313 em diferentes meios de cultura.

Linhagens	Dia 3		Dia 9		Dia 12		Classificação
	BDA	MEA	BDA	MEA	BDA	MEA	
<i>P. ostreatus</i>	1,4±0,3a	0,9±0,2a	6,0±2,0 a	3,1±0,9 a	6,6±1,6 a	3,1±2,0a	Lento
<i>C. echinulata</i>	11,0±0,0 b	Rápido					
<i>M. circinelloides</i>	6,9±0,2 b	6,5±0,2 b	11,0±0,0 b	11,0±0,0 b	11,0±0,0 b	11,0±0,0 b	Rápido

Médias de triplicata e estimativa de desvio padrão. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste de Tukey. Legenda: Ágar batata dextrose (BDA); Ágar extrato de malte (MEA). Todos os valores estão em cm.
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 16. Taxa de crescimento diário *C. echinulata*, *P. ostreatus*, *M. circinelloides* ATCC 38313 dias 3, 9 e 12 dias em diferentes meios.



Legenda: Ágar batata dextrose (BDA); Extrato de malte (MEA). Condições de cultivo: os cultivos foram mantidos a 25°C por 12 dias.

Fonte: dados da pesquisa.

O crescimento microbiano pode apresentar variações no seu comportamento dependendo da composição do meio de cultivo. Donini et al. (2005) relata a importância da medida do diâmetro micelial para determinar parâmetros de crescimento avaliando o meio de cultura e a necessidade ou não de enriquecimento do meio. As diferentes taxas de crescimento entre culturas puras podem ser explicadas pelas diferenças morfo-fisiológicas que afetam diferentes respostas para a adoção e transporte de nutrientes. Além disso, o crescimento de fungos é influenciado pelo intervalo de tempo, que é maior para fungos de crescimento rápido do que para fungos de crescimento lento, sendo importante principalmente quando se deseja estudar a interação entre eles, como é o caso deste trabalho (MORE et al., 2010; JAKOVLJEVIC e VRVIC, 2018;).

5.2 Teste de compatibilidade *in vitro*.

Cultivos mistos são aquelas em que o inóculo consiste sempre de dois ou mais organismos. As culturas mistas podem consistir em espécies conhecidas, com exclusão de todas as outras, ou podem ser compostas de misturas de espécies desconhecidas (MOHAMMAD et al., 2011). Neste trabalho, as interações foram estudadas inoculando-se o micélio em oposição direta (teste confronto direto). As combinações entre as linhagens fúngicas foram as seguintes: *C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313; *C. echinulata* e *P. ostreatus*; *M. circinelloides* ATCC 38313 e *P. ostreatus*.

Para interações onde ambos os fungos foram classificados como crescimento rápido (*C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313), a inoculação foi simultânea. As interações com fungos classificados como crescimento rápido e outro com crescimento lento (*P. ostreatus*), primeiro inoculou-se o fungo de crescimento lento e aguardou-se crescimento até a metade da placa de Petri para inoculação de linhagem de crescimento rápido. Uma vez que com a inoculação simultânea, o fungo de crescimento rápido poderia reprimir ou até mesmo sobrepor o fungo de crescimento lento, impossibilitando o seu crescimento e expansão.

Na Tabela 8 são observadas as interações entre as linhagens avaliadas nos meios de cultivo BDA e MEA. Pode-se observar que a composição do meio de cultura influenciou no tipo de interação entre as linhagens. A interação entre *M. circinelloides* ATCC 38313 e *C. Echinulata* apresentou-se como entrelaçamento mútuo em meio BDA e inibição pelo contato em meio MEA. A interação entre *P. ostreatus* e *C. echinulata*

mostrou-se incompatível no meio BDA (invasão/substituição) e compatível no meio MEA (entrelaçamento parcial). Por fim, a interação entre *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313 mostrou-se compatível no meio BDA (entrelaçamento parcial) e incompatível em meio MEA (invasão/substituição).

Tabela 8. Classificação de tipos de interação entre *C. echinulata*, *M. circinelloides* ATCC 38313 e *P. ostreatus* nos meios de cultura BDA e MEA.

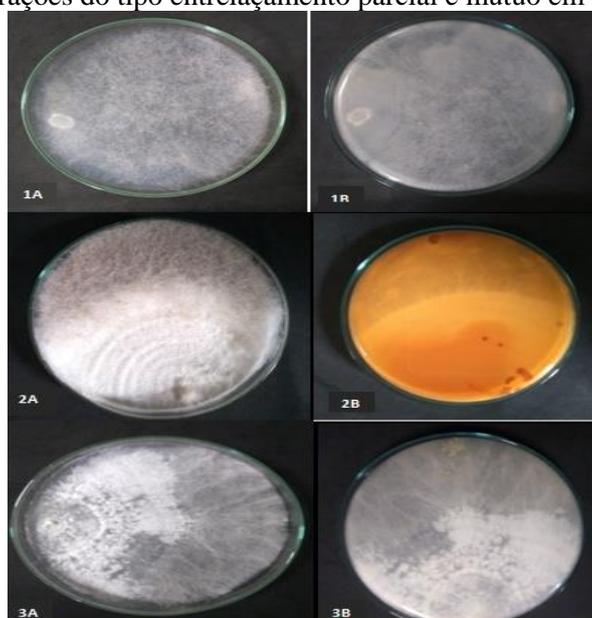
Espécies em interação	Meio de cultivo	
	BDA	MEA
<i>MC – CE</i>	Entrelaçamento mútuo	Inibição (ao ponto de contato)
<i>PO – CE</i>	Invasão/ Substituição	Entrelaçamento parcial
<i>PO – MC</i>	Entrelaçamento parcial	Invasão/ Substituição

Legenda: *CE*: *C. echinulata*, *MC*: *Mucor circinelloides* ATCC 38313, *PO*: *P. ostreatus*. BDA (ágar batata dextrose). MEA (ágar extrato de malte). Condições de cultivo: os cultivos foram mantidos a 25°C, por 21 dias.

Fonte: dados da pesquisa.

As interações ocorridas entre as linhagens avaliadas foram analisadas visualmente nas Figuras 17, 18 e 19.

Figura 17. Interações do tipo entrelaçamento parcial e mútuo em diferentes meios.



Legenda: 1A e 1B: *M. circinelloides* e *C. echinulata* frente e reverso em BDA; 2A e 2B: *P. ostreatus* e *M. circinelloides* frente e reverso em MEA; 3A e 3B: *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313 frente e reverso em BDA.

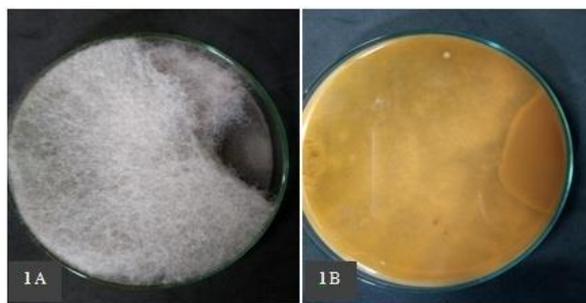
Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados observados neste trabalho são comumente observados na literatura. Vários fatores podem influenciar na interação entre as linhagens. Oliveira et al. (2011) relataram que é possível que a presença simultânea de vários microrganismos possa levar a maiores efeitos sinérgicos ou supressores entre eles, associados à liberação de produtos metabólicos, como os ácidos orgânicos, interferindo com o metabolismo, alteração na fisiologia, aumento de atividade proteolítica e outros metabólitos. Kolasa et al. (2014) em seu estudo observaram resultados semelhantes onde as colônias de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus saccharolyticus*, *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* foram capazes de crescer na proximidade um do outro e se misturar na fronteira entre eles. Dessa forma é possível dizer que as interações entre os microrganismos envolvidos são importantes em uma cultura mista.

Na interação entre *M. circinelloides* ATCC 38313 e *C. echinulata* no meio de cultura MEA é possível observar que ao se encontrarem ocorre a inibição por contato (Figura 18). No reverso de todas as placas que mostraram inibição ao contato formou-se uma linha esbranquiçada de inibição, como também pode ser observado que as hifas sofreram algum tipo de alteração que impediu o avanço do crescimento destas linhagens.

O que acontece neste tipo de interação é que geralmente um dos fungos ou ambos sintetizam metabólitos, que restringem ou inibem o crescimento do outro fungo filamentososo em seu território (MOLLA et al., 2001; JAKOVLJEVIC e VRVIC, 2018).

Figura 18. Incompatibilidade do tipo inibição por contato *C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313 em meio MEA.

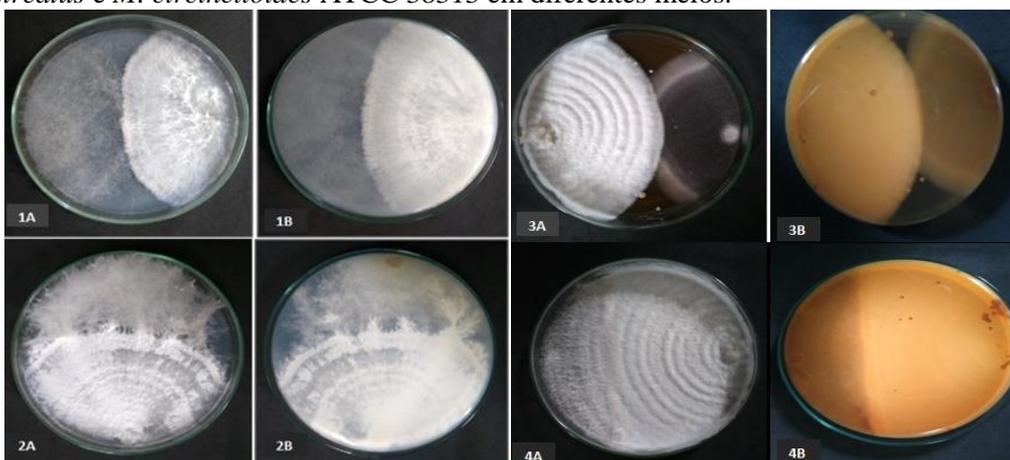


Legenda: MEA: ágar extrato de malte. 1A: Frente, 2B: reverso.
Fonte: dados da pesquisa

O outro tipo de combinação observado foi de invasão/substituição (fase inicial e fase final) entre as combinações *P. ostreatus* e *C. echinulata* no meio de cultivo BDA e entre *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313 em MEA (Figura 19). As observações revelaram que na interação houve invasão sob a linhagem de *C. echinulata*

que começou a ser substituído por *P. ostreatus* (fase inicial). Na fase final de invasão/substituição, pode-se observar que *C. echinulata* foi quase substituído totalmente pela linhagem de *P. ostreatus*, de maneira que seu crescimento foi completamente interrompido.

Figura 19. Incompatibilidade do tipo invasão/substituição entre *P. ostreatus* e *C. echinulata* e *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313 em diferentes meios.



