



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Rafaela Bodaneze de Oliveira

**Avaliação da produção de lipídios por fungos filamentosos da família *Mortierellaceae*
isolados da Antártida**

Florianópolis
2022

Rafaela Bodaneze de Oliveira

**Avaliação da produção de lipídios por fungos filamentosos da família *Mortierellaceae*
isolados da Antártida**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jaciane Lutz Ienczak

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Robl

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira, Rafaela

Avaliação da produção de lipídios por fungos filamentosos da família Mortierellaceae isolados da Antártida / Rafaela Oliveira ; orientador, Jaciane Lutz Ienczak, coorientador, Diogo Robl, 2022.

113 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Mortierellaceae. 3. Single cell oil. 4. Ácido Linoleico. I. Lutz Ienczak, Jaciane. II. Robl, Diogo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Rafaela Bodaneze de Oliveira

**Avaliação da produção de lipídios por fungos filamentosos da família *Mortierellaceae*
isolados da Antártida**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Jaciane Lutz Ienczak, Dr.^a

UFSC

Prof. Diogo Robl, Dr.

UFSC

Prof.^a Andréia Anschau, Dr.^a

UTFPR

Prof. Marco Di Luccio, Dr.

UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestra em Engenharia de Alimentos.

Prof.(a) Sandra Regina Salvador Ferreira, Dr.(a)

Coordenador(a) do Programa

Prof.(a) Jaciane Lutz Ienczak, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2022

Este trabalho é dedicado a Jocelem, Eduarda e Lourdes; as mulheres que sempre me apoiam e incentivam.

AGRADECIMENTOS

A elaboração desta dissertação envolveu muito trabalho, dedicação, horas de laboratório e muitas outras horas de leitura e escrita. Mas, principalmente, envolveu ótimos momentos e conexões; e a certeza de que tenho uma rede de apoio incrível, com pessoas maravilhosas que me incentivaram e apoiaram quando precisei. Sem elas, este trabalho seria muito mais difícil – para não dizer impossível.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores, prof^a Dr^a Jaciane Ienczak e prof. Dr^a Diogo Robl, que sempre me orientaram de forma presente, atenciosa e empática. Sou muito grata por ter como orientadores pessoas que me inspiram tanto, pessoal e profissionalmente, com as quais aprendi muito nestes anos de pesquisa. Também agradeço à banca, por aceitarem o convite de avaliar este trabalho. Em especial, ao Prof. Dr. Marco Di Luccio, que me orientou na iniciação científica no início da graduação e me guiou nos primeiros passos de pesquisa. À prof^a Dr^a Andréia Anschau, que tive o prazer de utilizar como referência em meu texto, por aceitar avaliar este trabalho. E à prof^a Dr^a Patrícia Poletto, com quem aprendi muito durante a graduação e por quem tenho enorme admiração.

À UFSC e a todos os professores do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos (EQA) e do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL). Tenho imenso orgulho de ter minha formação acadêmica em uma universidade pública, cujo programa de pós-graduação recebeu nota máxima pela CAPES na avaliação de 2017-2020. Apesar dos cortes de verbas e dos tempos nebulosos de descrença à ciência, são profissionais como os professores do EQA e PPGEAL que sustentam o desenvolvimento da pesquisa no país, com seriedade e competência.

Ao Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LAMB/P/UFSC) e ao prof. Dr. Rubens Duarte, pela disponibilização da coleção de fungos. À doutoranda Aline Cristofolini, pela ajuda na etapa de identificação das linhagens. À Biorigin por ceder amostras de extrato de levedura para os cultivos. Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC) pelos equipamentos e à técnica Eliane pelas análises de Confocal, sempre com muita paciência e disponibilidade.

À Central de Análises do EQA, especialmente ao técnico Leandro, pelo auxílio nas análises de cromatografia gasosa e pela paciência em responder todas as minhas dúvidas sobre a técnica. Ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental (e-biotech) e a doutoranda Rayane, pelo auxílio nas análises de Nitrato.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras (LBMBL) e ao doutorando Eduardo, pelo auxílio nas análises de HPLC. Ao prof. Dr. Glauber Wagner e seu aluno Vilmar Filho, pelo auxílio nas análises de bioinformática. À doutoranda Natalia Coutouné, pelos ensinamentos em bioinformática, sempre com muita paciência e ótimas trocas.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa Scinfer, em especial Isabela, Ana Clara, Lauren, Marcel, Liana e Juliane. Aos colegas de laboratório, Karina, Thalles, Taís, Renato, Yago, Mônica e Jaízia. A todos vocês, sou muito grata às trocas, discussões filosóficas, companhia nas noites de laboratório e apoio mútuo durante a pesquisa.

Aos meus amigos Samanta, Vinícius, Laura Ribeiro, Laura Lunardi, Geovana, Eduardo, Nicolas, Kathleen, Giordana, Marcos, Marcelo, Bruno, Valéria, Camila, Rafael e à minha companheira Ana. Vocês foram minha rede de apoio e sempre estiveram ao meu lado quando precisei. Amo vocês. À Mutama, que sempre foi meu refúgio, onde me sinto acolhida e pertencente.

À GreyLogix por acreditar no meu trabalho e me dar a oportunidade de iniciar no mercado como Engenheira de Processos. Ao meu coordenador José Octávio, pelas trocas acadêmicas, que me incentivaram muito na etapa final desta dissertação.

Finalmente, gostaria de agradecer aos meus pais, Jocem e Lenuir, pelo suporte durante toda esta jornada. Se entrego hoje esta dissertação com orgulho, é devido ao incentivo aos estudos que recebi desde muito nova. Este mestrado surgiu em um período difícil da minha vida, mas ver o orgulho nos olhos do meu pai enquanto contava à enfermeira, em meio a minha sessão de quimioterapia, que eu havia sido aprovada para o mestrado, fez-me ter certeza de que este era o caminho a seguir. Também à minha irmã Eduarda, por ter estado sempre presente, sendo uma grande referência para mim. Aos meus avós, Lourdes e Valdir, que mesmo de longe, sempre me apoiaram.

O trabalho apresentado nesta dissertação só foi possível devido ao apoio financeiro dado pela FAPESC.

“É preciso não ter cabimento para crescer.”

Arnaldo Antunes

RESUMO

Frente às fontes convencionais de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs), animais e vegetais, e seus impactos ambientais como exploração animal, poluição da água, desmatamento e interferência na cadeia trófica, fontes microbianas têm se apresentado como alternativa viável. Os microrganismos que produzem lipídios microbianos, ou *single cell oils*, são capazes de acumular mais de 20 % de sua massa celular como lipídios. Dos ácidos graxos encontrados nestes microrganismos, destacam-se os poli-insaturados, das famílias ômega 3 e 6, como ácido linoleico, linolênico e araquidônico. A família *Mortierellaceae* é conhecida por seu potencial de acúmulo lipídico, particularmente a espécie *Mortierella alpina*, utilizada industrialmente para a produção de ácido araquidônico. Todavia, diversas outras espécies são estudadas para a produção deste e outros AGPIs. Neste contexto, este estudo buscou investigar linhagens isoladas da Antártida, potencialmente pertencentes à família *Mortierellaceae*, quanto ao seu potencial de produção de lipídios. As linhagens foram identificadas quanto ao gênero, através do sequenciamento da região ITS, sendo uma *Mortierella* sp. duas *Linnemannia* spp. e uma *Entomortierella* sp.. Parâmetros de processo foram investigados para *Linnemannia* sp. ACF038 e os parâmetros ótimos de cultivo foram definidos em pH 5,5, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e temperatura de 25 °C. Com estes parâmetros, realizou-se o escalonamento e melhoramento das condições para um cultivo submerso. Para escalonamento, um dos fatores mais importantes ao controle do cultivo é a concentração de oxigênio dissolvido, mensurável de forma eficiente através do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}). A disponibilidade de oxigênio está diretamente relacionada à biossíntese de lipídios, a qual depende da disponibilidade de NADH. Para a melhor condição de cultivo, a variável k_{LA} foi observada em 28,9 h⁻¹. A adição do nitrato de sódio e o aumento da concentração inicial de glicose levaram a um aumento de 46 % na biomassa e 77 % na produção de lipídios, produzindo 5,2 g/L de lipídios. Deste teor lipídico, identificou-se 42 % como ácido linoleico (LA), considerado essencial a humanos, que necessitam ingeri-lo através da dieta. Este teor de LA coloca esta linhagem à frente de grande parte dos microrganismos oleaginosos para a produção de ácido linoleico em larga escala.

Palavras-chave: *Mortierellaceae*. *Single cell oil*. Ácido linoleico.

ABSTRACT

Sourcing polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from animals and plants has environmental impacts such as animal exploitation, water pollution, deforestation, and interference in the trophic chain; however, a viable alternative has been found in microbial sources. Microorganisms that produce microbial lipids, or single cell oils, can accumulate more than 20% of their cell mass as lipids. Of the fatty acids found in these microorganisms, the polyunsaturated ones, from the omega 3 and 6 families, such as linoleic, linolenic, and arachidonic acid, stand out. The *Mortierellaceae* family is known for its lipid accumulation potential, particularly the species *Mortierella alpina*, used industrially to produce arachidonic acid. However, several other species are studied to produce this and other PUFAs. In this context, this study aims to investigate strains isolated from Antarctica, potentially belonging to the *Mortierellaceae* family, regarding their potential for lipid production. The strains were identified as to the genus, through the sequencing of ITS region, being a *Mortierella* sp., two *Linnemannia* spp., and a *Entomortierella* sp.. Process parameters were investigated for *Linnemannia* sp. ACF038 and the optimal cultivation parameters were defined at pH 5.5, yeast extract as nitrogen source and temperature of 25 °C. With these parameters, the scaling and improvement of the conditions for a submerged cultivation was carried out. For scaling, one of the most important factors for crop control is the concentration of dissolved oxygen, efficiently measurable through the volumetric oxygen transfer coefficient (k_{LA}). Oxygen availability is directly related to lipid biosynthesis, which depends on NADH availability. For the best cultivation condition found, the variable k_{LA} was observed at 28.9 h⁻¹. The addition of sodium nitrate and the increase in the initial glucose concentration led to a 46 % increase in biomass and a 77 % increase in lipid production, producing 5.2 g/L of lipids. Of this lipid content, 42 % was identified as linoleic acid (LA), considered essential for humans, who need to ingest it through the diet. This LA content place this strain ahead of most oleaginous microorganisms to produce linoleic acid on a large scale.