Legenda: 1A e 1B: *P. ostreatus* e *C. echinulata* fase inicial frente/reverso; 2A e 2B: fase final frente/reverso *P. ostreatus* e *C. echinulata* em meio BDA; 3^a e 3B: *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313 fase inicial, frente/reverso; 4A e 4B: fase final frente/reverso *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313.

Fonte: dados da pesquisa.

Na Tabela 9 é possível observar numericamente a interação entre as culturas mistas e o diâmetro máximo das colônias controle. Na interação entre *P. ostreatus* e *C. echinulata* em BDA, que sofreu invasão/substituição o resultado foi marcado em um estágio inicial (no dia 12), após 24 horas de inoculação do *C. echinulata* e ao final mostrando uma redução de 1,2 cm. Semelhantemente acontece com *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313 em MEA, onde há uma redução do *M. circinelloides* ATCC 38313 de 0,8 cm do dia 12 ao dia 21, uma vez que isso implica um comportamento antagônico dependente da fonte de nutriente envolvida.

Tabela 9. Diâmetro máximo das colônias controle e co-cultura de fungos no 3º, 12º e 21º dia de cultivo.

Combinações	Dia 3				Dia 12				Dia 21			
	Controle		Co-cultura		Controle		Co-cultura		Controle		Co-cultura	
	BDA	MEA	BDA	MEA	BDA	MEA	BDA	MEA	BDA	MEA	BDA	MEA
<i>P.ostreatus</i>	2,2±0,6a	2,5±0,1a	1,3±0,1ab	2,5±0,4b	7,0±2,1a	10,0±0,1a	6,5±1,2b	9,20±0,8c	11,0±0,4a	11,0±0,0a	11,0±0,7a	11,0±0,0b
<i>M. circinelloides</i>	4,2±0,1b	7,6±2,3	0,0±0,0a	0,0±0,0a	11,0±0,0b	11,0±0,0a	2,6±1,5a	5,5±0,6b	11,0±0,0a	11,0±0,0a	5,5±1,0a	4,7±0,4a
<i>P.ostreatus</i>	2,2±0,6a	2,5±0,1a	2,0±0,3b	2,3±0,4b	7,0±2,1a	10,0±0,1a	6,70±0,5b	8,00±2,0c	11,0±0,4a	11,0±0,0a	11,0±0,2a	11,0±3,9b
<i>C.echinulata</i>	10,5±0,4c	11,0±1,8c	0,0±0,0a	0±0,08a	11,0±0,0 b	11,0±0,0a	5,4±0,4b	4,2±1,6b	11,0±0,0a	11,0±0,0a	4,2±0,1a	4,2±0,2a
<i>M. circinelloides</i>	4,2±0,1b	7,6±2,3b	3,0±0,3b	2,8±0,3a	11,0±0,0b	11,0±0,0a	3,0±0,3a	2,8±0,3a	11,0±0,0a	11,0±0,0a	3,0±0,3b	2,8±0,3a
<i>C. echinulata</i>	10,5±0,4c	11,0±1,8c	11,0±0,0c	11,0±0,0c	11,0±0,0b	11,0±0,0a	11,0±0,0c	11,0±0,0c	11,0±0,0a	11,0±0,0a	11,0±0,0b	11,0±0,0b

Médias de triplicata e estimativa de desvio padrão. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste de Tukey. Condições de cultivo: os cultivos foram mantidos a 25°C. Legenda: BDA (ágar dextrose batata). MEA (ágar extrato de malte). Todas as medidas estão em cm.

Fonte: dados da pesquisa

Existem vários tipos de interações entre espécies microbianas, incluindo mutualismo, competição, comensalismo e amensalismo. Entre estas interações, competição seria mais comum entre as espécies em interação porque os microrganismos necessitam de nutrientes para crescerem (FUJIKAWA, MUNAKATA e SAKHA, 2014).

Do ponto de vista biotecnológico, estas interações podem trazer benefícios para um bioprocessamento aumentando a quantidade de produto acumulado. More et al. (2010) relatam que o crescimento de fungos em interação é influenciado pelos membros da comunidade que, geralmente sintetiza alguns elementos metabólicos que restringiram o crescimento do outro. Já como resultado da interação mútua nas culturas ocorre aumento da biomassa acumulada ao final do processo. Neste sentido, os cultivos mistos entre linhagens de fungos filamentosos oleaginosos podem aumentar a produção de biomassa e o acúmulo de lipídios intracelulares, assim como alterar o perfil de ácidos graxos insaturados podendo aumentar ou acumular ácidos graxos que se apresentem em baixas concentrações nos cultivos preparados em cultura pura.

5.3. Conteúdo de lipídio nos cultivos submersos

As técnicas de cultivo submerso são mais utilizadas para obtenção de produtos desejáveis, por se tratar de um ambiente mais controlado quando comparado com cultivos em estado sólido (CERTÍK, ADAMECHOVÁ e LAOTENG, 2012; FARINAS et al., 2015; ALJAMMAS, FATHI e HALKALAF, 2018). Na Tabela 10 são apresentados os resultados para a produção de lipídio pelas linhagens de fungos filamentosos utilizadas no trabalho e suas combinações em culturas mistas. As linhagens foram cultivadas em caldo batata dextrose a 25°C sob agitação de 150 rpm.

Tabela 10. Produção lipídica por fungos filamentosos em condições de cultivo submerso

Espécie ou combinação	Biomassa seca (g/L)	Lipídios (g/L)	Y p/x (g/g)	Q (g/h)	Lipídios (%)
<i>C. echinulata</i>	2,5±0,0a	0,99500±0,0d	0,39800±0,0f	0,00332±0,0f	39,80±0,0 f
<i>M. circinelloides</i>	7,5±0,0b	1,07500±0,0 e	0,14333±0,0e	0,00119±0,0 e	14,33±0,0e
<i>P. ostreatus</i>	32,0±0,0d	0,38000±0,0b	0,01188±0,0c	0,00007±0,0 c	1,18±0,0c
<i>P. ostreatus</i> <i>M. circinelloides</i>	27,0±0,0c	0,10000±0,0a	0,00370±0,0a	0,00005±0,0 b	0,37±0,0a
<i>P. ostreatus</i> <i>C. echinulata</i>	27,0±0,0c	0,14000±0,0a	0,00519±0,0b	0,00003±0,0 a	0,52±0,0b
<i>M. circinelloides</i> <i>C. echinulata</i>	7,5±0,0b	0,50500±0,0c	0,06733±0,0d	0,00056±0,0 d	6,73±0,0d

Legenda: Y: rendimento lipídico, Q: rendimento biomassa. Condições de cultivo: as culturas foram mantidos a 25°C, 150 rpm em caldo de batata dextrose. Valores expressos em matéria seca.

Fonte: dados da pesquisa.

C. echinulata apresentou maior rendimento lipídico (39,80±0,0% e 0,39800±0,0 g/g) e o maior rendimento de biomassa em cultivo submerso (0,00332±0,0g/h), porém o menor em biomassa seca (2,5 g/L).

Li et al. (2019) investigaram a produção de lipídios por *C. echinulata* em condições de cultivos semelhantes ao deste trabalho, onde se manteve os cultivos a 25°C a 150 rpm em caldo de batata dextrose, encontraram um teor lipídico de 36,3% na biomassa fúngica. Ling et al. (2015) obtiveram 21,8% de teor lipídico após 9 dias de CS que utilizou glicose como fonte de carbono e sais minerais como fonte de nitrogênio em uma temperatura de 28°C. Li et al. (2018) avaliaram a produção de lipídios em diferentes fontes de carbono, onde o meio utilizado continha extrato de batata e adição de 2 e 5% de trealose e 5% de glicose, os cultivos foram mantidos a 25°C a 150rpm por oito dias. Os autores observaram conteúdo lipídico total de 32,29% em 5% de trealose e de 34,05% em 5% de glicose. Esses achados demonstram que a fonte de carbono usada tem grande influência na acumulação lipídica por *C. echinulata*.

Neste trabalho é possível observar que *M. circinelloides* ATCC 38313 apresentou o segundo maior teor de lipídios (14,33±0,0% e 0,14333±0,0 g/g) e rendimento de 0,00119±0,0 g/h de biomassa por dia durante o cultivo submerso. A biomassa seca rendeu 7,5 g/L. Lima et al. (2017) ao estudar a produção de biomassa e lipídios de *Mucor subtilissimus* UCP/WFCC 1262, *C. echinulata* UCP/WFCC 1299 e *Rhizopus microsporus* UCP/WFCC 1304, em meios constituídos por diferentes concentrações de milhocina, melão de cana-de-açúcar a 150 rpm numa temperatura de

28°C, e encontraram teores de biomassa entre 0,35 e 3,55g/L para *M.subtilissimus*, 5,85 a 9,05 g/L de biomassa e 8,54% e 46,96% de lipídios em *C.echinulata* UCP/WFCC 1299, e 5,3 a 5,95 g/L de biomassa e 2% a 4,5% para *Rhizopus microsporus* UCP/WFCC 1304.

Xia et al. (2011) ao avaliarem diferentes condições em CS para produção de lipídios por *M. circinelloides* utilizando glicose como substrato, em uma temperatura de 27°C, encontraram 12% de lipídios. Kosa et al. (2018) analisaram a produção de lipídios em condições submersas utilizando glicose e sais minerais e temperatura a 28°C, em várias linhagens do gênero *Mucor*. A maior produção de biomassa foi observada com as espécies de *M. circinelloides* com a produção de lipídio entre 22 a 27%. Rivaldi et al. (2017) utilizaram glicose e sais minerais como fonte de carbono e nitrogênio a temperatura de 26°C para o cultivo de *M. circinelloides* URM 4140. Nestas condições, os autores obtiveram um teor de 28,10% lipídeo na biomassa seca.

Carvalho et al. (2016) ao cultivarem *M.circinelloides* URM 4182, em fonte de carbono (sacarose, xilose, frutose, amido de milho, etanol ou glicerol), enriquecida com sais minerais e extrato de levedura a 250 rpm, numa temperatura de 26°C encontram valores de produtividade de biomassa entre 1,25 a 1,72 g/h com rendimentos lipídicos superiores a 12% para as fontes de carbono avaliadas.

Os fungos basidiomicetos são importantes do ponto de vista biotecnológico, pois são responsáveis por compostos biotecnologicamente ativos, como os lipídios. Dentre as espécies de basidiomicetos, *P. ostreatus* se mostra promissor na produção de ácidos graxos, principalmente os AGPI (CAVANCHES et al., 2015). O menor teor lipídico encontrado entre as culturas puras neste trabalho foi em *P. ostreatus*1, 18%±0,0 bem como seu rendimento 0,01188±0,0 g/h de cultivo.

Tarnopol'skaya et al. (2015) observaram um acúmulo de 2,8% de lipídio quando a linhagem *P. ostreatus* foi cultivada em biorreator. Smiderle et al. (2012) avaliaram diferentes tipos de açúcares como fonte de carbono em cultivo líquido para a produção de lipídios por *Pleurotus pulmonarius*. Neste trabalho, os autores observaram um acúmulo de lipídio de 0,8% para glicose, 0,97% para xilose, galactose 0,91% e arabinose 1,61% do peso seco micelial. Portanto, observa-se que a fonte de carbono utilizada para os cultivos influenciam diretamente na produção e acumulação de lipídios por fungos filamentosos.

O rendimento de biomassa de *P. ostreatus* apresentou-se baixo 0,00007±0,00 g/h. Carvajal et al. (2012) ao cultivarem *A. brasiliensis* em culturas submersas utilizando

glicose e sais minerais a 28°C em 160 rpm durante 10 dias obtiveram rendimento máximo de biomassa 10,2±1,10 g/L. Dulay, Ray e Hou (2015) ao cultivarem *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus cystidiosus*, *Volvariella volvacea* e *Schizophyllum commune* em caldo sabouraud dextrose a 28°C e 30°C sem agitação encontraram rendimento máximo de biomassa de 0,8g/30ml.

Dentre as culturas mistas avaliadas neste trabalho a combinação de *M. circinelloides* ATCC 38313 e *C. echinulata* apresentou os maiores teores de lipídios 6,73% ±0,0 e o melhor rendimento lipídico 0,06733±0,0 g/L e melhor rendimento de biomassa por dia de cultivo com 0,00056±0,0 g/L, seguido da combinação *P. ostreatus* e *C. echinulata* que apresentou 0,52% ± 0,0 de lipídios e rendimento de 0,00519±0,0 g/L e o rendimento de biomassa por dia mais baixo dentre todas as combinações (0,00003±0,0 g/L). A combinação de *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313 apresentou o menor teor lipídico (0,37%±0,0) e o menor rendimento 0,00370±0,0 g/L/dia e o segundo maior rendimento de biomassa por dia entre as culturas mistas 0,00005±0,0 g/L.

O uso de culturas mistas em CS de fungos filamentosos para obtenção de lipídios ainda não foi explorada, sendo que os resultados descritos na literatura se referem ao uso de microalgas. Zheng et al. (2018) em um cultivo misto de *Rhodospiridium toruloides* e microalgas oleaginosas *Chlorella vulgaris* relatou que houve aumento de até 23% quando comparado com a cultura pura. Ling et al. (2014) cultivou *Rhodospiridium toruloides* e *Chlorella pyrenoidosa* em águas residuais domésticas e observou conteúdo lipídico de 63,45%.

5.4 Conteúdo de lipídio nos cultivos em estado sólido

O uso de lipídios microbianos para suplementação e uso na alimentação na alimentação humana tem chamado a atenção, pois os microrganismos oleaginosos são capazes de produzir lipídios com um rendimento elevado e perfil de AGPI que são eficazes na promoção de saúde (CHEN e CHANG 1996; CHEN e LIU 1997; KAVADIA et al., 2001; GEMA et al., 2002; FAKAS et al. 2006; SANTAMAURO, 2014; CARVALHO et al., 2015; LI et al., 2019;).

Neste trabalho, os cultivos em estado sólido foram realizados com aveia como substrato devido suas características químicas, pois sendo uma boa fonte de carbono e

quantidades adequadas de nitrogênio, é capaz de fornecer uma boa relação C/N, ideal para o crescimento microbiano e acumulação de lipídios, principalmente os AGPI (BÉLIGON et al., 2016; BELLOU et al., 2016).

Na Tabela 11 são apresentados os resultados para a acumulação de lipídios microbianos nas culturas puras e mistas de *C. echinulata*, *M. circinelloides* ATCC 38313 e *P. ostreatus*. Os teores de lipídios produzidos por cada cultura (mistas e puras) foram diferentes estatisticamente. Das seis culturas apenas *P. ostreatus* não representou incremento no teor lipídico em relação ao substrato utilizado, sendo que *C. echinulata* ($4,29\% \pm 0,00$) gerou o maior aumento de sete vezes o teor de lipídios no substrato ($0,59\% \pm 0,00$) e *P. ostreatus* teve o menor teor lipídico ($0,11 \pm 0,00$).

Tabela 11. Produção de lipídios por fungos filamentosos em cultivo em estado sólido.

Espécie ou Combinação	Lipídios g/kg	% Lipídios
<i>C. echinulata</i>	42,90±0,00g	4,29±0,00g
<i>M. circinelloides</i>	39,10±0,00f	3,91±0,00f
<i>P. ostreatus</i>	1,08±0,00a	0,11±0,00a
<i>P. ostreatus</i> <i>M. circinelloides</i>	19,64±0,00c	1,96±0,00c
<i>P. ostreatus</i> <i>C. echinulata</i>	20,1±0,00d	2,01±0,00d
<i>M. circinelloides</i> <i>C. echinulata</i>	35,56±0,00e	3,55±0,00e
Aveia	5,92±0,00b	0,59±0,00b

Médias de triplicata e estimativa de desvio padrão. Condições de cultivo: as culturas foram mantidas a 25°C por 7 dias para culturas puras e cultura mistas de *C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313 e 14 dias para culturas mistas de *P. ostreatus*. Valores expressos em matéria seca. Valores assinalados com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste de Tukey.

Os dados obtidos em CES seguiram o mesmo comportamento observado no CS, onde o maior percentual de lipídios foi obtido pelos fungos *C. echinulata* e *M. circinelloides* e pelo cultivo misto destas duas espécies.

O teor lipídico produzido por *C. echinulata* neste trabalho é semelhante ao encontrado por Fakas et al. (2008) que cultivou este microrganismo em bagaço hidrolisado de tomate e após o processo fermentativo obteve incremento de 4%. Apesar desse incremento ser relevante quando considerado o substrato, por se tratar de um microrganismo que acumula entre 30% e 32% de lipídios (ALAKHRAS et al., 2015; KOSA et al., 2018) em seu peso seco o teor encontrado é baixo, indicando que as condições de cultivo não foram favoráveis ao acúmulo de lipídios.

Fakas et al. (2008) sugerem ao avaliar concomitantemente a expressão enzimática de *C. echinulata* que a ação das proteases no início do crescimento provavelmente resultou na liberação de grandes quantidades de nitrogênio assimilável que favorece a produção de biomassa em vez de lipídeo, uma vez que é necessária a depleção de nitrogênio para ativação da via de produção lipídica.

M. circinelloides ATCC 38313 apresentou o segundo maior percentual de lipídico ($3,91\% \pm 0,00\%$), representando um incremento de seis vezes o teor lipídico presente na aveia, porém esses valores estão muito abaixo dos encontrados por Qiao et al. (2018) que fermentou ramos de amora e obteve $28,8 \pm 2,85\%$ e Ozsoy et al. (2015) que cultivando polpa de beterraba extraiu 25% de lipídios.

Qiao et al. (2018) observaram em seu trabalho que a concentração de biomassa fúngica aumentou rapidamente até o máximo, e começou a diminuir ligeiramente após um determinado período de tempo, o rendimento lipídico seguiu o mesmo padrão, aumentando inicialmente e depois diminuiu o que pode ser atribuído ao uso dos lipídios de armazenamento para a produção de biomassa. E a justificativa para tal acontecimento é a redução da atividade de enzimas que decompõem açúcares, levando assim limitação do material disponível para fermentação o que levaria os lipídios armazenados a serem convertidos em nova biomassa.

Da mesma forma, Lin et al. (2010) descobriram que a degradação lipídica ocorreu no CES de *A. oryzae* A-4 de acordo com a diminuição da atividade de celulase, podendo assim ser sugestivo que em fungos filamentosos a diminuição da degradação de carboidratos devido à baixa atividade de enzimática reduz o acúmulo lipídico e leva utilização dos lipídios produzidos para formação de biomassa.

Os cultivos mistos entre as linhagens de *M. circinelloides* ATCC 38313 e *C. echinulata* realizados em flocos de aveia apresentaram um percentual menor de lipídios acumulados comparados as culturas puras, indicando a possibilidade da presença dos dois microrganismos produzirem compostos que podem suprimir a síntese ou acumulação de lipídeo.

Os teores lipídicos tanto da cultura pura quanto das culturas mistas de *P. ostreatus* foram os mais baixos quando comparados com as demais culturas, sendo a cultura pura o menor percentual encontrado ($0,11 \pm 0,00\%$). Cavanches et al. (2015) encontraram teores lipídeo em *P. ostreatus* maiores que os encontrados no presente trabalho cultivando em diferentes substratos que variaram entre 1,30 e 2,40%, e ressaltaram que os menores teores correspondiam aos que continham aveia em sua

composição. Rahman et al. (2012) utilizando farelo de trigo e palha de arroz como substrato encontraram teores lipídicos que variaram entre 5,08 e 3,24% sendo o maior percentual encontrado no controle, que não possuía a presença de farelo de trigo. Esses achados podem sugerir que cereais não são substratos ideais para serem utilizados com a finalidade de aumento de lipídios ou ainda a necessidade de otimização desses substratos a bases de cereais para utilização por *P. ostreatus*.

5.5 Aspectos nutricionais da biomassa fermentada

A fermentação é um processo no qual um microrganismo utiliza matéria orgânica para obtenção de energia e nesse processo libera compostos metabólicos primários ou secundários. Processos fermentativos ocorrem na natureza de forma espontânea, desde os primórdios da humanidade é possível observar sua utilização para obtenção de novos produtos com valor agregado (WARD, 1991; TORTORA, 2006).

O CES é um processo fermentativo realizado por microrganismos que crescem sobre substratos sólidos e úmidos. Estes atuam como fontes de nutrientes e sustentam o crescimento microbiano na ausência ou quase ausência de água. A CES não é uma tecnologia de bioprocessamento, uma vez que tem sido aplicada principalmente na região asiática desde a antiguidade, porém é uma técnica de grande interesse por agregar valor ao substrato fermentado (DULF et al., 2017; YAZID et al., 2017).

O processo fermentativo teve como iniciativa o enriquecimento dos componentes centesimais da aveia; portanto, foram determinados os teores de carboidratos, proteínas, lipídios, umidade, cinzas e fibras e estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Composição centesimal de biomassa seca fermentada por fungos filamentosos.