Keywords: *Mortierellaceae*. Single cell oil. Linoleic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas de ácidos graxos de 18 a 22 carbonos, com diferentes níveis de insaturação.	25
Figura 2: Análise bibliométrica de publicações com busca título-resumo-palavras chave contendo as palavras "Mortierell*" and ("microbial lipid*" or "Single cell oil" or "SCO" or "polyunsaturated fatty acids" or "arachidonic acid")) utilizando a base de dados SCOPUS entre 1987 e 2022, classificados por ano (a) e por país (b).	28
Figura 3: Perfil lipídico de diferentes fontes de AGPIs.	29
Figura 4: Taxonomia simplificada da família <i>Mortierellaceae</i>	33
Figura 5: Diversidade macromorfológica da família <i>Mortierellaceae</i>	34
Figura 6: Estrutura morfológica típica de diferentes isolados de <i>Mortierellaceae</i>	35
Figura 7: Hifas de <i>L. hyalina</i> por (A) contraste de interferência e (B) microscopia de fluorescência.	36
Figura 8: Principais enzimas e processos bioquímicos relacionados à geração e metabolismo de lipídios em fungos oleaginosos.	37
Figura 9: Simplificação da síntese de AGPIs em <i>Mortierellaceae</i>	38
Figura 10: Metodologia de extração de DNA, amplificação de material genético, sequenciamento e alinhamento das linhagens.	48
Figura 11: Esquema da metodologia utilizada na caracterização fenotípica de cultivo estático.	52
Figura 12: Esquema ilustrativo dos cultivos de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038, nos meios A e B.	54
Figura 13: Perfil da concentração de oxigênio durante a aplicação do método dinâmico.	58
Figura 14: Microscopia optica (400X) da linhagem ACF038, mostrando o esporângio característico da família <i>Mortierellaceae</i> , corada com lactofenol e azul de algodão.	66
Figura 15: Arvore filogenética dos isolados utilizados nesse trabalho e de membros da família <i>Mortierellaceae</i> para a região ITS, contruída pelo método de máxima verossimilhança e modelo TPM3+F+G4, na ferramenta IQ-Tree. As cores alternadas indicam o agrupamento dos clados monofiléticos e as abreviaturas em círculos indicam os principais ácidos graxos produzidos por cada clado.	68
Figura 16: Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados ($p = 0,05$) de pH e concentração de glicose no cultivo de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038	71

Figura 17: Superfície de resposta para os efeitos de pH e concentração de glicose no cultivo de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038.....	72
Figura 18: Morfologia das culturas de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038 após 7 dias de cultivo a 25°C em diferentes pHs e concentrações de glicose.....	74
Figura 19: Resposta do crescimento radial, em relação ao ensaio controle, no cultivo de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038 a 25°C, pH 5,5, 35 g/L de glicose e diferentes fontes e concentrações de nitrogênio.....	76
Figura 20: Morfologia das culturas de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038 após 7 dias de cultivo a 25 °C e pH 5,5, para diferentes fontes de nitrogênio.....	77
Figura 21: Cinética de crescimento radial, em mm de halo, para diferentes temperaturas (condições: YE 1 g N/L; pH 5,5; 35 g/L de glicose).....	78
Figura 22: Morfologia das culturas de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038 após 7 dias de cultivo com pH 5,5 e YE como fonte de nitrogênio, para diferentes temperaturas (20, 25 e 37 °C).....	79
Figura 23: Perfil de consumo de glicose para (a) o cultivo A (b) o cultivo B.....	82
Figura 24: Perfil da velocidade de consumo de oxigênio e Perfil do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) para o cultivo A (a) e para o cultivo B (b).	85
Figura 25: Microscopia de fluorescência com coloração de Vermelho de Nilo para a detecção de gotículas de lipídios em <i>Linnemannia</i> sp. ACF038. Em vermelho, observam-se as gotículas de lipídios no interior das hifas. Estas, apresentam cerca de 3,75 μ m de diâmetro.	88
Figura 26: Perfil lipídico de fontes microbianas (fungos filamentosos, leveduras e microalgas) de AGPIs.	90
Figura 27: Cromatograma do perfil lipídico produzido no Cultivo B de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: AGPI utilizados em fórmulas dietéticas e suas principais fontes para produção comercial.	27
Tabela 2: Linhagens de <i>M. alpina</i> projetadas com genes expressos de forma homóloga ou heteróloga.	41
Tabela 3: Ensaio para avaliação dos fatores pH e Concentração de Glicose.....	50
Tabela 4: Composição do meio para os ensaios de Triagem de Parâmetros.....	51
Tabela 5: Ensaio para avaliação dos fatores Fonte e Concentração de Nitrogênio	51
Tabela 6: Composição dos meios de propagação e cultivo submerso em biorreator.	53
Tabela 7: Parâmetros do processo utilizados no cultivo submerso em biorreator.....	55
Tabela 8: Parâmetros cinéticos de cultivo, utilizados na análise dos cultivos submersos A e B.	64
Tabela 9: Identificação de linhagens de <i>Mortierellaceae</i> por sequenciamento da região ITS.	67
Tabela 10: Crescimento radial de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038 em experimentos de planejamento composto central (NaNO ₃ 1 g N/L, 25 °C).....	70
Tabela 11: ANOVA para os fatores pH e concentração de glicose no cultivo de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038, utilizando MS residual.	71
Tabela 12: Relação dos pHs utilizados para o cultivo de <i>M. alpina</i> e a produção de lipídios, conforme a literatura.....	73
Tabela 13: Crescimento radial de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038 em experimentos de fatorial completo para diferentes fontes e concentrações de nitrogênio (Glicose 35 g/L, pH 5,5, 25 °C). Controle: BDA.....	75
Tabela 14: Crescimento radial de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038 em diferentes temperaturas (YE 1 g N/L, pH 5,5, 35 g/L de glicose).....	78
Tabela 15: Relação entre diferentes temperaturas e a produção de ácido araquidônico por <i>M. alpina</i> encontrados na literatura.	80
Tabela 16: Parâmetros de processo para os cultivos A e B de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038.....	81
Tabela 17: Índices de retenção do perfil lipídico obtido a partir do Cultivo B de <i>Linnemannia</i> sp. ACF038.....	89
Tabela 18: Linhagens utilizadas para construção da árvore filogenética da família <i>Mortierellaceae</i> com base na região ITS.	110
Tabela 19: Perfil lipídico de microrganismos oleaginosos.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACL	ATP-citrato liase
ACS	Acetil-CoA sintase
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
ALA	Ácido α -linolênico
AMP	Adenosina monofosfato
ARA	Ácido araquidônico
BDA	Batata Dextrose Ágar
BHI	Caldo infusão de cérebro e coração
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Precisão
CS	Citrato sintase
CT	Transportador de citrato
DAP	Diamônio fosfato
DHA	Ácido docosaenoico
DHGLA	Ácido dihomo- γ -linolênico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAS	Ácido graxo sintase
G3PD	Glicerol-3-fosfato desidrogenase
G6PD	Glicose-6-fosfato-1-desidrogenase
GK	Glicerol quinase
GLA	Ácido γ -linolênico
IDH	Isocitrato desidrogenase
ITS	Região do espaçador interno
LA	Ácido linoleico
LSU	Subunidade Maior
ME	Enzima málica
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica

OA	Ácido oleico
OD	Oxigênio dissolvido
PBS	Tampão fosfato-salino
PDH	Piruvato desidrogenase
PGD	6-fosfogluconato desidrogenase
PPP	Pentose fosfato
ROS	Radicais de Oxigênio
SCO	<i>Single cell oils</i>
TAG	Triacilglicerol
TCA	Ácido tricarboxílico
YE	Extrato de levedura
YHM	Transportador de citrato-oxoglutarato mitocondrial

LISTA DE SÍMBOLOS

P	Concentração de produto [g/L]
C	Concentração de oxigênio [mg/L]
C ₀	Concentração de O ₂ antes da interrupção da aeração [mg/L]
C ₀₁	Concentração de O ₂ no momento da retomada da aeração [mg/L]
C _{EXP}	Concentração de O ₂ obtida experimentalmente [mg/L]
C _{MOD}	Concentração de O ₂ calculada pelo modelo matemático [mg/L]
C _N	Concentração de Nitrogênio [g/L]
C _{NO3}	Concentração de Nitrato [g/L]
C _S	Concentração de saturação de oxigênio [mg/L]
k _{LA}	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio [h ⁻¹]
n	Número de átomos de carbono do padrão que elui antes de x
R _%	Porcentagem de crescimento [%]
S	Concentração de substrato [g/L]
S _i	Concentração inicial de substrato [g/L]
S _f	Concentração final de substrato [g/L]
t _{RX}	Tempo de retenção dos componentes analisados (x)
t _{RC_n}	Tempo de retenção do padrão que elui antes de x
t _{RC_{n+1}}	Tempo de retenção do padrão que elui após x
X	Concentração de célula em base seca [g/L]
X _i	Concentração inicial de célula em base seca [g/L]
X _f	Concentração final de célula em base seca [g/L]
Y _{P/S}	Fator de conversão de substrato em produto [g/g]
Y _{P/X}	Fator de conversão de biomassa em produto [g/g]
Y _{X/S}	Fator de conversão de substrato em biomassa [g/g]
Y _{X/N}	Fator de conversão de nitrogênio em biomassa [g/g]
μ _{máx}	Velocidade específica máxima de crescimento [h ⁻¹]
μ _S	Velocidade específica de consumo de substrato [g/g.h]
μ _P	Velocidade específica de formação de produto [g/g.h]
μ _X	Velocidade específica de crescimento [h ⁻¹]

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	<i>OBJETIVOS</i>	24
1.1.1	Objetivo Geral	24
1.1.2	Objetivos Específicos	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1	<i>ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS</i>	25
2.2	<i>FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS</i>	26
2.2.1	Microrganismos extremófilos.....	31
2.3	<i>CARACTERÍSTICAS E TAXONOMIA DA FAMÍLIA Mortierellaceae</i>	32
2.3.1	Biossíntese de lipídios em <i>Mortierellaceae</i>	36
2.4	<i>PROSPECÇÃO DE LIPÍDIOS POR Mortierellaceae</i>	39
2.4.1	Engenharia metabólica em <i>Mortierellaceae</i>	40
2.4.2	Parâmetros fisiológicos de processo.....	42
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1	<i>MICRORGANISMOS</i>	47
3.2	<i>CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DOS MICRORGANISMOS</i>	47
3.2.1	Extração e sequenciamento da região ITS.....	47
3.2.2	Avaliação de características fisiológicas: crescimento em meio BDA e meio sintético ..	49
3.3	<i>CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE CULTIVO: TEMPERATURA, pH, FONTE E CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE</i>	50
3.4	<i>ESCALONAMENTO E MELHORAMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE SCO</i>	53
3.5	<i>MÉTODOS ANALÍTICOS</i>	55
3.5.1	Determinação da biomassa inicial e final	55
3.5.2	Determinação da concentração de açúcares redutores residuais	56
3.5.3	Determinação da concentração de nitrogênio residual	56
3.5.4	Determinação da velocidade de respiração (Q_{O_2X}) e do coeficiente volumétrico de transferência oxigênio (k_{La}).....	57

3.5.5	Análise qualitativa da produção de lipídios por microscopia de fluorescência.....	60
3.5.6	Extração de lipídios	62
3.5.7	Caracterização do perfil lipídico.....	63
3.6	<i>ANÁLISE DE DADOS</i>	64
3.6.1	Parâmetros cinéticos de cultivo	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	<i>Identificação molecular DOS MICRORGANISMOS</i>	66
4.1.1	Identificação pelo sequenciamento da região do ITS	66
4.2	<i>ANÁLISE FISIOLÓGICA DE CULTIVO</i>	69
4.2.1	pH e concentração de glicose	69
4.2.2	Concentração e fonte de nitrogênio	74
4.2.3	Temperatura.....	77
4.3	<i>CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR</i>	80
4.3.1	Parâmetros de processo	80
4.3.2	Perfil de velocidade de consumo de oxigênio e do coeficiente de transferência de oxigênio.....	84
4.3.3	Análise qualitativa da produção de lipídios.....	87
4.3.4	Extração e caracterização do perfil lipídico	88
5	CONCLUSÕES	92
5.1	<i>Sugestões para trabalhos futuros</i>	93

1 INTRODUÇÃO

As classes mais importantes de lipídios utilizados para suplementação alimentar são os ácidos graxos poli-insaturados, ou AGPIs (CHRISTOPHE; FONTANILLE; LARROCHE, 2019). Nesta classe de lipídios, os ômega-6 e ômega-3 são importantes para a saúde humana, e alguns necessitam ser adquiridos por meio da dieta, pois o metabolismo humano não possui as enzimas necessárias para sintetizá-los. A exemplo, estão o ácido linoleico (LA, 18:2 n6) e o ácido α -linolênico (ALA, 18:3, n3), que, após ingestão, atuam como precursores de outros ácidos graxos importantes à saúde humana, como o ácido araquidônico (ARA, 20:4 n6), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n3) e ácido docosaexaenoico (DHA, 22:6 n3) (STREEKSTRA, 2010).