Espécie ou Combinação	Umidade	Proteínas	Carboidratos	Fibras	Cinzas	kcal
<i>C. echinulata</i>	50, 66±6,73bc	21,66±0,15b	22,84±2,09ab	47,88±2,01ab	3,25±0,04e	216,62± 7,93bc
<i>M. circinelloides</i>	47, 63±2,84bc	20,46±5,50b	13,98±5,68a	58,75±1,47bcd	2,87±0,32de	173,02±5,60ab
<i>P. ostreatus</i>	42, 66±1,90b	3,39±1,65a	31,52±8,66bc	63,31± 7,44cd	1,65±0,10ab	140,63±29,96a
<i>P. ostreatus</i> <i>M. circinelloides</i>	50, 29±5,28bc	15,78±2,87b	11,67±5,24a	68,48±6,94d	2,09±0,03bc	127,50±27,87a
<i>P. ostreatus</i> <i>C. echinulata</i>	58, 23±4,21c	3,31±0,28a	41,79±3,56cd	50,52±3,33abc	2,34±0,02c	198,54±13,37bc
<i>M. circinelloides</i> <i>C. echinulata</i>	49, 64±6,84bc	3,63±0,85a	47,03±0,66d	43,67± 1,43a	2,42±0,06cd	234,69±5,77c
Aveia	11.36±1,07a	15,03±2,61b	40,32±3,29cd	42,49±4,97a	1,55±0,29a	226,75±20,31c

Médias de triplicata e estimativa de desvio padrão. Condições de cultivo: as culturas foram mantidas a 25°C por 7 dias para culturas puras e cultura mistas de *C. echinulata* e *M. Circinelloides* ATCC 38313 e 14 dias para culturas mistas de *P. ostreatus*. Teor de umidade expresso em porcentagem (%). Valores de proteína, lipídeo, carboidratos, fibras e cinzas expressos em % de matéria seca. kcal expresso em 100g de matéria seca. Valores assinalados com a mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste de Tukey.

A umidade é o fator ambiental que mais influencia o processo de cultivo em estado sólido, pois altos teores de umidade resultam em diminuição da porosidade, baixa difusão de oxigênio, aumento do risco de contaminação, redução do volume de gás e redução de troca gasosa. Porém, baixos níveis de umidade levam a um menor grau de crescimento e pouca utilização do substrato (CUNHA et al., 2016). Neste trabalho foram feitos testes prévios para ajuste do teor de umidade, sendo o melhor teor de umidade inicial encontrado para o crescimento de 40%. Após o processo de fermentação o teor de umidade nos substratos apresentou acréscimos da umidade inicial que variaram entre 2,66% e 18,23%.

Houve diferença significativa entre *P. ostreatus* (42,66% \pm 6,34), a combinação *P. ostreatus* e *C. echinulata* (58,23% \pm 6,34) e aveia (11,36% \pm 6,34), sendo que a aveia apresentou o teor mais baixo de umidade, porém é semelhante ao encontrado na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) que corresponde a 9,1%. Sales - Campos et al. (2011) que cultivaram *P. ostreatus* em diferentes resíduos de madeira e bagaço de cana encontrou 9,57 a 10,89%.

Os maiores teores de proteína encontrados no presente trabalho foram observados com as culturas pura de *C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313 (21,66 \pm 0,15% e 20,46 \pm 5,50%), proporcionando um acréscimo de 44% e 36%, respectivamente, em relação ao substrato não fermentado (15,02% \pm 2,61). Croatet al. (2016) utilizaram as linhagens de *Aureobasidium pullulans* NRRL-58522, *A. pullulans* NRRL-42023, *A. pullulans* NRRL-Y-2311-1, *Trichoderma reesei* NRRL-3653, *Fusarium venenatum* NRRL-26139, *Pichia kudriavzevii* e *M. circinelloides* para fermentação de farinha de canola para o enriquecimento proteico e observaram um aumento de 9 a 23% de proteínas totais.

Os teores de proteínas encontrados em *P. ostreatus*, e entre a combinação *P. ostreatus* e *C. echinulata* foram menores que o valor encontrado na aveia. Ergun e Uroc (2017) encontraram percentuais entre 1,97 \pm 0,08 e 0,168 \pm 0,01 de proteínas após fermentação por *P. ostreatus* de casca de batata seca e fresca respectivamente. O fungo *P. ostreatus* é um conhecido produtor de proteases extracelulares, principalmente tripsina, durante toda fase de crescimento do fungo (INÁCIO et al., 2015). Dessa forma como é possível observar neste trabalho os teores de proteínas são menores depois do processo de fermentação da aveia, podendo ser devido ao consumo de nitrogênio tanto para síntese de proteases quanto pela degradação das proteínas existentes no meio por proteases.

O teor de proteína na combinação *M. circinelloides* ATCC 38313 e *C. echinulata* foram menores depois do processo de fermentação da aveia. A combinação de culturas de microrganismos pode gerar compostos metabólitos que podem inibir ou ativar a produção de compostos, podendo aumentar ou diminuir compostos desejáveis (HESSELTINE, 1992; DENNIS et al., 2013; FUJIKAWA, MUNAKATA e SAKHA, 2014;). No caso da combinação de *C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313, o cultivo misto gerou baixos teores de proteínas quando comparados com as culturas puras, podendo ser justificado pela produção de algum composto metabólico que suprimiu a produção de proteínas, e menores teores quando comparado a aveia, indicando que houve degradação de proteína, sabendo-se do potencial de produção enzimática de *M. circinelloides* (SOUZA et al., 2015).

Após o processo fermentativo houve redução significativa nos teores de carboidratos das culturas puras e a cultura mista de *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313 em relação ao substrato. Isso ocorre devido à utilização do carboidrato pelo microrganismo para obtenção de energia. Xie et al. (2015) demonstraram em seu estudo a capacidade de *C. echinulata* FR3, de degradar a lignina presente no substrato utilizado para produção em lipídios. Martínez et al. (2015) também afirmaram a capacidade de fungos em degradar carboidratos simples e complexos para sua utilização em atividades metabólicas, principalmente para conversão em lipídios.

Com o influxo de carboidratos de digestibilidade rápida e alto índice glicêmico em nações desenvolvidas contribuiu para a epidemia de obesidade e doenças cardiometabólicas. Além disso, as dietas tradicionais à base de amido de alguns países em desenvolvimento provavelmente contribuíram para o aumento do risco de doenças crônicas, com a diminuição da atividade física e maior índice de massa corporal associado à rápida urbanização (LUDWIG, 2018). Dessa forma é desejável e importante o desenvolvimento de produtos alimentícios que tenham menores teores de carboidratos simples.

A cultura mista de *M. circinelloides* ATCC 38313 e *C. Echinulata* apresentou os maiores teores de carboidratos, inclusive maior que o encontrado na aveia. Sabendo que a celulose é a principal fração das paredes celulares de alimentos de origem vegetal, é linear e cristalina e é um homopolímero de unidades repetidas de glicose ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$, e os fungos oleaginosos usam primeiramente a celulose como fonte de carbono para crescer (QIAO et al., 2018), esse comportamento pode

indicar que houve uma grande degradação de celulose presente no substrato não havendo sido completamente utilizado para o metabolismo lipídico.

P. ostreatus, *C. echinulata* apresentaram quantidades semelhantes de carboidratos ao do substrato, pois não houve diferença estatística. Isso pode indicar que as culturas mistas induziram maior secreção de enzimas lignocelulósicas que são capazes de aumentar a degradação de carboidratos complexos, principalmente os de parede celular. (LIN et al., 2010; CHEIRSILP e KITCHA, 2015; QIAO et al., 2018;)

Outra observação que pode ser feita é a associação entre os menores níveis de carboidratos estarem relacionados aos cultivos que apresentaram maior teor proteico, com exceção a cultura de *P. ostreatus*. Esses resultados podem estar relacionados ao fato de que os fungos utilizados neste CES terem alta capacidade de produção de enzimas que podem ser quantificadas como proteína, visto que o método aqui utilizado determina o teor de nitrogênio, elevando o teor proteico e diminuir o de carboidratos, pois as enzimas produzidas por esses fungos são principalmente celulasas (LIN et al., 2010; CHEIRSILP e KITCHA, 2015).

Neste trabalho houve incremento de fibras em todas as culturas em relação ao conteúdo do substrato apesar da cultura *M. circinelloides* e *C. echinulata* não ter apresentado um aumento significativo estatisticamente, as demais culturas apresentaram um acréscimo em relação ao substrato que variou 11,2% e 61,16%. Croat et al. (2016) observaram em seu estudo um incremento entre 11,1% e 20,1% de fibras na composição de farinha de canola fermentada por *M. circinelloides*. Considerando a relação entre saúde e alimentação, a introdução de preparações mais saudáveis auxilia na manutenção da saúde. Nesse contexto destacam-se os efeitos positivos no consumo de fibras por seus inúmeros benefícios, que se devem principalmente pelo aumento do bolo fecal e do trânsito intestinal, redução dos níveis séricos de lipídios e insulina, maior saciedade, redução do risco de câncer de intestino e de doenças cardiovasculares, auxílio no controle e manutenção de peso corporal e tratamento de portadores de diabetes insulino-dependentes (MIRA, GRAF e CANDIDO, 2009; MELLO e LAAKSONEN, 2009; LOTTENBERG, FAN e BUONACORSO, 2010; SOUZA, 2011; BERNAUD e RODRIGUES, 2013).

Os teores de fibra encontrados neste trabalho para cultura pura de *P. ostreatus* ($63,31 \pm 10,28\%$) são superiores ao encontrado por Bernadi et al. (2009) que encontraram em seu estudo um teor de 18,25% de fibra em *P. ostreatus*. Sales-Campos et al. (2011) encontraram teores de fibra entre 18,89 e 30,5%. Hoa, Wang e Wang

(2015) encontraram teores que variaram entre 22% e 29,25%. As culturas mistas que continham *P. ostreatus* também apresentaram os maiores teores de fibras, sugerindo assim que estes fungos apresentem um maior teor de celulose, hemicelulose e lignina em sua parede celular.

A falta de qualquer hidrólise de fibra ocorre provavelmente devido a dois fatores: a presença de níveis suficientes de mono- e dissacarídeos durante o processo de fermentação evitando a indução de genes responsáveis pela produção de enzimas que hidrolisam fibras e a falta de tratamento prévio para tornar as fibras suscetíveis à hidrólise (CROAT et al., 2016). Neste trabalho foi possível observar que os maiores níveis de fibras foram encontrados justamente nos cultivos onde os teores de carboidratos foram menores, indicando assim que estes cultivos continham quantidades adequadas de monossacarídeos para utilização do fungo. Este fato levou a uma redução dos níveis de carboidrato presente no substrato e evitou assim a indução da produção de enzimas que degradam os carboidratos de parede celular, e que o oposto também aconteceu na combinação de *C. echinulata* e *M. circinelloides* ATCC 38313, onde houve os maiores teores de carboidratos e os menores de fibra.

O conteúdo de cinzas diz respeito ao resíduo inorgânico ou matéria mineral remanescente após a completa combustão da matéria orgânica (SOUZA et al., 2017). Logo, este método é capaz de indicar o teor do conteúdo de mineral presente, no material avaliado. No presente trabalho, observou-se que houve um incremento significativo no conteúdo de minerais em comparação ao substrato, exceto para a cultura de *P. ostreatus*, que apesar do acréscimo, não apresentou diferença significativa.

Sales-Campos et al. (2012) encontraram teores de cinzas entre 6,10 e 8,97% utilizando resíduos de madeira e bagaço de cana para fermentação de *P. ostreatus*. Bernadi et al. (2009) observaram um teor de 32,58% de teor mineral nos cultivos com *P. ostreatus* em fermentação de capim elefante pasteurizado. Christia et al. (2016) avaliaram o teor de cinzas de CES de cachos de dendê fermentado por *Mucor indicus* e encontraram valores de 2,3 a 5%. Há pouco ou nenhum estudo que determina os teores de cinzas em CES por fungos filamentosos, sendo mais comum encontrar a determinação para *P. ostreatus*.

O aumento do teor mineral pode ser justificado pela fisiologia fúngica e mecanismo de digestão do substrato principalmente carboidrato que é uma fonte orgânica e fixando a matéria inorgânica (WALKER e WHITE, 2017). Desse modo é

possível relacionar ainda a diminuição de carboidrato e aumento do teor mineral nos CES.

Alimentos processados tem sido considerado um dos fatores que contribuem para o aumento na prevalência de obesidade e doenças crônicas. E a recomendação da Organização Mundial da Saúde (OMS), é a redução do consumo de alimentos com alto teor de energia e de sódio, gorduras saturadas, gorduras trans e carboidratos refinados e pobres em nutrientes(OMS, 2003; BIELEMANN et al., 2015).

Considerando que a OMS (2003) relata que houve um aumento significativo no consumo de calorias totais diárias de 2681 kcal para 3380 kcal e que 50% dessa energia provem de cereais e informa que o houve aumento significativo de doenças crônicas e excesso de peso, o desenvolvimento de alimentos que tenha o teor energético menor se faz importante.

Neste trabalho é possível observar que após o processo de fermentação houve redução no valor energético da biomassa comparada ao valor energético observado na aveia, com exceção a cultura mista de *M. circinelloides* e *C. echinulata* ($234,69 \pm 5,77$ kcal) ter apresentado um pequeno aumento, porém não significativo estatisticamente. Os valores de diários de referência com base numa dieta com 2000 kcal, da biomassa representam entre 6,37% e 11,73% e a aveia representa 11,33% do valor diário de referência.

Silva et al. (2018) ao avaliarem a composição centesimal de farinha de amaranto encontraram valor calórico de 347,60 kcal em 60 g. Amaral et al. (2019) encontraram 368,85 e 287,86 kcal por 100 g, em farinha de boicauva, despulpadas de forma manual e mecânica respectivamente. Cardoso et al. (2014) ao caracterizarem a farinha da casca de pequi encontraram valor calórico de 229,9 kcal. Isso indica que farinhas a base de cereais apresentam um alto teor calórico e que a redução do teor calórico encontrado neste trabalho se torna relevante considerando a necessidade do desenvolvimento de alimentos com teor calórico reduzido, porém com alto valor nutricional.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de microrganismos para produção de compostos desejáveis tem se tornado um campo de estudo promissor devido sua aplicabilidade para produção industrial. Neste trabalho foram estudados os fungos filamentosos *C. echinulata*, *M. circinelloides* ATCC 38313, *P. ostreatus*, inicialmente foram feitos estudos para avaliação da capacidade de crescimento e interação entre os microrganismos através de culturas mistas. Foi possível observar interações entre *M. circinelloides* ATCC 38313 e *C. echinulata* do tipo entrelaçamento mútuo em BDA e inibição ao ponto de contato em MEA. A interação *P. ostreatus* e *C. Echinulata* apresentou invasão/substituição em BDA e entrelaçamento parcial em MEA ao passo que a interação entre *P. ostreatus* e *M. circinelloides* ATCC 38313 apresentou entrelaçamento parcial em BDA e invasão em MEA.

Ao desenvolver os cultivos em condições submersas foi possível encontrar rendimentos lipídicos semelhantes ao descrito pela literatura para linhagem de *C. echinulata*, porém abaixo do relatado para as demais linhagens. Os cultivos mistos para obtenção de lipídios nesse tipo de cultivo submerso são relatados apenas com uso de algas e isso demonstra a necessidade de mais estudos utilizando culturas mistas de fungos filamentosos.

Os cultivos em estado sólido utilizando aveia como substrato como forma de enriquecimento lipídico apresentou teores abaixo que o descrito pela literatura para todas as espécies de fungos estudadas, porém ao avaliar a composição nutricional da biomassa obtida após a fermentação esta apresentou teores de proteínas, minerais e fibras elevados e o valor energético reduzido quando comparadas com a aveia.

Não existem trabalhos que relatam a produção de biomassa fermentada por fungos filamentosos com objetivo de inserção na alimentação humana, tornando assim este trabalho valioso para futuros estudos que visam o desenvolvimento de alimentos enriquecidos nutricionalmente a base de cereais, visto que estes são responsáveis pela obtenção de energia e nutrientes por grande parte da população humana mundial e a associação do adoecimento por doenças crônicas devido a modificação na alimentação humana ao longo dos anos a utilização desse novo produto alimentício pode ser uma estratégia para produção de alimentos mais saudáveis com propriedades funcionais e nutracêuticas pela indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

AGGELOPOULOS, T.;KATSIERIS, K.;BEKATOROU,A.;PANDEY, A.;BANAT, I.A.; KOUTINAS,A.A. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. **Food chemistry**, v. 145, p. 710-716, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.105>.

ALAKHRAS, R.; BELLOU, S.;FOTAKI, G.;STEPHANOU, G.; DEMOPOULOS, N. A.;PAPANIKOLAOU,S.;AGGELIS, G. Fatty acid lithium salts from *Cunninghamella echinulata* have cytotoxic and genotoxic effect son HL-60 human leukemia cells. **Engineering Life Sciences**, 15: 243-253. 2015. Disponível em: doi:10.1002/elsc.201400208.

ALAM, N.;AMIN R.;KHAN A.;ARA I.;SHIM M.J.;LEE M.W.;LEE T.S. Nutritional analysis of cultivated mushrooms in Bangladesh–*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida* and *Calocybe indica*.**Mycobiology**, v. 36, n. 4, p. 228-232, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23997631>.

ALBUQUERQUE, T. Composição em ácidos gordos de batatas fritas de pacote comercializadas em Portugal e a sua importância na nutrição. Tese de Mestrado. Coimbra: Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra. 2009. Disponível: http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/727/1/ Mestrado_TGA.pdf. Acesso em: 19/07/2019.

AMARAL, L. A.; LOUBET FILHO, P. S.; CAVALHEIRO, L. F.; GALVANI, F.; SANTOS, E. F. Comparação das propriedades químicas e do perfil lipídico das farinhas de bocaiuva (*Acrocomia spp.*) despulpada de forma manual e mecânica. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 6, n. 2, p. 59-63, abr./jun. 2019. ISSN 2358-6303. <https://periodicosonline.uems.br/index.php/agrineo/article/view/2737/2849>. Acesso em: 07/08/2019.

ANG, S. K.;SHAZA,E.M.; ADIBAH Y.;SURAINI,A.A.;MADIHAH E.M. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation.**Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1293-1302, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019>. Acesso em: 21/07/2019.

ARUNA,T.E. Production of value-added product from pineapple peels using solid state fermentation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v.57. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102193>. Acesso em: 20/07/2019.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official method of analysis**. 16th ed. Arlington, 1997. v.2.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official method of analysis**. 16th ed. Arlington, 1998. v. 1.

BANSAL, N.;TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S.K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste management**. v. 32, n. 7, p. 1341-1346, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>. Acesso em: 19/06/2019

BEHERA, A.; SUDHANSHU, S.; RAY, J.; RAMESH, C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International journal of biological macromolecules**, v. 86, p. 656-669, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>. Acesso em: 16/07/2019.

BÉLIGON, V.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C.N. Microbial lipids as potential source to food supplements. **Current Opinion in Food Science**. v. 7. p. 35–42. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.10.002>. Acesso em: 18/03/2018.

BELL, S.J.; BRADLEY, D.; FORSE, R.A.; BISTTRIAN, B.R. The new dietary fats in health and disease. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v.97, p.280-286, 1997.

CALVACHE, O.L.B; CABRERA, E.V.H.; MUNOZ, A.O.V.; PERDOMO, D.A. Fatty acid of functional mushroom *Pleurotus ostreatus* grown in agro-industrial solid waste. **Producción+ Limpia**, v. 10, n. 1, p. 73-81.2015. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552015000100007. Acesso em: 20/06/2019.

BERNAUD, F.S. L.; RODRIGUES, T.C. Fibra alimentar ingestão adequada e efeitos sobre a saúde e metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.57. n. 5. p. 397-405. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abem/v57n6/01.pdf>. Acesso em 05/05/2018.

BERNARDI, E.; DONINI, L.P.; MINOTO, E.; NASCIMENTO, J.S. Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 4, p. 901-907, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000687052009000400009&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 26/07/2019.

BERTHOLD, D.E.; SHETTY, K.G.; JAYACHANDRAN, K.; LAUGHINGHOUSE, D.; GANTAR, M. Enhancing algal biomass and lipid production through bacterial co-culture. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, p 280-289, março 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.033>. Acesso em: 10/07/2019.

BIELEMANN, R.M.; SANTOS, M.J.V.; MINTEN, G.C.; HORTA, B.L.; GIGANTE, D.P. Consumo de alimentos ultraprocessados e impacto na dieta de adultos jovens. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, pp. 1-10 Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 2015. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/672/67240213026.pdf>. Acesso em: 07/08/2019.

BIZ, A.; FINKLER, A.T.J.; PITON, L.O.; MEDINA, B.S.; KRIEGER, N.; MITCHELL, A. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 54-62, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.007>. Acesso em: 10/07/2019.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; CAN. J. **Biochemical. Physiology**. 1959, 37, 911.

BOTHAM, P. A.; RATLEDGE, C. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. **Microbiology**, v.114, n. 2. p. 361-375.1979. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/44315>. Acesso em: 05/05/2018.

BRANDT, M. J. Starter cultures for cereal based foods. **Food Microbiology**, v.37. p.41-43. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24230471>. Acesso em: 23/03/2018.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 120-128, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.08.015>. Acesso em: 22/06/2019.

BRITO, I.P.; CAMPO, J.M.; SOUZA, T.F.L.; WAKIYAMA, C.; AZEREDO, G.A. Elaboração e avaliação global de barra de cereais caseira. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 1, p. 35-50, jan./jun. 2004. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/viewFile/1178/979>. Acesso em: 15/05/2018

CALO, S.; NICOLÁS, F.E.; LEE, S.C; VILA, A.; CERVANTES, M.; MARTINEZ, S.T.; RUIZ-VÁZQUEZ, R.M.; CARDENAS, M.E; HEITMAN, J. A non-canonical RNA degradation pathway suppresses RNAi-dependent epimutations in the human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. **PLOS Genetics**, v. 13, n. 3. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28339467>. Acesso em: 31/01/2019.