A demanda por estes AGPIs vem crescendo anualmente, não apenas pelo crescimento populacional, mas também pelo número de aplicações para estes óleos, como aditivos alimentares, biocombustíveis, biopolímeros e nas indústrias farmacêutica e cosmética, que vêm em uma crescente busca por alternativas ambientalmente mais amigáveis aos produtos petroquímicos (VASCONCELOS et al., 2019).

Para obtenção de AGPIs, especialmente ômega-3, são usualmente utilizados óleos de peixes de águas profundas, gemas de ovos e tecidos animais. Contudo, baixos teores de produção, restrições locais e características indesejáveis como mau cheiro e sabor desagradável, têm limitado a melhoria de qualidade e produção em larga escala a partir dessas matérias-primas (DEDYUKHINA et al., 2014; VADIVELAN; VENKATESWARAN, 2014a). Para ômega-6, fontes vegetais são comumente utilizadas, como os óleos obtidos de sementes oleaginosas. Entretanto, essa procura gera pressão para expansão das lavouras, ocasionando maior desmatamento e consumo de água (VASCONCELOS et al., 2019). Dessa forma, óleos de origem microbiana têm sido estudados, devido ao seu potencial como fontes sustentáveis à produção de AGPIs.

De acordo com as Nações Unidas, a população mundial deverá chegar a 8,6 bilhões em 2030 e 9,8 bilhões em 2050 (UNITED NATIONS, 2015), o que gera grandes preocupações com os recursos alimentares e hídricos. Buscando uma geração de lipídios que necessite de menor quantidade de terra e água para sua produção, em comparação às fontes vegetais, e apresente maior rendimento, comparado às fontes animais, os microrganismos oleaginosos têm se apresentado como uma solução. Lipídios de origem microbiana apresentam características como alta velocidade de crescimento, alto teor de lipídeos, e baixo consumo de terra, além de composição em ácidos graxos de alto valor nutricional (LIANG; JIANG, 2013).

Muitos estudos têm sido realizados com microalgas, leveduras, bolores e bactérias para avaliar seu potencial na produção de lipídios. Busca-se, também, microrganismos de origem extremófila, a exemplo de ambientes de extremo frio, nos quais pode haver acúmulo lipídico intracelular como estratégia de sobrevivência, preservando a integridade da membrana celular. Nesse contexto, fungos filamentosos da família *Mortierellaceae* surgem como opção para produção de lipídeos microbianos, pois permitem a produção em condições controladas de processo e contornam os problemas relatados nas produções de origem animal e vegetal (GOYZUETA-MAMANI et al., 2020).

Dentre os ácidos graxos produzidos pelos fungos da família *Mortierellaceae* estão o ácido linoleico, ácido γ -linolênico (GLA, C18:3, n6), ácido dihomo- γ -linolênico (DHGLA, C20:3, n6), ácido araquidônico e ácido eicosapentaenoico. Esses compostos estão envolvidos na indução da resistência a fitopatógenos em plantas de interesse agrícola (ZŁOTEK; WÓJCIK, 2014), e são comumente utilizados em suplementos alimentares e drogas para melhorar a resposta imunológica em seres humanos (DEDYUKHINA et al., 2014).

Todavia, o perfil lipídico pode variar consideravelmente entre os gêneros e espécies. Linhagens de *Mortierella alpina* são industrialmente utilizadas para produção de ARA desde 2001, tendo a primeira patente registrada pela *Lion Corporation*, empresa japonesa, em 1986 (TOTANI; SOMEYA; OBA, 1992). Enquanto *Linnemannia elongata* e *Linnemannia hyalina* apresentam altos níveis de ácido oleico (OA, 18:1 n9), com aproximadamente 45 mg/g de células (DYAL; NARINE, 2005) e *Linnemannia hygrophila* produz EPA a concentrações de 41 mg/g de células (RADHAKRISHNAN, 2014).

Além de diferentes AGPIs produzidos, esta família de fungos saprófitos apresenta potencial de utilização de substratos de baixo custo, como mostra o estudo de Hashem e colaboradores, no qual obteve-se 1,6 g/L de lipídios através do cultivo de *Actinomortierella wolfii* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato (HASHEM et al., 2021). Todavia, a procura por linhagens produtoras de AGPIs a partir de substratos sustentáveis e de baixo custo é necessária, pois ainda são escassos estes resultados na literatura.

Ademais, para uma mesma espécie e linhagem, a composição do perfil lipídico é influenciada por fatores críticos de processo, como pH, temperatura, composição do meio e aeração. Dessa forma, é possível modular o perfil lipídico produzido, visando um ácido graxo específico. A exemplo, o estudo de Li e colaboradores, que aumentou a produção de ARA por *M. alpina* através de um cultivo com dois estágios de pH (LI et al., 2015).

Uma alternativa para modular o perfil lipídico é a produção de mutantes de uma espécie. A biossíntese de lipídios em microrganismos oleaginosos inicia-se a partir de uma cadeia

principal de carbono (C16), produzida por sintases de ácido graxo (*fatty acid synthetase* - FAS). A cadeia principal passa então por uma sequência de alongamentos e insaturações, através da ação de enzimas, como as dessaturase $\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 6$ e $\Delta 5$ e a elongase EL1 (CERTIK; SHIMIZU, 2000; RATLEDGE, 2004). Assim, diversos mutantes têm sido desenvolvidos, com atividade aumentada ou inibição destas enzimas (GOYZUETA-MAMANI et al., 2020; SAKURADANI; KOBAYASHI; SHIMIZU, 1999; SAKURADANI; SHIMIZU, 2003).

Para isso, o estudo genômico e a inferência filogenética de novas espécies da família são imprescindíveis para a prospecção de novos genes e potenciais bioprodutos. Desde o século XX, as espécies da família têm sido classificadas e revisadas com o avanço das técnicas genômicas para inferência filogenética. Recentemente, Vandepol e colaboradores (2020) dividiu a família em quatorze gêneros, utilizando a combinação de dados de baixa cobertura e sequências multigênicas de alta cobertura (VANDEPOL et al., 2020).

Desta forma, o presente trabalho investigou a produção de ácidos graxos a partir de linhagens de *Mortierellaceae* isoladas da Antártida, através da caracterização genômica para a inferência filogenética e da análise fisiológica para escalonamento e melhoramento das condições de cultivo. Como base, utilizou-se autores de referência como Vandepol e colaboradores, (2020), Wagner e colaboradores, (2013), Sakuradani e colaboradores, (1999; 2003; 2005; 2009) e Huang e colaboradores, (2007; 2008; 2010; 2011; 2013; 2015; 2016; 2017; 2018).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho visou triar linhagens de *Mortirellaceae* isoladas da Antártida e capazes de produzir ácidos graxos poli-insaturados, inovando na construção de uma cadeia de suprimentos robusta e escalonável para a produção de lipídeos microbianos.

1.1.2 Objetivos Específicos

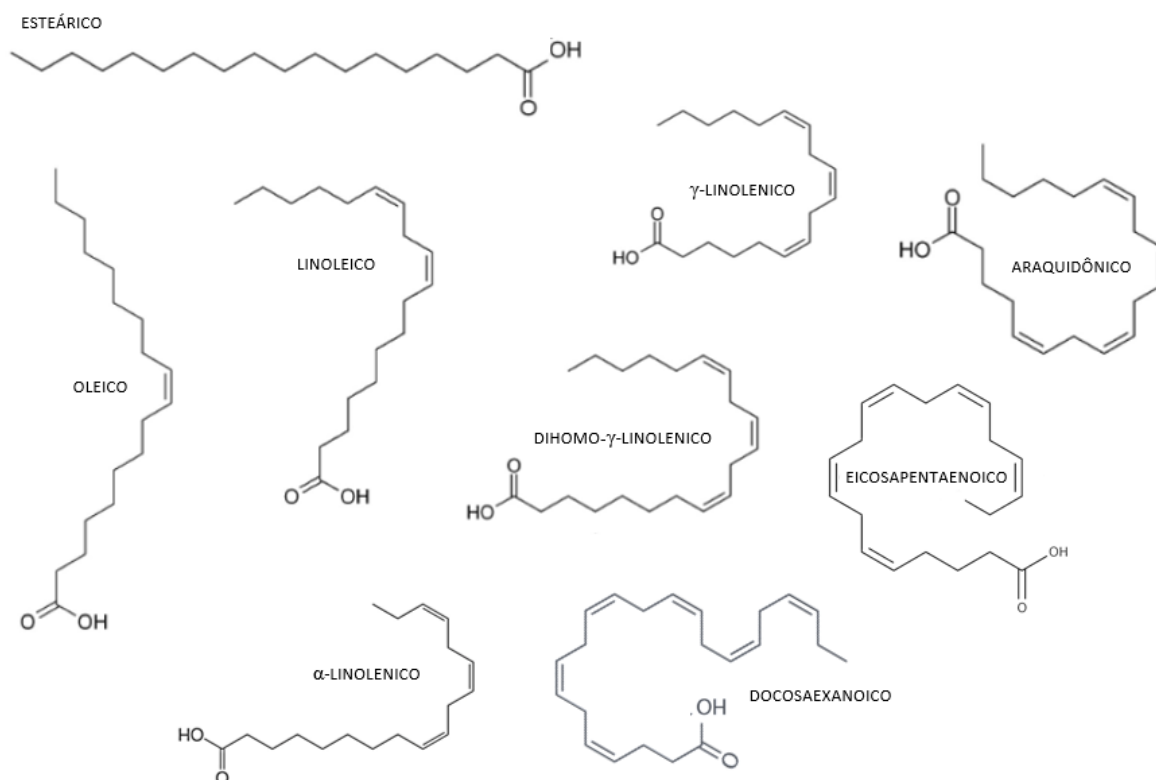
- Triagem de linhagens de fungos filamentosos isoladas da Antártida para o desenvolvimento do processo;
- Investigação de parâmetros de processo para o microrganismo selecionado na etapa anterior;
- Escalonamento e caracterização de cultivo em escala de bancada para o microrganismo selecionado;
- Caracterização do perfil lipídico produzido pelo fungo selecionado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

Os ácidos graxos são moléculas químicas compostas por uma cadeia de hidrocarboneto carregada de um ácido carboxílico terminal (-COOH). Estas moléculas diferenciam-se pelo comprimento da cadeia alifática, pelo grau de insaturação, pela localização e conformação (cis ou trans) das duplas ligações, bem como pela presença e posição das modificações. (CHRISTOPHE; FONTANILLE; LARROCHE, 2019).