CARDOSO, A.E.A.; ZANELATO, E.F.N.; VIANA, E.S.N.; MOREIRA, A.P.B.; CARDOSO, L.M. Características físico-químicas da farinha da casca do pequi (*Caryocar Brasiliense Camb.*) e seu aproveitamento na elaboração de barras de cereais. **Anais VI SIMPAC** - Volume 6 - n. 1 - Viçosa-MG - jan. - dez. 2014 - p. 209-214. Disponível em: <https://academico.univicoso.com.br/revista/index.php/RevistaSimpac/article/view/449/592>

CARVAJAL, A.E.S.S.; KOEHNLEIN, E.A.A.; ELER, A.A.S.G; BRATCH, A.N.T.A.; PERALTA, R.M. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei*) and their antioxidant properties. **LWT - Food Science and Technology**, v.46, n.2. p. 493-499, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.018>. Acesso em: 11/08/2019

CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B.; FILHO, H. J. I.; CASTRO, H. F. Approaches to convert *Mucor circinelloides* lipid into biodiesel by enzymatic synthesis assisted by microwave irradiations. **Renewable Energy**, v.125. p.747-754. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.012>. Acesso em: 17/07/2019.

CARVALHO, A. K.; RIVALDI, J. D.; BARBOSA, J. C.; DE CASTRO, H. F. Biosynthesis, characterization and enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides* a sustainable pathway for biofuel production. **Bioresource**

Technology, v. 181, p. 47-53. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.110>. Acesso em: 17/07/2019.

CERTIK, M. Enhancement of Nutritional Value of Cereals with γ -Linolenic Acid by Fungal Solid-State Fermentations. **Food Technology Biotechnology**. v. 44, n.1. p. 75–82. 2006.

CERTÍK, M.; ADAMECHOVÁ, Z; LAOTENG, K. Microbial Production of γ -Linolenic Acid: Submerged versus Solid-state Fermentations. **Food Science Biotechnology**, v.21. 2012. p.921. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0121-2>. Acesso em: 18/03/2018.

CHEIRSILP, B; KITCHA, S. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 73-80, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.035>. Acesso em: 18/02/2019.

CHEN, H.C.; CHANG, C.C. Production of γ -Linolenic Acid by the Fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. **Biotechnol Progress**. v.12, p. 338–341, 1996. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1021/bp960009y>. Acesso em: 19/02/2019.

CHIESA, L.; SCHLABITZ, C.; SOUZA, C.F.V. Efeito da adição de erva-mate nas características sensoriais e físico-químicas de barras de cereais. **Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 71, n. 1, 2012. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552012000100015&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 31/05/2018.

CHRISTIA, A.; SETIOWATI, A.D.; MILLATI, R. KARIMI. K.; CAHYANTO, M.K.; NIKLASSON, C.; MOHAMMAD, J. T. Ethanol production from alkali-pretreated oil palm empty fruit bunch by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*. **International Journal of Green Energy**, v. 13, n. 6, p. 566-572, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15435075.2014.978004>. Acesso em: 20/07/2019.

COSTA, F. A. D.; TAVERNARI, F.C.; COSTA, O.A.D.; CASTRO. F.F.; REMUS, A. Enriquecimento com ácidos graxos da série ômega 3 em carne de aves e ovos. **PUBVET**. v.11, n.2, p.113-123, Fev., 2017. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/3644/enriquecimento-com-aacutecidos-graxos-da-seacuterie-ocircmega-3-em-carne-de-aves-e-ovos>. Acesso em: 06/07/2019.

CROAT, J. R.; GIBBONS, W. R.; BERHOW, M.; KARKI, B.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Conversion of canola meal into a high-protein feed additive via solid-state fungal incubation process. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n.4, p.499-507. 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11746-016-2796-7>. Acesso em: 18/07/2019.

CUNHA, J. R.B; SANTOS, F.C.P; ASSIS, F.G.V., LEAL, P.L. Cultivation of *Penicillium* spp. in soy bean crop residues for production of cellulase, protease and amylase. **Revista Ceres**, v. 63, n. 5, p. 597-604, 2016. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2016000500597&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0034-737X.
<http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201663050002>. Acesso em: 07/08/2019.

DE ROY, K.; MARZORATI, M.; ABBEELE, P.V.; VAN, W.T; BOON, N. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. **Environmental Microbiology**, 16: 1472–1481. 2013. Disponível em: [doi:10.1111/1462-2920.12343](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12343). Acesso em: 20/07/2019.

DENNIS, P. G.; HARNISCH, F.; YEOH, K.Y.; TYSON, G.W.; RABAEY, K. Dynamics of cathode-associated microbial communities and metabolite profiles in a glycerol-fed bioelectrochemical system. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, n. 13, p. 4008-4014, 2013. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/79/13/4008>. Acesso em: 17/06/2019.

DESSIE, W.; ZHANG, W.; XIN, F.; DONG, W.; ZHANG, M.; MA, J.; JIANG, M.; Succinic acid production from fruit and vegetable wastes hydrolyzed by on-site enzyme mixtures through solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1177-1180, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.171>. Acesso em: 20/07/2019.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6065-6072, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.032>. Acesso em: 18/07/2019.

DIAS, B. F.; SANTANA, G. S.; PINTO, E. G.; OLIVEIRA, C. F. D. Caracterização físico-química e análise microbiológica de cookie de farinha de aveia. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 3, n. 3, p. 10–14, jul./set. 2016. Disponível em: <https://periodicosonline.uems.br/index.php/agrimeo/article/view/1201>. Acesso em: 27/05/2018.

DINIS, M. J.; BEZERRA, R.M; NUNES, F.; DIAS, A.A.; GUEDES, C.V.; FERREIRA, L.M.; CONE, J.W.; MARQUES, G.S.; BARROS, A.R.; RODRIGUES, M.A. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 20, p. 4829-4835, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.036>. Acesso em: 18/06/2019.

DONINI, L.P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J.S. Desenvolvimento *in vitro* de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.72, n.3, p.331-338, jul./set., 2005. Disponível em: www.researchgate.net/profile/Elisandra_Minotto/publication/267548852_Desenvolvimento_in_vitro_de_Pleurotus_spp_sob_a_influencia_de_diferentes_substratos_e_dextros_e/links/564269aa08ae997866c49d69/Desenvolvimento-in-vitro-de-Pleurotus-spp-sob-a-influencia-de-diferentes-substratos-e-dextrose.pdf. Acesso em: 24/01/2019.

DULAY, R.M.R.; RAY, K.; HOU, C.T. Optimization of liquid culture conditions of Philippine wild edible mushrooms as potential source of bioactive lipids.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 4, n.3, p. 409-415. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.04.003>. Acesso em: 11/08/2019

DULF, F. V.; VODNAR, D.C.; DULF, E.H.; PINTEA, A. Phenolic compounds, flavonoids, lipids and antioxidant potential of apricot (*Prunus armeniaca* L.) pomace fermented by two filamentous fungal strains in solid state system. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 92, 2017. Disponível em: <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13065-017-0323-z>. Acesso em: 21/07/2019.

DULF, F. V.; VODNAR, D.C.; DULF, E.H.; TOSA, M.I. Total phenolic contents, antioxidant activities, and lipid fractions from berry pomaces obtained by solid-state fermentation of two *Sambucus* species with *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 13, p. 3489-3500, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00520>. Acesso em: 19/07/2019.

DULF, F. V.; VODNAR, D. C.; SOCACIU, C. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. **Food chemistry**, v. 209, p. 27-36, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.016>. Acesso em: 19/07/2019.

EATON, S.B.; EATON, I.S.; SINCLAIR, L.; CORDAIN, L.; MANN, N. Dietary intake of long-chain polyunsaturated fatty acids during the paleolithic. **World Review of Nutrition Dietetics**. 83, 12-23. 1998.

ENDO, J.; ARITA, M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Cardiology**, v. 67, 22-27, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.08.002>. Acesso em: 18/06/2019.

ERGUN, S.O.; UREK, R.O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 2, p. 273-277, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.003>. Acesso em: 19/07/2019.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 73, p.676-683, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16850299>. Acesso em: 07/02/2019.

FAKAS, S.; CERTIK, H.; PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, L.; KOMAITIS, H.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M. γ -Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. **Bioresource Technology**. 99, n. 13, p.5986-5990. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.016>. Acesso em: 12/07/2019.

FAO. Fats and oils in human nutrition. Food and Nutrition Paper N°57, 1994.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.52. p.179-188. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136403211500739X>. Acesso em: 14/06/2019.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 2000, São Carlos, SP. **Programa e Resumos**. São Carlos: UFScar, 2000. p. 235.

FUJIKAWA, H.; MUNAKATA, K.; SAKHA, M.Z. Development of a Competition Model for Microbial Growth in Mixed Culture. **Biocontrol Science**. v. 19, n. 2, p. 61-71, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24975409>. Acesso em: 18/01/2019.

FUJITA, A.H.; FIGUEROA, M.O.R. Composição centesimal e teor de β -glucanas em cereais e derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.116-120, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v23n2/v23n2a03.pdf> .Acesso em: 22/02/2019.

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**. v.58 p.303–307, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11935180>. Acesso em: 07/02/2019.

GRAÇA, A.A.A. **Efeito da Pressurização da Semente de Soja no Metabolismo Ruminal dos Ácidos Gordos**. Tese de mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária / Instituto Superior de Agronomia- Universidade de Lisboa. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/10586/1/EFEITO%20DA%20PRESSURIZA%20C3%87%C3%83O%20DA%20SEMENTE%20DE%20SOJA%20NO%20METABOLISMO%20RUMINAL%20DOS%20C3%81CIDOS%20GORDOS.pdf>. Acesso em: 19/07/2019.

GUIMARAES, M.M.; SILVA, M.S. Qualidade nutricional e aceitabilidade de barras de cereais adicionadas de frutos de murici-passa. **Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 68, n. 3, 2009. Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552009000300015&lng=pt&nrm=iso>. acesso em 22/05/ 2018.

GUTKOSKI L. C. Influência dos teores de aveia e de gordura nas características tecnológicas e funcionais de bolos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2 p. 254-261, abr.-jun. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n2/03.pdf> Acesso em: 10/04/2018.

HESSELTINE, C. W. National Research Council (US) Panel on the Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods. **Applications of Biotechnology to Fermented Foods: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and**

Technology for International Development. Washington (DC): National Academies Press (US); 1992.

HOA, H.T.; WANG, C.; WANG, C. The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). **Mycobiology**, v. 43, n. 4, p. 423-434, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.4.423>. Acesso em: 01/08/2019.