Figura 1: Estruturas químicas de ácidos graxos de 18 a 22 carbonos, com diferentes níveis de insaturação.



Fonte: Autora (2022), adaptado de Streekstra (2010).

Os ácidos graxos insaturados podem ter uma única ligação dupla (monoinsaturados) ou várias ligações duplas (poli-insaturados). Até 30 carbonos podem ser encontrados em uma cadeia na natureza, mas a maioria dos ácidos graxos consiste em 16 a 22 carbonos. Em geral, a primeira ligação dupla é inserida entre os carbonos C9 e C10 ($\Delta 9$). Quando ocorrem duas ou mais ligações duplas, estas geralmente não são conjugadas e possuem conformação cis. Em

particular, destacam-se duas classes de AGPIs, os ácidos graxos n-3 (ou ω -3) e n-6 (ou ω -6) (DAMODARAM; PARKIN, 2019).

Os AGPIs têm ganhado popularidade e espaço no mercado internacional devido aos seus benefícios à saúde humana (CALDER et al., 2019; KAWASHIMA, 2019). Essas moléculas são indispensáveis à manutenção da integridade e fluidez celular. A ingestão de AGPIs é um indicador importante de qualidade de uma dieta, devido ao seu papel na saúde humana. Para humanos, o ácido linoleico (18:2 n6, LA) e o ácido α -linolênico (18:3 n3, ALA) são considerados essenciais, ou seja, devem estar presentes na dieta alimentar, devido à ausência das dessaturases Δ 12 e Δ 15 no metabolismo humano (DAS, 2006).

Para humanos, LA é o precursor da família ômega-6, sendo metabolizado por sucessivas dessaturações e alongamentos para ácido γ -linolênico (18:3 n6, GLA) e ácido araquidônico (20:4 n6, ARA). Da mesma forma, o ALA é o precursor da família ômega-3 e, após consumido, a molécula leva à síntese de ácido eicosapentaenoico (20:5 n3, EPA) e ácido docosaenoico (22:6 n3, DHA). Todavia, mesmo podendo ser sintetizados pelo corpo humano, a ingestão direta desses AGPIs não-essenciais pode ser benéfica à saúde (CHANG et al., 2022).

Entre os benefícios da ingestão de AGPIs é possível citar estudos, como o de Maragoni e colaboradores (2020), que sugerem a correlação entre a ingestão de ALA e a redução do risco de doença cardiovascular, principalmente devido ao efeito de redução do colesterol e no metabolismo da glicose, ajudando a controlar a glicemia a longo prazo (MARANGONI et al., 2020).

Outro exemplo é o ARA, precursor de eicosanoides e importante componente estrutural no sistema nervoso central (STREEKSTRA, 2010). O ARA é frequentemente utilizado em fórmulas infantis, a fim de equiparar-se nutricionalmente ao leite materno, naturalmente rico neste ácido graxo (SALEM; VAN DAEL, 2020). Dentre os AGPI citados, os ω -6 LA e ARA, ω -3 ALA e DHA são frequentemente utilizados na suplementação de fórmulas infantis e dietéticas (MAMANI et al., 2019).

2.2 FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

As fontes convencionais de AGPIs são sementes de plantas, peixes marinhos e microrganismos, como mostra a Tabela 1. Contudo, o alto custo, a escassez e a agressão ao meio ambiente que a exploração animal gera, limitam as fontes animais, como o uso de peixes de águas profundas para a obtenção de AGPIs da família ω -3 (OLIVER et al., 2020). Os impactos ambientais também ocorrem na produção vegetal, a partir de grandes monoculturas

como a da soja e do milho (ALTIERI, 2009), que contribuem para a erosão e empobrecimento do solo (PICCINETTI et al., 2021) e podem afetar outras atividades produtivas, como a apicultura (DE GROOT et al., 2021), que dependem de recursos florais e do manejo responsável dos agroquímicos.

Tabela 1: AGPI utilizados em fórmulas dietéticas e suas principais fontes para produção comercial.

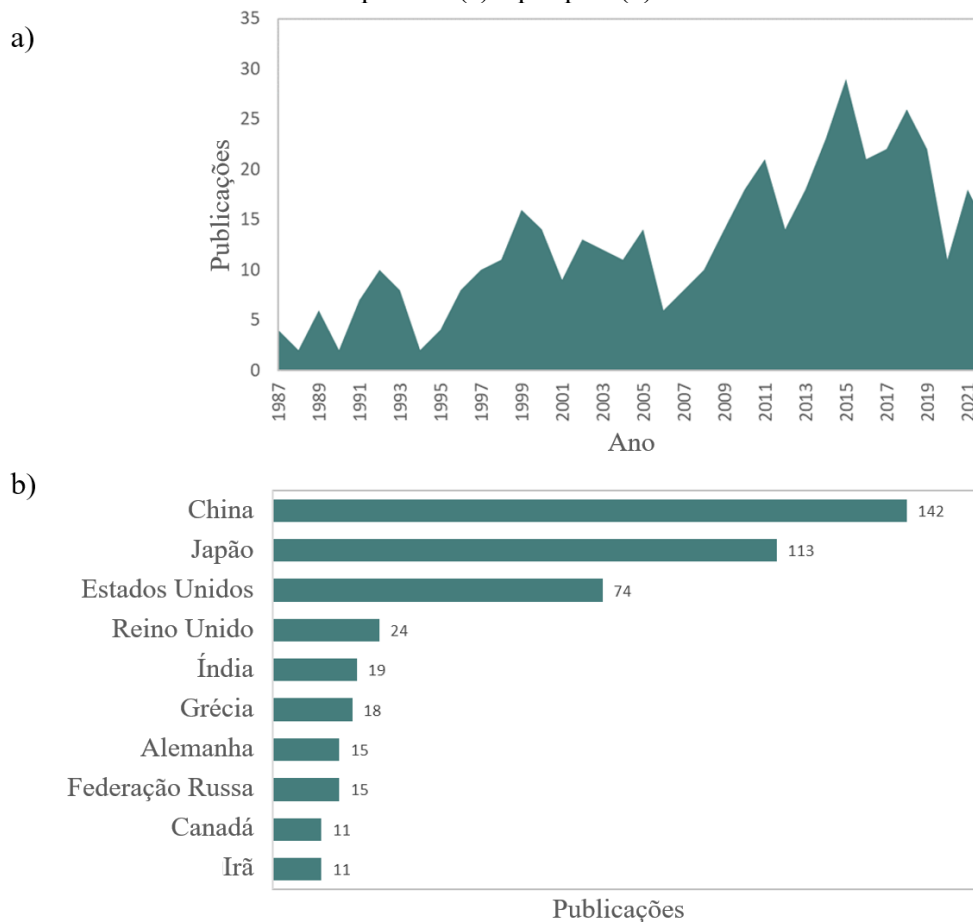
AGPI	Classificação	Principal fonte de produção comercial
Ácido linoleico (LA)	C18:2 n6	Óleo de girassol, óleo de linhaça, óleo de algodão
Ácido α -linolênico (ALA)	C18:3 n3	Óleo de linhaça
Ácido γ -linolênico (GLA)	C18:3 n6	<i>Mucor circinelloides</i> , óleo de cártamo
Ácido araquidônico (ARA)	C20:4 n6	<i>Mortierella alpina</i>
Ácido eicosapentanoico (EPA)	C20:5 n3	Óleo de peixe marinho, <i>Yarrowia lipolytica</i>
Ácido Docosahexanoico (DHA)	C22:6 n3	Óleo de atum, <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Ulkenia</i> sp.

Fonte: Adaptado de CHANG et al., 2022.

Nesse contexto, a pesquisa por fontes alternativas de AGPIs se intensificou nas últimas décadas. Os óleos de origem microbiana, também conhecidos como *single cell oils* (SCO), se mostraram como alternativa viável devido à alta produtividade e baixa demanda de extensão territorial (FANG; ZHAO; CHEN, 2016). Os chamados microrganismos oleaginosos acumulam lipídios em teores acima 20 % de seu peso celular seco e, tendo em vista a tendência de um mercado mais sustentável, a pesquisa nesta área intensificou-se nas últimas duas décadas (DIAO et al., 2020; MAMANI et al., 2019).

O aumento das buscas por óleos de origem microbiana é apontado na Figura 2, que mostra a análise bibliométrica por ano (a) e por país (b) na área da SCO. A literatura encontrada foi selecionada usando os termos ("Mortierell*" AND ("microbial lipid*" OR "Single cell oil" OR "SCO" OR "polyunsaturated fatty acids" OR "arachidonic acid")) por meio de busca no banco de dados Scopus (<https://www.scopus.com>). Os primeiros artigos surgiram no final dos anos 80 e começaram a crescer significativamente, chegando a 29 documentos publicados em 2015. Esses indicadores revelam a forte tendência de busca por fontes lipídicas microbianas. Entre as origens dos estudos publicados, destacam-se os China, Estados Unidos e Japão, que dominam as publicações nessa área, conforme apresentado na Figura 2(b), o que indica um mercado em potencial, com interesse e investimento das principais potências atuais.

Figura 2: Análise bibliométrica de publicações com busca título-resumo-palavras chave contendo as palavras "Mortierell*" and ("microbial lipid*" or "Single cell oil" or "SCO" or "polyunsaturated fatty acids" or "arachidonic acid") utilizando a base de dados SCOPUS entre 1987 e 2022, classificados por ano (a) e por país (b).