HU, H.L.; VAN DEN BRINK, J.; GRUBEN, B. S.; WÖSTEN, H. A. B.; GU, J. D.; DE VRIES, R. P. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 65, p. 248-252. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830510002015>. Acesso em: 18/06/2019.

IAL. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005. 1018pp.

IMANAKA, H.; TANAKA, S.; FENG, B.; IMAMURA, K.; NAKANISHI, K. Cultivation characteristics and gene expression profiles of *Aspergillus oryzae* by membrane-surface liquid culture, shaking-flask culture, and agar-plate culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 109, n 3, p. 267-273, Março, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.09.004>. Acesso em: 17/06/2019.

INACIO, F.D.; FERREIRA, R.O.; ARAUJO, C.A.V.; BRUGNARI, T.; CASTOLDI, R.; PERALTA, R.M.; SOUZA, C.G.M. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/290161>. Acesso em: 16/07/2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: IMESP, 2006. p.98

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). **A Report of the Panel on Macronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and Interpretation and Uses**, 2005. 1357p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 8586-1: **sensory analysis, general guidance for the selection, training and monitoring of assessors**.: select assessors. Genebra, 1993. Part 1.

JAKOVLJEVIC, V.; VRVIC, M.M. Potential of pure and mixed cultures of *Cladosporium cladosporioides* and *Geotrichum candidum* for application in bioremediation and detergent industry. **Saudi Journal Biological Science**, v. 25, n. 3, p. 529-536, 2018. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5910629/ Acesso em: 08/02/2019.

KALAC, P. Chemical composition and nutritional value of european species of wild growing mushrooms: a review. **Food Chemistry**, v. 113, p.9-16. 2009. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608009229>. Acesso em: 15/02/2019.

KARAM, L.B, GROSSMANN, M.V.E, SILVA, R.S.S.F, Misturas de farinha de aveia e amido de milho com alto teor de amilopectina para produção de snacks. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 21, n. 2, p.158 – 163. 2001. <http://www.scielo.br/pdf/%0D/cta/v21n2/7460.pdf>. Acesso em: 21/05/2018.

KATAN, M.B. Fish and heart disease. *New Engl. J. Med.* 332, 1024-1025, 1995.

KOLASA, M.; AHRING, B. K.; LÜBECK, P. S.; LÜBECK, M. Co-cultivation of *Trichoderma reesei* RutC30 with three black *Aspergillus* strains facilitates efficient hydrolysis of pretreated wheat straw and shows promises for on-site enzyme production **Bioresource Technology**, v. 169, p. 143-148. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043347>. Acesso em: 07/01/2019.

KOSA, G.; ZIMMERMANN. B.; KOHLER.A.; EKEBERG.D.; AFSETH. N.K.; MOUNIER.J.; SHAPAVAL.V. High-throughput screening of *Mucoromycota* fungi for production of low-and high-value lipids. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 66, 2018. Disponível em: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-018-1070-7>. Acesso em: 19/07/2019.

LAMERS, D.; BIEZEN, N.V.; MARTENS, D.; PETERS, L.; ZILVER,E.V.; DREUMEL, N.J.V.; WIJFFELS, R.H.; LOKMAN, C. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. **BMC Biotechnology**,v. 16, n.45, 2016. Disponível em: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-016-0276-7>. Acesso em: 20/01/2019.

LANDS, B.; BIBUS, D.; STARK, K.D. Dynamic interactions of n-3 and n-6 fatty acid nutrients. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids**. v 136, p.15–21, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2017.01.012>. Acesso em: 15/06/2019.

LI, J.; KANEKO, T.; QIN, L.Q.; WANG, J.; WANG, Y. Effects of barley intake on glucose tolerance, lipid metabolism, and bowel function in women. **Nutrition**, v.19, p.926-929, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14624940>. Acesso em: 22/02/2019.

LI, S.; YU, H.; LIU, Y.; ZHANG, X.; MA, F. The lipid strategies in *Cunninghamella echinulata* for an allostatic response to temperature changes. **Process Biochemistry**, v.76, p.85-94. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511318307591>. Acesso em: 19/06/2019.

LIN, H.; CHENG, W.; DING, H.T; CHEN, X.J.; ZHOU, Q.F., ZHAO, Y.H. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.101, p.7556-7562.

2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.027>. Acesso em: 18/07/2019.

LING, X.; GUO, J.; ZHENG, C.; YE, C.; LU, Y.; PAN, X.; CHEN, Z.; NG, I.S. Simple, effective protein extraction method and proteomics analysis from polyunsaturated fatty acids-producing micro-organisms. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n.12, p. 2331-41. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1467-7>. Acesso em: 18/07/2019.

LING, J.; NIP, S.; CHEOK, W. L.; DE TOLEDO; R. A.; SHIM, H. Lipid production by a mixed culture of oleaginous yeast and microalga from distillery and domestic mixed wastewater. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 132-139. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.047>.

LOPES, M.; GOMES, A. S.; SILVA, C. M.; BELO, I. Microbial lipids and added value metabolites production by *Yarrowia lipolytica* from pork lard. **Journal of Biotechnology**, v.265, p.76-85. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165617317406>. Acesso em: 12/06/2019.

LOTTENBERG, A.M.P.; FAN, P.L.T.; BUONACORSO, V. Efeitos da ingestão de fibras sobre a inflamação nas doenças crônicas. **Einstein**. São Paulo, v. 8, n. 2, p. 254-258, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082010md1310>. Acesso em: 05/05/2018.

LUDWIG, D.S.; HU, F.B.; TAPPY, L.; BRAND-MILLER, J. Dietary carbohydrates: Role of quality and quantity in chronic disease. **The BMJ**, v. 361, p.2340, 2018. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/361/bmj.k2340.full>. Acesso: 25/07/2019.

MARCHINI, J. S.; MORIGUTI, J.C.; PADOVAN, G.J.; NONINO, C.B.; VIANNA, S.M.L.; OLIVEIRA, J.E.D. Métodos atuais de investigação do metabolismo protéico: aspectos básicos e estudos experimentais e clínicos. **Ribeirão Preto: Revista Medicina**, v. 31, p. 22-30. 1998. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/7315/8798>. Acesso em: 20/04/2018.

MARTÍNEZ, E.; RAGHAVAN, V.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; GÓMEZ, X. New biofuel alternatives: integrating waste management and single cell oil production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9385-9405, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms16059385>. Acesso em: 18/07/2019.

MELLO, V.D.; LAAKSONEN, D.E. Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53 n.5, p. 509-18, 2009. Disponível em: <http://souplift.com.br/site/artigos/soup-lift-batata-baroa/9.pdf>. Acesso em 05/05/2018.

MIRA, G.S.; GRAF, H.; CANDIDO, L.M.B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 11-20, Mar. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502009000100003>. Acesso em: 05/05/2018.

MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K. Definition, characteristics and potential. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. **Solid Substrate Cultivation**. London: Elsevier. 1992. Cap. 1, p. 1-16.

MOHAMMAD, N.; ALAM, M.Z.; KABASHI, A.N.; ADEBAYO, O.J. Development of compatible fungal mixed culture for composting process of oil palm industrial waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 10 n. 81, p. 18657-18665, 2011. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/98653>. Acesso em: 18/02/2019.

MOLLA, A. H.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ABD-AZIZ, S.; HANAFI, M. M.; ALAM, M. Z. *In vitro* compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 17, p. 849-856, 2001. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1013844306960>. Acesso em: 15/01/2019.

MORALES, E.M.; ZAJUL, M.; GOLDMAN, M.; ZORN, H.; ANGELIS, D.F.; Effects of Solid-State Fermentation and the Potential use of Cassava By-products as Fermented Food. **Waste Biomass Valor**, p 1–11. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0479-3>. Acesso em: 19/10/2018.

MORE, T.T.; YAN, S.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge. A review. **Bioresource Technology** 101, 7692–7700, 2010. Disponível em: [sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410008692](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410008692). Acesso em: 02/02/2019.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. **LWT – Food Science Technology**, v. 44, p.520–523. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810003026>. Acesso em: 02/02/2019.

OZSOY, H. D.; ARIKAN, E.B.; CINKIR, C.; ERYILMAZ, G.D.; KUCUK, D.; LEEUWEN, J.H.V. Fungal oil production from oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Aspergillus oryzae* cultivated on sugar beet pulp. **APJES**, v. 3, p. 735-41, 2015. Disponível em: <http://isites.info/PastConferences/ISITES2015/ISITES2015/papers/A18-ISITES2015ID114.pdf>. Acesso em: 15/06/2019.

PADILHA, M.E.S.; AUGUSTO-RUIZ, W. Obtenção de ácidos graxos por cristalização do óleo de pescado fracionado por hidrólise enzimática. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 35-41, Mar. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000100005&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 30/03/2018.

PARK, Y-K.; NICAUD, J.M.; LEDESMA-AMARO, R. The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a work house for biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 36 (3), p. 304-317, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29132754>. Acesso em: 14/06/2019.

PEÑUELA-SIERRA, L.M.; CASTAÑEDA-SERRANO, R.D.; SANMIGUEL, R.A. Ácidos graxos poliinsaturados e ácido linoléico conjugado na carne suína. Benefícios para a saúde humana: Revisão. **PUBVET**, v. 9, n. 7, p. 337-347. Maringá- PR. 2015. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/239/acidograxospoliinsaturados-e-acido-linoleico-conjugado-na-carne-suina-beneficios-para-a-saude-humana-revisao>. Acesso em: 28/03/2018.

QIAO, W.; TAO, J.; LUO, Y.; TIANHAO, T.; MIAO, J.; YANG, Q. Microbial oil production from solid-state fermentation by a newly isolated oleaginous fungus, *Mucor circinelloides* Q531 from mulberry branches. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 11, p. 180551, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsos.180551>. Acesso em: 16/07/2019.

RAHMAN, M. U.; AHMED, K.U.; ROY, T. S.; SHELLY, N.J.; RAHMAN, M.S. Effect of wheat bran supplements with rice straw on the proximate composition of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **Bangladesh Research Publications**, J., v.7 n. 4, p.306-311. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322419051_EFFECT_OF_WHEAT_BRAN_SUPPLEMENTS_WITH_RICE_STRAW_ON_THE_PROXIMATE_COMPOSITION_OF_OYSTER_MUSHROOM_PLEUROTUS_OSTREATUS. Acesso em: 05/08/2019.

RAMOS-SÁNCHEZ.;CUJILEMA-QUITIO, M.C.; JULIAN-RICARDO, M.C.; CORDOVA, J.; FICKERS,P. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. **Journal of Bioprocessing Biotechniques**, v. 5, n. 2. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000203>. Acesso em: 15/07/2019.