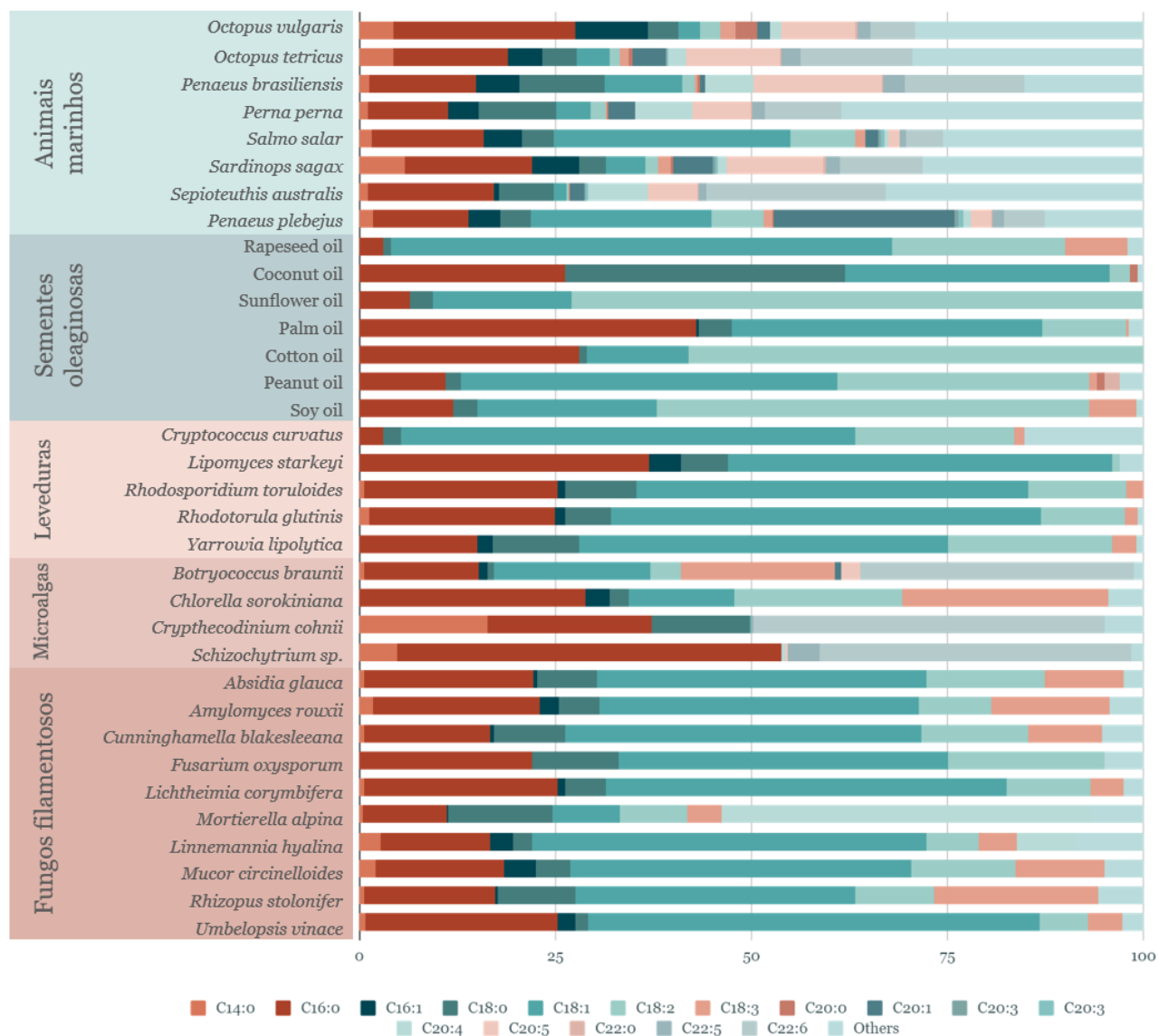


Fonte: Autora (2022).

O mercado de proteínas alternativas à base de plantas também tem impulsionado a procura por SCO. Junto às proteínas e polissacarídeos, os lipídios são um dos ingredientes principais para produtos do tipo *meat analogues* (BOUKID, 2020). Os chamados *meat analogues* são produtos à base de proteínas vegetais, como leguminosas, glúten de trigo e proteína de soja, que buscam assemelhar-se à carne em qualidade estética e nutricional, como de textura, cor, sabor e composição de nutrientes (KYRIAKOPOULOU; DEKKERS; VAN DER GOOT, 2019). A fonte e a composição de ácidos graxos são de extrema importância para a mimetização do sabor e textura da carne nesses produtos, principalmente quanto à oxidação lipídica e geração de voláteis pela reação de Maillard durante o processamento térmico (DIEZ-SIMON; MUMM; HALL, 2019; ZAMORA; HIDALGO, 2011). Além dos óleos vegetais, os lipídios de origem microbiana têm sido estudados para sua aplicação em produtos *meat*

analogues, a fim de intensificar o sabor e melhorar textura dos produtos (BOHRER, 2019; LIN; HUFF; HSIEH, 2000).

Figura 3: Perfil lipídico de diferentes fontes de AGPIs.



Fonte: Autora (2022), baseado em AHMAD et al., 2019; CHAUDHURI et al., 1998; DZURENDOVA et al., 2020; EROSHIN et al., 1996; GUALDA et al., 2018; HOU, 2008; JACOBS; BOTHA; VAN ZYL, 2009; LIPP et al., 2001; VADIVELAN; VENKATESWARAN, 2014b; VASCONCELOS et al., 2019.

As fontes animais, principalmente peixes de águas profundas e crustáceos, apresentam em seu perfil lipídico porcentagens significantes (até 30 %) de ácidos graxos saturados, como ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0). Contudo, a presença de AGPIs como EPA (20:5 n3) e DHA (22:6 n3) faz com que essas fontes ainda sejam bastante utilizadas (AHMAD et al., 2019). O perfil lipídico de algumas dessas fontes é apresentado na Figura 3. Todavia, é

importante destacar que os óleos obtidos de peixes marinhos apresentam características sensoriais indesejáveis, como sabor e aroma característico, além do risco de presença de metais pesados e dioxinas (VADIVELAN; VENKATESWARAN, 2014a).

Como alternativa aos óleos de peixes, DHA e EPA podem ser obtidos de SCO como a microalga *Schizochytrium limacinum* (WANG et al., 2019) e a levedura *Yarrowia lipolytica* geneticamente modificada (XUE et al., 2013). Outras microalgas apresentam concentrações significativas de DHA em seu perfil lipídico, como é apresentado na Figura 3, e têm sido estudadas como fontes alternativas deste AGPI (FERREIRA et al., 2019; JIANG; CHEN, 2000). LA e ALA são tradicionalmente obtidos a partir de óleos vegetais e, como mostra a Tabela 1, o LA é o AGPI majoritário nessas fontes. As fontes vegetais também são ricas em ácido palmítico (saturado) e ácido oleico (monoinsaturado). Entre as fontes animais, o OA pode ser encontrado em maiores concentrações (> 25 %) em alguns peixes, como no *Salmo solar*, uma espécie de salmão (AHMAD et al., 2019) e é comum em diversos fungos filamentosos e leveduras, como mostra a Figura 3.

A família *Mortierellaceae*, que compreende fungos saprófitos, destaca-se na produção de lipídios. A produção de ARA, pela espécie *M. alpina*, teve a primeira patente registrada em 1986, pela *Lion Corporation* (TOTANI; SOMEYA; OBA, 1992). Outras espécies da família apresentam potencial não apenas para a produção de ARA, mas também para a produção de outros lipídios, como a produção de EPA por *L. hygrophila* (RADHAKRISHNAN, 2014), LA e OA por *L. elongata* e *L. hyalina* (DYAL; NARINE, 2005) e OA por *A. wolfii* (HASHEM et al., 2021).

Para a identificação e triagem de microrganismos oleaginosos, é comum utilizar corantes lipossolúveis, que aderem às gotículas de lipídios armazenadas no corpo celular (CHANG et al., 2022). Os mais comuns são vermelho O, vermelho de Nilo e corantes de Sudão (I, III, IV e black) (YAO et al., 2019). A coloração é um método eficiente e rápido para visualização do conteúdo lipídico, e o grau de coloração e o tamanho das gotículas de lipídios são frequentemente diretamente proporcionais à produtividade lipídica dentro de um determinado intervalo (QU; REN; HUANG, 2013).

Os corantes do Sudão e a coloração com fluorocromo vermelho do Nilo são comumente utilizados como um método rápido para rastrear qualitativamente possíveis microrganismos oleaginosos, incluindo microalgas e fungos filamentosos (KOSA et al., 2018). Mas, em alguns casos, as paredes celulares espessas e rígidas em alguns organismos podem impedir a penetração do corante fluorescente na célula e limitar sua aplicação (QU; REN; HUANG, 2013).

2.2.1 Microrganismos extremófilos

A Antártida é um continente remoto e inóspito, sendo o mais seco e frio da Terra. A disponibilidade de água é baixa, com baixa precipitação anual e alta taxa de sublimação e evaporação, ventos fortes, alta incidência de radiação solar e frequentes ciclos de gelo-degelo, intensificados pelo aquecimento global (ONOFRI et al., 2007). Tais condições restringem significativamente a vida na região, resultando em um continente dominado por microrganismos capazes de resistir às condições extremas (RUISI et al., 2007).

Como exemplifica Onofri, (2007), a microflora Antártida é majoritariamente constituída por mesófilos, na forma de propágulos viáveis, mas impossibilitados de se reproduzir. Todavia, espécies capazes de crescer ativamente, nas condições de verão da Antártida, compreendem ecótipos particulares de espécies cosmopolitas, com comportamento mesófilo psicrotolerante (ONOFRI et al., 2007).

As temperaturas extremamente baixas restringem a atividade enzimática microbiana e a integridade da membrana celular (RUSSELL, 1990). Além disso, a água líquida para processos bioquímicos e hidratação das biomoléculas é reduzida (WYNN-WILLIAMS; EDWARDS, 2000). Para sobreviver a essas condições, os microrganismos apresentam mecanismos fisiológicos como capacidade de desidratação, produção de anticongelantes, alta tolerância ao frio e ao congelamento, seleção de micro e nano habitats e tolerância à cobertura por neve ou gelo (anoxia) (ROBINSON, 2001).

Outra estratégia de tolerância às baixas temperaturas, usada por estes microrganismos de regiões frias, é a alteração da composição lipídica da membrana (RUSSELL, 1990). O dano às células causado pelo congelamento normalmente se dá quando os lipídeos da membrana são deslocados do líquido cristalino para a fase gel à baixa temperatura. Aumentando as insaturações dos ácidos graxos da membrana, a temperatura na qual essa transição ocorre é reduzida, permitindo a manutenção das funções celulares (RUISI et al., 2007). Essa estratégia é utilizada por linhagens de *Mortierellaceae*, que aumentam sua produção de AGPIs, quando cultivadas a baixas temperaturas.

Outros produtos oriundos de microrganismos isolados de ambientes extremos, como glicoproteínas anticogelantes, enzimas tolerantes ao frio, novos antibióticos, antitumorais e agentes antioxidantes (DUARTE et al., 2018), são muito importantes para o desenvolvimento biotecnológico e bioeconômico de diversos setores. Com as alterações climáticas das últimas décadas, a Antártida tem sofrido intensificação dos ciclos de degelo, expondo regiões que permaneceram por muito tempo intactas (WOO et al., 2019). Uma oportunidade tecnológica,

em meio a este desastre ambiental gerado pela ação humana, é o estudo de microrganismos ainda desconhecidos, com enorme potencial biotecnológico, que podem ser isolados a partir de solos e ambientes expostos após o degelo.

2.3 CARACTERÍSTICAS E TAXONOMIA DA FAMÍLIA *Mortierellaceae*

Os fungos pertencentes à família *Mortierellaceae* são diversos e compreendem uma rica quantidade de espécies, estando entre os fungos mais comuns do solo (DE HOOG et al. 2009). São pertencentes à ordem *Mortierellales*, a única do subfilo *Mortierellomycotina*. Filogeneticamente, este subfilo relaciona-se intimamente aos subfilos *Glomeromycotina*, que compreende fungos micorrízicos arbusculares, e *Mucoromycotina* (VANDEPOL et al., 2020). Uma simplificação da taxonomia da família é apresentada na Figura 4.

Diversas espécies de *Mortierellaceae* são produtoras de AGPIs e têm relevância às indústrias alimentícia e farmacêutica, além de pesquisas na geração de bioenergia (GOYZUETA-MAMANI et al., 2020). Os exemplares desta família são comumente isolados de amostras de solo, plantas, musgos e tratos digestivos de insetos (GAMS, 1977; WAGNER et al., 2013). Todavia, apesar de presentes em diversos biomas, há apenas uma espécie descrita como causadora de infecções fúngicas em animais, a espécie *A. wolfii* (DE HOOG et al. 2009).