RIVALDI, J. D.; CARVALHO,A.K.F.; CONCEIÇÃO, L.R.V.; CASTRO, H.F. Assessing the potential of fatty acids produced by filamentous fungi as feedstock for biodiesel production. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 10, p. 970-976. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1365246>. Acesso em: 12/06/2019.

RODRIGUES-REIS, C. E.; BENTO, H. B.; CARVALHO, A. K.; RAJENDRAN, A.; HU, B.; DE CASTRO, H. F. Critical applications of *Mucor circinelloides* with in a biorefinery context. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 555-570, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1592104>. Acesso em: 15/07/2019.

ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M. Ômega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, New York, v.83, p.217-244, 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10576293>. Acesso em: 14/06/2019.

SALES-CAMPOS, C.; ARAUJO, L.M.; MINHONI, M.T.A.; ANDRADE, M.C.N. Physicochemical analysis and centesimal composition of *Pleurotus ostreatus* mushroom grown in residues from the Amazon. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 456-461, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612011000200027>. Acesso em: 16/07/2019.

SAMPAIO, C.R.P.; FERREIRA, S.M.R.; CANNIATTI-BRAZACA S.G. Caracterização Físico-Química e Composição de Barras de Cereais Fortificadas Com

Ferro. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. v. 21, n. 4, p. 607-616, out./dez. 2010. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/1115>. Acesso em: 24/05/2018.

SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1321-1337. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19956947>. Acesso em: 23/07/2019.

SANTAMAURO, F.; WHIFFIN, F.M.; SCOTT, R.J.; CHUCK, C.J. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 34, 2014. Disponível em: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-7-34>. Acesso em: 22/07/2019.

SANTOS-SILVA, J.; BESSA, R.J.B.; SANTOS-SILVA, F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. **Livestock Production Science**, v. 77, n. 2, 187 – 194, 2002. Disponível em: [https://www.livestockscience.com/article/S0301-6226\(02\)00059-3/abstract?code=livsci-site](https://www.livestockscience.com/article/S0301-6226(02)00059-3/abstract?code=livsci-site). Acesso em 27/05/2018.

SARDAR, H.; ALI, M.A.; ANJUM, M.A.; NAWAZ, F.; HUSSAIM, S.; NAZ, S.; KARIMI, S.M. Agro-industrial residues influence mineral elements accumulation and nutritional composition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). **Scientia Horticulturae**. v. 225, p.327-334. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423817304193>. Acesso em: 18/02/2019.

SCHMIELE, M.; SILVA, L.H.; COSTA, P.F.P.; RODRIGUES, R.S.; CHANG, Y.K. Influência da adição de farinha integral de aveia, flocos de aveia e isolado proteico de soja na qualidade tecnológica de bolo inglês. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 29, n. 1, p. 71-82, jan./jun. 2011. Disponível em: <http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/22751> Acesso em: 10/04/2018.

SHI, J.; SHARMA-SHIVAPPA, R.R.; CHINN, M.S. Microbial pretreatment of cotton stalks by submerged cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4388-4395. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.060>. Acesso em: 18/06/2019.

SILVA, A.C.L.; NONINO, G.C.W.; CALGARO, R.M.; BALBI, M.E. Análise química e nutricional da farinha de amaranto em muffins de banana para celíacos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.19, n.1, Jan. - Mar./2018 - ISSN 1518-8361. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/59476/35371>. Acesso em: 07/08/2019.

SKIDMORE, A. M.; DICKINSON, C. M. Colony interactions and hyphal interference between *Sepatorianodorum* and *phylloplane* fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, 66, p. 57-64, 1976. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201303024144>. Acesso em: 15/09/2018.

SMIDERLE, F.R.; OLSEN, L.M.; RUTHES, A.C.; CZELUSNIAK, P.A.; SANTANA-FILHO, A.P.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.368– 376. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711006540>. Acesso em: 18/02/2019.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOUZA-VANDENBERGHE, L. P. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation** v. 1, p 52-71, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>. Acesso em: 20/06/2019.

SOUZA, M.A.D.; DETMANN, E.; BATISTA, E.D.; FRANCO, M.D.O.; VALADARES FILHO, S.D.C.; PINA, D.S.; ROCHA, G.C. Estudo colaborativo para avaliação dos teores de matéria mineral em alimentos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. v.18 n. 1. Salvador. 2017. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/26148/artigo.pdf?sequence=1>. Acesso em: 24/07/2019.

SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER J.V. Ácidos Graxos: Estrutura, Classificação, Nutrição e Saúde. **Arquivos da Apadec**. v 2, n2. 1998. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/16516>. Acesso em: 19/06/2019

SOUZA, P. M. D.; BITTENCOURT, M. L. D. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M. D.; ALMEIDA, R. P. C. D.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246220140359>. Acesso em: 14/07/2019.

STAHL, P. D.; CHRISTENSEN, M. *In vitro* interactions among members of a soil microfungus community. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, p. 309-316, 1992. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0038071792901909>. Acesso em: 17/01/2019.

STARK, K. D.; VAN ELSWYK, M. E.; HIGGINS, M. R.; WEATHERFORD, C. A.; SALEM-JR, N. Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. **Progress in Lipid Research**. v. 63, p.132–15, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2016.05.001>. Acesso em: 14/01/2019.

STREDANSKI, M.; CONTI, E.; STREDANSKA, S.; ZANETTI, F. Gamma-linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on Apple pomace. **Bioresour Technol**, v. 73, n1. p. 41-45. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499001327>. Acesso em: 15/02/2019.

TACO. Tabela brasileira de composição de alimentos/NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. -- Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011. 161 p. Disponível em:

http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf

TANG, X.; ZAN, X.; ZHAO, L.; CHEN, H.; CHEN, Y. Q.; CHEN, W.; RATLEDGE, C. Proteomics analysis of high lipid-producing strain *Mucor circinelloides* WJ11: an explanation for the mechanism of lipid accumulation at the proteomic level. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 35, 2016. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0428-4>. Acesso em: 19/06/2019.

TANG, X.; CHEN, H.; CHEN, Y.Q.; CHEN, W.; GARRE, V.; SONG, Y.; RATLEDGE, C. Comparison of biochemical activities between high and low lipid-producing strains of *Mucor circinelloides*: an explanation for the high oleaginicinity of strain WJ11. **PLOS One**, v. 10, n. 6. 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128396>. Acesso em: 10/07/2019.

TORTORA, G. R.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 245p

TOSSAVAINEN, M.; CHOPRA, N. K.; KOSTIA, S.; VALKONEN, K.; SHARMA, A. K.; SHARMA, S.; ROMANTSCHUK, M. Conversion of biowaste leachate to valuable biomass and lipids in mixed cultures of *Euglena gracilis* and *chlorophytes*. **Algal Research**, v. 35, p.76–84. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.007>. Acesso em: 10/07/2019.

TOSUNER, Z.V; TAYLAN, G.G.; OZMIHÇI, S. Effects of rice husk particle size on biohydrogen production under solid state fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 44,n. 34, p. 18785-18791. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.230>. Acesso em: 09/07/2019.

ULBRICHT, T.L.V.; SOUTHGATE, D.A.T. Coronary heart disease: seven dietary factors. **The Lancet**, v.338, p.985-992, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014067369191846M>>. Acesso em: 27 /05/2018.

TERESHINA, V.M.; MEMORSKAYAA, S.; KOTLOVAE, R. The effect of different heat influences on composition of membrane lipids and cytosol carbohydrates in mycelial fungi, **Microbiology**, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/s002626171104019> Acesso em: 04/07/2017.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forage. **Journal of Animal Science**, v. 26, n 1, p. 119-120, 1967.

WALKER, G.M.; WHITE, N.A. Introduction to fungal physiology. **Fungi: Biology and Applications**, p. 1-35, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119374312.ch1>. Acesso em: 02/08/2019.

WARD, O. **Biología de la Fermentación**. Zaragoza: Acribia, 1991. 155 p.

WYNN, J.P.; HAMID, A.A.; YONGHUA L.; COLIN R. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. **Microbiology**, v. 147, p.2857–2864, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2857>. Acesso em: 19/01/2019.

XAFENIAS, N.; ANUNOBIS, M.S.O.; MAPELLI, V. Electrochemical startup increases 1,3-propanediol titers in mixed-culture glycerol fermentations. **Process Biochemistry**, v. 50 p. 1499–1508. 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511315300295>. Acesso em: 15/06/2019.

XIA, C.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n.15. 2011. Disponível em: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/4/1/15>. Acesso em: 15/06/2019.

XIE, S.; QIN, X.; CHENG, Y.; LASKAR, D.; QIAO, W.; SUN, S.; KAO, K. Simultaneous conversion of all cell wall components by an oleaginous fungus without chemi-physical pretreatment. **Green Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1657-1667, 2015. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/gc/c4gc01529k/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 10/07/2019.

YAZID, A.N.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. **Sustainability**, v. 9, n. 2. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su9020224>. Acesso em: 13/06/2019.

WHO. World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Report of a Joint WHO/ FAO Expert Consultation. Geneva; 2003. (WHO Technical Report Series, 916). Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO_TRS_916.pdf;jsessionid=0D2298EA485A976B9E8835B87B5D9A2F?sequence=1. Acesso em: 07/08/2019

ZHAO, L.; CÁNOVAS-MÁRQUEZ, J.T.; TANG, X.; CHEN, H.; CHEN, Y.Q.; CHEN, W.; GARRE, V.; SONG, Y.; RATLEDGE, C. Role of malate transporter in lipid accumulation of oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 100, p.1297–1305, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-7079-y>. Acesso em: 11/07/2019.

ZHENG, B. G.; TIAN, F.; ZHANG, F. T.; LI, W. Plant adaptation to frequent alterations between high and low temperatures: remodelling of membrane lipids and maintenance of unsaturation levels. **Plant Cell Environ**. 34 (2011) 1431–1442, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02341.x>. Acesso em: 15/07/2019.

ZHENG, J. S.; LIN, J. S.; DONG, H. L.; ZENG, F. F.; LI, D.; SONG, Y.; CHEN, Y. M. Association of erythrocyte n-3 polyunsaturated fatty acids with incident type 2 diabetes in a Chinese population. **Clinical Nutrition**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.09.018>. Acesso em: 19/07/2019.

ZENG, Y.; XIE, T.; LI, P.; JIAN, B.; LI, X.; XIE, Y.; ZHANG, Y. Enhanced lipid production and nutrient utilization of food waste hydrolysate by mixed culture of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and oleaginous microalgae *Chlorella vulgaris*. **Renewable Energy**, v.126, p. 915-923. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.04.020>. Acesso em: 19/07/2019.

ZHOU, R.; LIU, Z.K.; ZHANG, Y.N.; WONG, J.H.; NG, T.B.; LIU, F. Research Progress of Bioactive Proteins from the Edible and Medicinal Mushrooms. **Current Protein and Peptide Science**, v.20, p.196-219, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389203719666180613090710>. Acesso em: 12/06/2019.