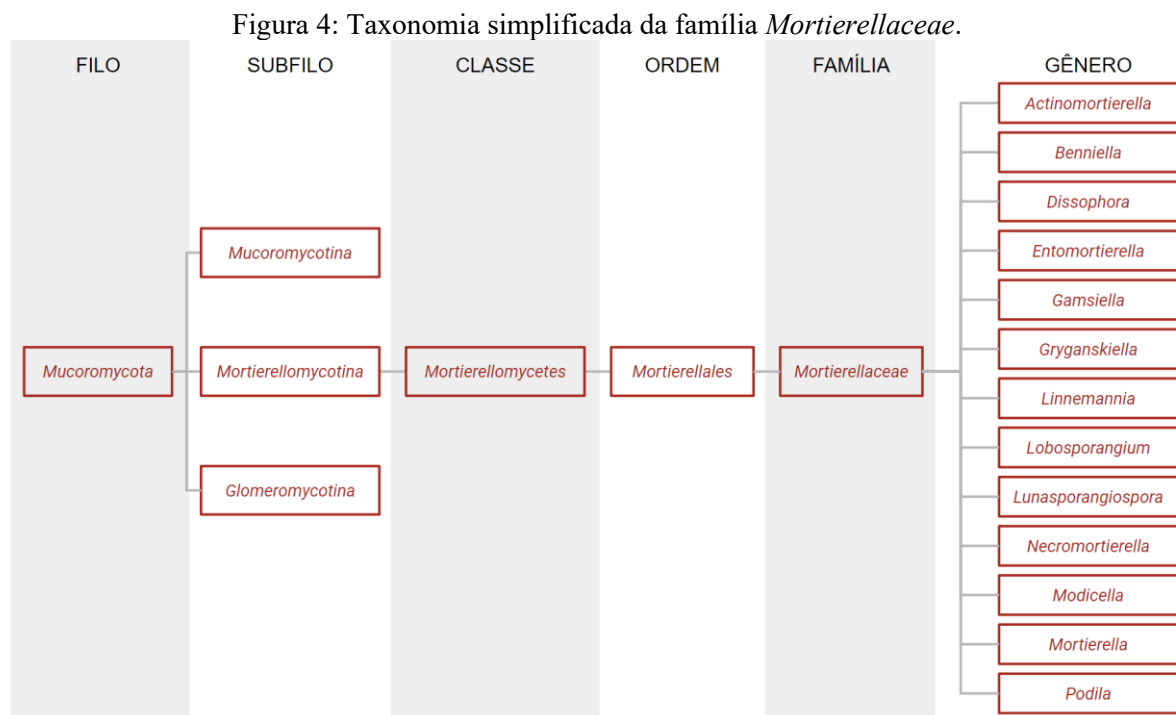
Desde o início do século XX, as espécies de *Mortierellomycotina* e suas classificações são frequentemente redefinidas e revisadas. Em 1977, Gams dividiu o gênero *Mortierella* em dois subgêneros, *Mortierella* e *Micromucor*. Dentro do subgênero *Mortierella*, Gams classificou nove seções: *Simplex*, *Alpina*, *Schmuckeri*, *Mortierella*, *Actinomortierella*, *Hygrophila*, *Stylospora*, *Spinosa* e *Haplosporangium* (GAMS, 1977).

Posteriormente, os gêneros *Gamsiella* (BENJAMIN, 1978), *Modicella* (SMITH et al., 2013a), *Dissophora* e *Lobosporangium* (BENNY; BLACKWELL, 2017) foram descritos e aceitos à família *Mortierellaceae*. E com base nas sequências da região do espaçador interno transcrito (ITS) e dos dados de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), Meyer e Gams reclassificaram o subgênero *Micromucor* ao subfilo *Mucoromycota* e gênero *Umbelopsis* (MEYER; GAMS, 2003).

Em 2011, Petkovits e colaboradores realizaram uma revisão da ordem *Mortierellales* com base em sequenciamentos da região ITS, e dos genes LSU (subunidade maior) e SSU (subunidade menor). Neste trabalho, concluiu-se que o gênero *Mortierella* é parafilético em relação aos gêneros *Dissophora*, *Gamsiella* e *Lobosporangium* e que a filogenia resultante contradizia a classificação seccional anterior, baseada na morfologia. Assim, foram propostos

12 clados principais para a família *Mortierellaceae* (PETKOVITS et al., 2011). Em 2013, o mesmo grupo de pesquisadores expandiu a diversidade das espécies sequenciadas e reorganizou os clados propostos anteriormente em sete: alpina, capitata, dissophora, gamsii, lignicola, selenospora e verticillata-humilis (WAGNER et al., 2013).

Wagner e colaboradores concluíram que não é possível resolver as relações filogenéticas dentro da família *Mortierellaceae* apenas com dados ribossomais. Isso ocorre, pois, o rDNA da região ITS é muito divergente para que seja alinhado em toda a família. Em contrapartida, as regiões de rDNA das subunidades LSU e SSU são bastante conservadas, sendo insuficientes para resolver as relações filogenéticas superiores (VANDEPOL et al., 2020; WAGNER et al., 2013).



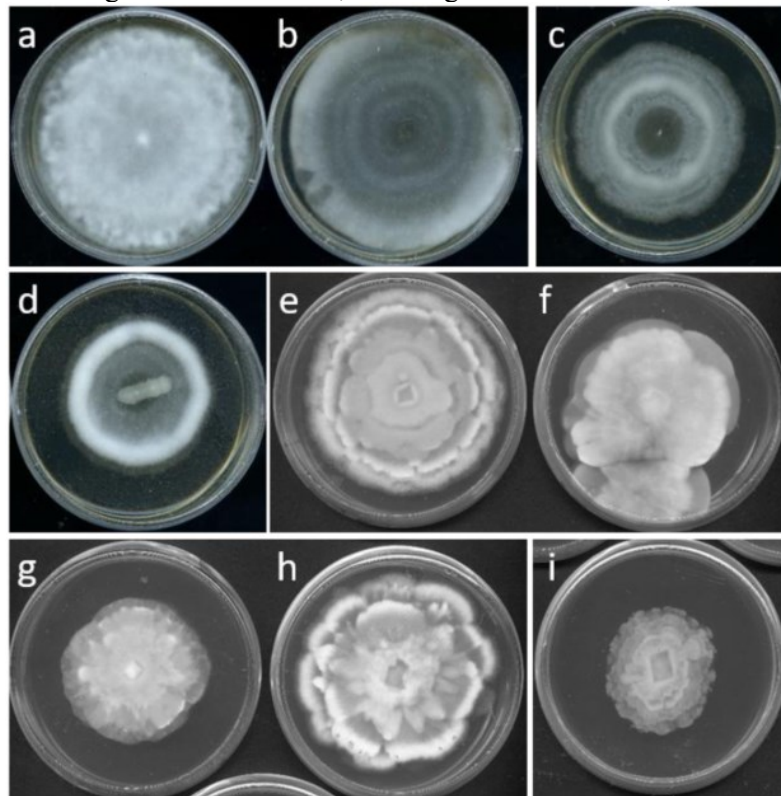
Fonte: Autora (2022).

Como alternativa, Vandepol e colaboradores utilizaram duas abordagens paralelas para resolução da filogenia de *Mortierellaceae*. Foram gerados genomas de baixa cobertura e dados de sequências multigênicas que, combinados, foram capazes de propor uma resolução taxonômica e filogenética para a família *Mortierellaceae* (VANDEPOL et al., 2020). A partir deste trabalho foi então obtida a classificação atual, na qual as linhagens monofiléticas de *Mortierellaceae* foram divididas em 14 clados e sete novos gêneros foram propostos: *Benniella*, *Entomortierella*, *Gryganskiella*, *Linnemannia*, *Lunasporangiospora*, *Necromortierella* e

Podila, além dos gêneros já aceitos. Uma simplificação desta taxonomia é apresentada na Figura 4. Destaca-se aqui o gênero *Linnemannia*, utilizado neste trabalho, que contém espécies como *L. elongata*, *L. gamsii* e *L. hyalina*.

Como características macro e micromorfológicas, que eram inicialmente utilizadas para classificar as espécies pertencentes à família *Mortierellaceae* (GAMS, 1977), destacam-se os padrões de crescimento das colônias. Comumente, as culturas apresentam coloração branca a acinzentadas e são compostas por zonas, formando “pétalas” de rosa arredondadas ou pontiagudas, ou ainda formando anéis, como mostra a Figura 5. Contudo, há espécies que não apresentam esta característica ou que apenas a manifestam em determinados meios de cultura (WAGNER et al., 2013).

Figura 5: Diversidade macromorfológica da família *Mortierellaceae*. a-d) *Mortierella* sp. JL58, JL29, AP5 e JL1 em MEA+YE, 11 dias; e) *L. elongata* NVP64 em BDA+YE, 6 dias; f-h) *M. alpina* NVP153, JL109 e KOD1002 em BDA+YE, 6 dias; i) *Podila humilis* PMI1414 em BDA+YE, 6 dias. MEA: ágar extrato de malte; BDA: ágar batata dextrose; YE: extrato de levedura.

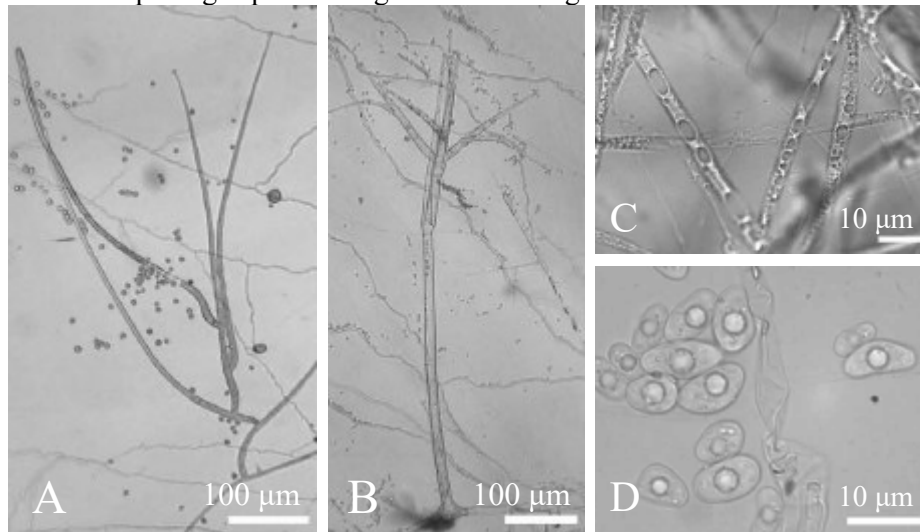


Fonte: VANDEPOL et al., 2020.

Há três tipos de esporos que podem ser produzidos pelas espécies da família. São eles os esporangiósporos – assexuados com origem nos esporângios (Figura 6-D), os clamidósporos – assexuados que podem ser terminais ou intercalares e os zigósporos, que são os esporos

sexuais. Todavia, a produção dos três tipos de esporos pode variar entre as espécies, como *Entomortierella chlamydospora*, que não apresenta a formação de esporangiósporos e *Entomortierella parvispora*, que não gera clamidósporos (GAMS, 1977) e com o meio de cultura e condições de cultivo, o que dificulta a identificação morfológica das espécies (VANDEPOL et al., 2020).

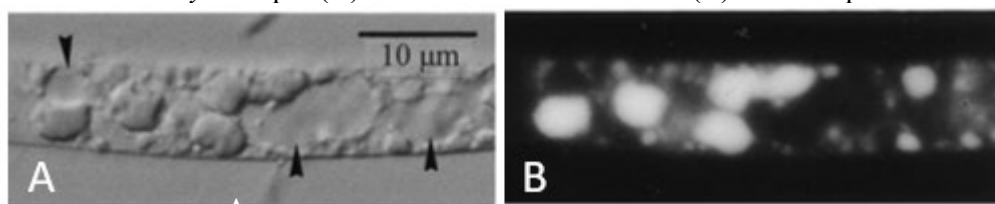
Figura 6: Estrutura morfológica típica de diferentes isolados de *Mortierellaceae*. A) *L. elongata* FSU 9721, com esporangióforo ramificado. B) *E. parvispora* FSU 10759, esporangióforos. C) *M. alpina* FSU 2698, com gotículas de óleo nas hifas; D) *L. elongata* FSU 9721, com esporangiósporos alongados contendo gotículas de óleo no centro.



Fonte: WAGNER et al., 2013.

De forma geral, o micélio é constituído por seções cheias de citoplasma e seções vazias. O citoplasma abriga múltiplos núcleos, mesmo em esporos vegetativos e não há estágio uninucleado no ciclo de vida. Isso significa que uma única célula representa uma população, não um indivíduo, o que dificulta a seleção e manutenção das linhagens (ZHU et al., 2004). O aspecto grosseiro do citoplasma se deve, principalmente, à abundância de grandes gotas de lipídeos de armazenamento. A Figura 7 mostra a coloração de gotículas lipídicas com Vermelho do Nilo, um corante fluorescente lipofílico, utilizado para triagem de microrganismos oleaginosos (Item 2.2). A mesma hifa é vista por contraste de interferência na Figura 7(A) e por microscopia de fluorescência na Figura 7(B). Os vacúolos estão sinalizados pelas setas (WEBER; TRIBE, 2003).

Figura 7: Hifas de *L. hyalina* por (A) contraste de interferência e (B) microscopia de fluorescência.



Fonte: WEBER; TRIBE, 2003.

2.3.1 Biossíntese de lipídios em *Mortierellaceae*

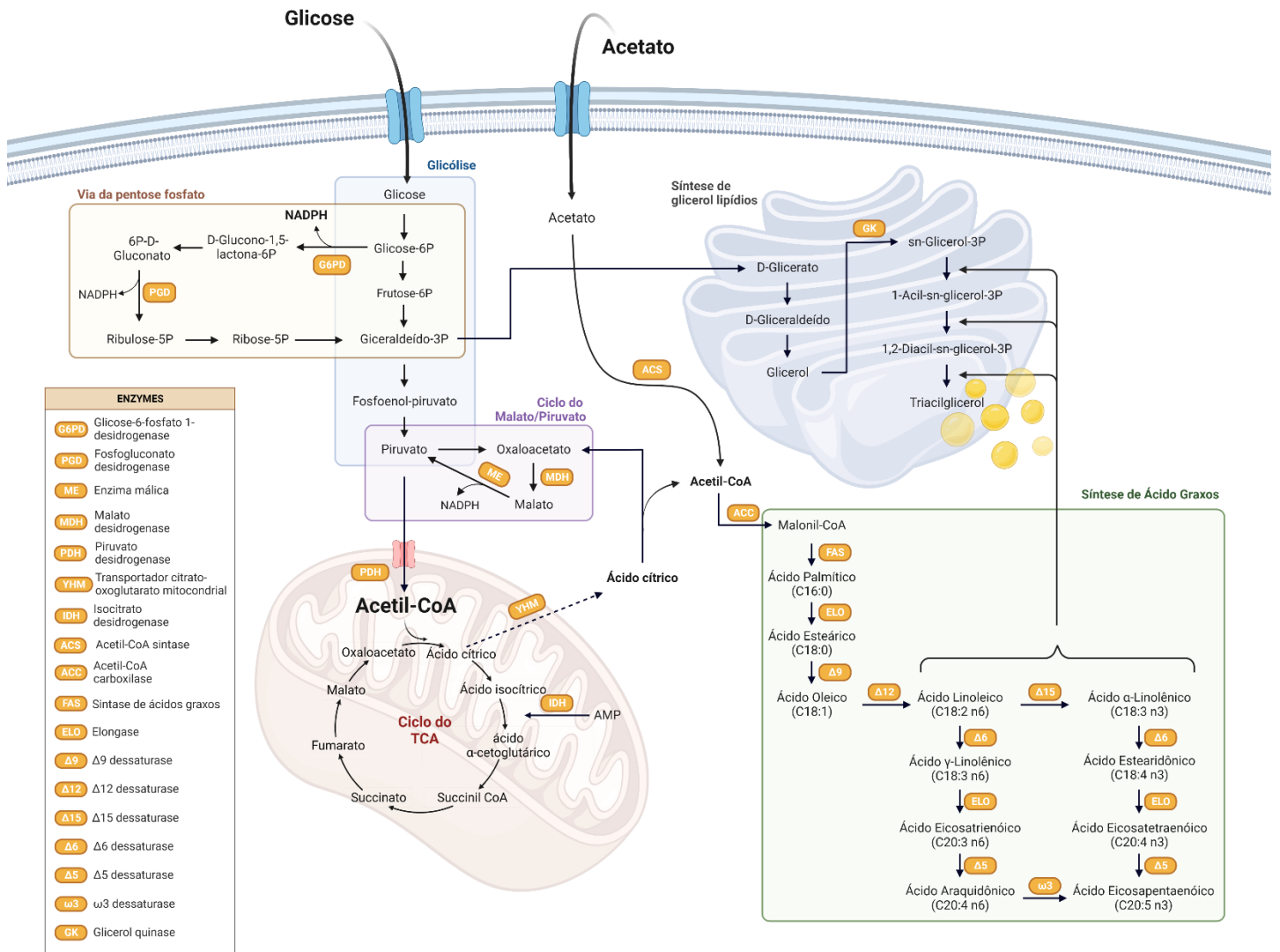
De acordo com as informações genômicas de *M. alpina* ATCC 32222, sua via de síntese de ácidos graxos ocorre de forma semelhante a muitos fungos oleaginosos, como *Rhodospodium toruloides* e *Mucor circinelloides*, e pode ser tomada como referência para as demais espécies da família (VONGSANGNAK et al., 2013; WANG et al., 2011). Um dos destaques é que *M. alpina* possui uma rica variedade de dessaturases de ácidos graxos e muitas dessas enzimas possuem isoenzimas, possibilitando a produção de diversos AGPIs.

O primeiro passo da lipogênese é a conversão de substratos em acetil-CoA. Para fungos e leveduras, esta primeira parte envolve a glicólise no citoplasma. O piruvato é transportado para a mitocôndria via prótons ligados e é convertido em acetil-CoA por uma piruvato descarboxilase. Em seguida, no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), o acetil-CoA é convertido em citrato (CHRISTOPHE; FONTANILLE; LARROCHE, 2019).

Em eucariotos, o complexo de piruvato desidrogenase mitocondrial (PDH) e citrato sintase (CS) são responsáveis pela catálise consecutiva para gerar citrato a partir do piruvato, via acetil-CoA. O citrato é então transportado para o citosol onde é clivado pelo ATP e gera acetil-CoA. Acetil-CoA também pode ser gerada pela acetil-CoA sintase (ACS) no citosol, ou liberado na oxidação de ácidos graxos e aminoácidos na mitocôndria (YAO et al., 2017). Tal mecanismo está representado na Figura 8.

O complexo PDH é uma enzima chave que combina a glicólise com o ciclo do TCA e é a enzima limitante da velocidade nesta reação, na qual o complexo PDH catalisa a descarboxilação oxidativa irreversível do piruvato mitocondrial em acetil-CoA. No citoplasma, o citrato é clivado em acetil-CoA e oxaloacetato pela ATP citratoliase (ACL), e o acetil-CoA pode então ser usado para anabolismo, como síntese de ácidos graxos e aminoácidos (LING et al., 2021).

Figura 8: Principais enzimas e processos bioquímicos relacionados à geração e metabolismo de lipídios em fungos oleaginosos.



Fonte: Autora (2022), adaptado de CHANG et al., 2022 (Ilustração criada na plataforma BioRender, <https://biorender.com/>).

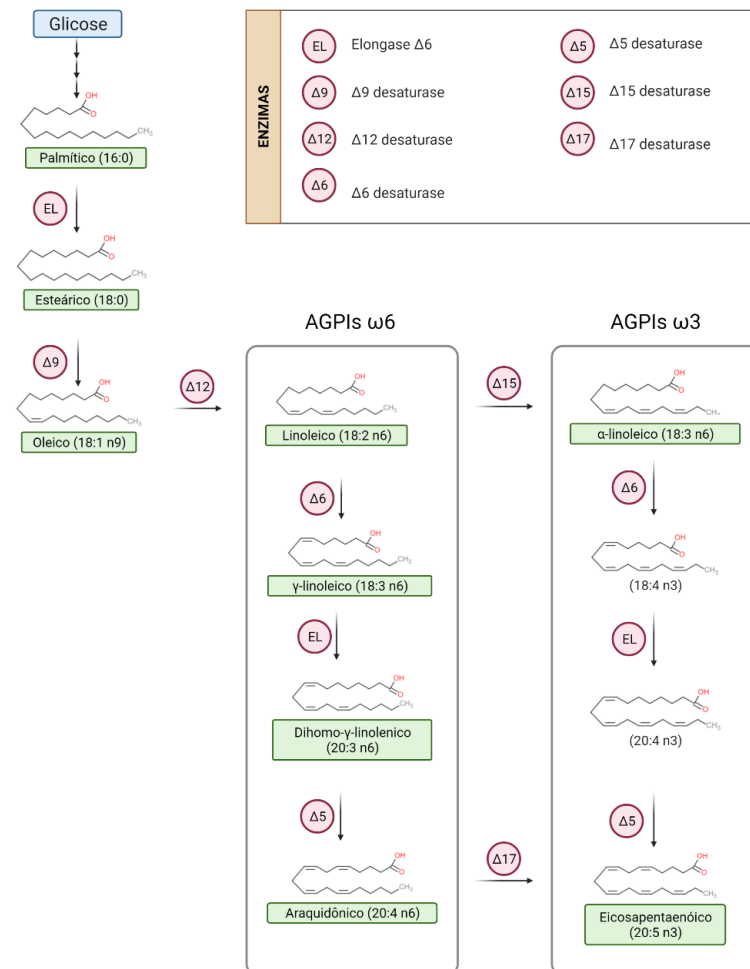
Melhorar o suprimento de citrato citoplasmático é um método eficiente para melhorar a produtividade de ácidos graxos, como por meio da inibição do ciclo TCA, promovendo o transporte de citrato para o citoplasma e aumentando a atividade da ACL. O gene que codifica o transportador de citrato-oxoglutarato mitocondrial (YHM) foi superexpresso em *M. alpina* e levou a um aumento de 20 % no teor de ácidos graxos totais em comparação à cepa base (LING et al., 2021).

Além de acetil-CoA, o NADPH, o principal agente redutor, é conhecido por ser um cofator chave necessário para a síntese e dessaturação de ácidos graxos. Em microrganismos, o NADPH pode ser gerado a partir de múltiplas vias, como a via da pentose fosfato (PPP), ciclo

malato/piruvato, ciclo TCA e metabolismo de aminoácidos (KOH et al., 2004). A enzima málica dependente de NADP⁺ catalisa a descarboxilação de malato a piruvato, juntamente com a geração de CO₂ e NADPH (CHANG et al., 2022). A incorporação de cada acetil-CoA requer 2 NADPH e, portanto, implica um suprimento de NADPH. Se não estiver presente, o fluxo de carbono da glicose para os lipídios diminui e apenas os lipídios essenciais são produzidos usando outra fonte de NADPH (CHRISTOPHE; FONTANILLE; LARROCHE, 2019).

Para a conversão de acetil-CoA em ácido palmítico (16:0), que é o precursor de ácidos graxos mais longos e insaturados, o acetil-CoA é carboxilado em malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase (ACC). O complexo enzimático de sintases de ácidos graxos (FAS) realiza reações enzimáticas necessárias para a síntese de ácidos graxos saturados, tipicamente ácido palmítico, gerado a partir de acetil-CoA e malonil-CoA, ligados por uma proteína transportadora de acil (ACP). O alongamento da cadeia de ácido graxo continuará por adição cíclica à cadeia acil de uma unidade C2 de malonil-ACP (CHANG et al., 2022).

Figura 9: Simplificação da síntese de AGPIs em *Mortierellaceae*.



Fonte: Autora (2022). (Ilustração criada na plataforma BioRender, <https://biorender.com/>).

Na maioria das células eucarióticas e procarióticas, a última etapa da síntese de AGPIs é converter as moléculas de ácido palmítico em AGPIs insaturados ou em cadeias de ácidos graxos mais longas por enzimas específicas: dessaturase e/ou elongase. A dessaturase catalisa a introdução de ligações duplas na cadeia do ácido graxo e a elongase adiciona a unidade C2 à molécula. Em microrganismos oleaginosos, como as espécies de *Mortierellaceae*, o ácido esteárico é dessaturado pela $\Delta 9$ dessaturase para produzir ácido oleico, que é dessaturado pela $\Delta 12$ dessaturase para produzir LA (CERTIK; SHIMIZU, 2000).

LA é o primeiro AGPI da série $\omega 6$. O LA pode ser dessaturado pela $\Delta 6$ dessaturase para produzir o ácido γ -linoleico ou pela $\Delta 15$ dessaturase para produzir o ácido α -linoleico. ALA é o primeiro AGPI da série $\omega 3$. Então, uma série de reações de dessaturação e alongamento descritas na Figura 9: Simplificação da síntese de AGPIs em *Mortierellaceae*. Figura 9 levam à formação de outros AGPIs. A série de ácidos graxos $\omega 3$ ou $\omega 6$ implica nas mesmas elongases e dessaturases, e é possível, com a presença de $\Delta 17$ dessaturase, passar da série $\omega 6$ para $\omega 3$ (CHANG et al., 2022).

2.4 PROSPECÇÃO DE LIPÍDIOS POR *Mortierellaceae*

Óleos de origem microbiana são ausentes de substâncias tóxicas como dioxinas e metais pesados, comumente presentes em óleos de peixes (VADIVELAN; VENKATESWARAN, 2014a). Essa característica torna os lipídios microbianos mais seguros, o que tem levado o mercado a preferir os óleos DHA e ARA de origem microbiana para fórmulas infantis (GOYZUETA-MAMANI et al., 2020). A produção de ARA e outros AGPI por via microbiana, além da vantagem quanto à viabilidade do processo, é ambientalmente amigável, reduzindo o risco de extinção de diferentes espécies de peixes.

As SCO são produtos altamente avaliados no mercado. O preço do ARA, por exemplo, pode variar de \$ 65 kg⁻¹ para mais de \$ 500 kg⁻¹ (GOYZUETA-MAMANI et al., 2020). As principais demandas desses ácidos graxos são para suplementos dietéticos de bebês e adultos (suplementos para fisiculturistas e para terceira idade). Em maio de 2001, o FDA (*Food and Drug Administration*) concedeu o *status* de geralmente reconhecido como seguro (GRAS, do inglês *Generally recognized as safe*) às SCO de ARA e DHA.

Sendo o principal fungo produtor de AGPIs, particularmente de ARA, a espécie *M. alpina* é a mais estudada da família *Mortierellaceae* e uma vasta quantidade de trabalhos é encontrada na literatura a respeito da espécie. De análises ômicas à otimização de processo, os estudos de *M. alpina* servem de arcabouço para investigação de outros gêneros da família. Por

consequente, esta foi a abordagem deste trabalho, que tomou como base pesquisas realizadas com *M. alpina* para guiar o estudo com as novas linhagens isoladas.

2.4.1 Engenharia metabólica em *Mortierellaceae*

Aumentar a velocidade de consumo da fonte de carbono e o rendimento de lipídios é importante para reduzir o custo do cultivo de microrganismos oleaginosos. Embora muitas linhagens selvagens de *Mortierellaceae* possuam uma capacidade considerável de produção de lipídios, estes metabólitos são produzidos para a manutenção do crescimento celular, resultando em rendimentos que podem ser otimizados em relação ao seu estado natural (LEE et al., 2012).

Para a prospecção de linhagens com maiores rendimentos na produção de lipídios, a regulação do fluxo metabólico e a elucidação do mecanismo regulador da biossíntese de ácidos graxos são os principais avanços necessários para explorar e maximizar a produtividade lipídica de espécies de *Mortierellaceae* (CHANG et al., 2022).

A biossíntese de ácidos graxos, descrita no Item 2.3.1, oferece uma compreensão básica do metabolismo lipídico em *Mortierellaceae*. A princípio, vários genes da via metabólica podem ser manipulados para aumentar a produção de lipídios; através da regulação direcional do fluxo de carbono para a síntese de lipídios, aumentando o suprimento de cofatores para a síntese de ácidos graxos e recombinação das vias sintéticas de AGPIs para o ácido graxo alvo (ZHANG; CUI; SONG, 2021). Alguns exemplos de cepas de *M. alpina* manipuladas por meio de engenharia metabólica estão descritas na Tabela 2.

Além de glicose, outras fontes de carbono podem ser utilizadas para o cultivo de *Mortierellaceae*, a exemplo do glicerol. Para aumentar a utilização de glicerol, os genes responsáveis pelas primeiras etapas da decomposição do glicerol, a glicerol quinase (GK) e a glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PD), foram expressos de forma homóloga em *M. alpina*. Em meios de cultura contendo glicerol como fonte de carbono, a superexpressão de GK aumentou o teor de TAGs em 35%, enquanto a G3PD não teve efeito significativo no teor de lipídios, sugerindo que GK, em vez de G3PD, é o fator limitante na assimilação de glicerol em *M. alpina* (HAO et al., 2015).

A enzima málica (ME) catalisa a descarboxilação oxidativa do L-malato em piruvato e fornece NADPH para o metabolismo intracelular. Estudos anteriores indicaram que a ME desempenha um papel importante no fornecimento de NADPH durante a síntese de ácidos graxos em fungos oleaginosos (RATLEDGE; WYNN, 2002). A ME mitocondrial foi superexpressa através de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e um aumento

de 60% no conteúdo de ARA em TAGs foi observado, enquanto o teor de TAGs permaneceu em seu nível original (HAO et al., 2014a). Os resultados indicaram que a ME mitocondrial aumentou significativamente a taxa de dessaturação de ácidos graxos catalisada por dessaturases, o que pode ser usado como um gene alvo para melhorar a produtividade de AGPIs.

Tabela 2: Linhagens de *M. alpina* projetadas com genes expressos de forma homóloga ou heteróloga.

Gene	Origem	Microrganismo hospedeiro	Função e resultados	Referência
G6PD	<i>M. alpina</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de TAGs aumentou 1,42 vezes	(HAO et al., 2014a)
G6PD + ME	<i>M. alpina</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de ARA aumentou 7,2 vezes em 96 h	(HAO et al., 2016)
PGD	<i>M. alpina</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de ARA aumentou 1,2 vezes	(HAO et al., 2016)
ME-citoplasma	<i>M. alpina</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de TAGs aumentou 1,3 vezes.	(HAO et al., 2014a)
ME-mitocondria	<i>M. alpina</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de ARA aumentou 1,6 vezes enquanto o teor de TAGs manteve-se	(HAO et al., 2014b)
GK	<i>M. alpina</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de TAGs aumentou 1,35 vezes	(HAO et al., 2015)
IPMDH	<i>M. alpina</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de TAGs aumentou 1,2 vezes	(TANG et al., 2021)
MaYHM	<i>M. alpina</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de TAGs aumentou 1,2 vezes e a atividade de NAD ⁺ -IDH reduziu de 23 a 35 %	(LING et al., 2021)
Vhb	<i>Vitreoscilla</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de TAGs aumentou 4 vezes e o de ARA em 8 vezes, em condições de baixa oxigenação	(ZHANG et al., 2017)
oPpFADS17	<i>Phytophthora parasitica</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de EPA alcançou 1,9 g/L a temperatura ambiente	(TANG et al., 2018)
Ma ω3 Des	<i>M. alpina</i>	<i>M. alpina</i>	O teor de EPA atingiu 40 % dos TAGs a 12 °C	(ANDO et al., 2009)

Contudo, em estudos posteriores, foi levantada a hipótese de que o NADPH fornecido pela ME é insuficiente para as exigências da síntese de ácidos graxos, indicando que outras vias governavam o fornecimento de NADPH (HAO et al., 2014a). No estudo de Hao e colaboradores (2016), as principais enzimas envolvidas nas vias de suprimento de NADPH (Figura 8), incluindo glicose-6-fosfato-1-desidrogenase (G6PD), 6-fosfogluconato desidrogenase (PGD), isocitrato desidrogenase (IDH) e ME, foram superexpressas em *M. alpina* para determinar o efeito das fontes de NADPH na lipogênese. Entre elas, a G6PD mostrou o efeito mais significativo na síntese de ácidos graxos, com um aumento de 1,7 vezes no teor de TAGs. Quando G6PD e ME mitocondrial foram co-expressas, tanto a síntese de ácidos graxos quanto a dessaturação foram melhoradas, e o conteúdo de ARA foi 7,2 vezes maior que o do grupo controle cultivado em frascos (HAO et al., 2016). Este estudo demonstrou que a via de pentose

fosfato é o principal contribuinte de NADPH durante a síntese de ácidos graxos em *M. alpina*, confirmando a hipótese de que o NADPH fornecido por ME, apesar de significativo e importante ao metabolismo, não atende à demanda por síntese de ácidos graxos.

Como o ARA está presente em grandes quantidades em espécies de *Mortierellaceae*, melhorar o fator de conversão de ARA para EPA é uma maneira eficaz de aumentar o rendimento de EPA. Vários estudos têm como objetivo produzir AGPIs de alto valor (especialmente ARA e EPA) para aumentar o benefício comercial destes fungos. Para melhorar a produção de EPA, Ando e colaboradores expressaram de forma homóloga a ω -3 dessaturase em *M. alpina* 1S-4, e o conteúdo de EPA atingiu um máximo de 40% de TAGs quando cultivado a baixa temperatura (12 °C) por 16 dias (ANDO et al., 2009). No entanto, culturas de baixa temperatura têm alta demanda energética e apresentam efeitos negativos no crescimento celular e na atividade enzimática, o que pode reduzir a eficiência econômica na produção em larga escala (MAMANI et al., 2019).

Duas Δ 17 dessaturases, de *Pythium aphanidermatum* (PaFADS17) e de *Phytophthora parasitica* (PpFADS17), foram identificadas como tendo preferência de substrato para ácidos graxos de 20 carbonos (GE et al., 2018; TANG et al., 2018). Por meio da expressão do códon otimizado do gene oPp-FADS1 7 em *M. alpina* 1S-4, o fator de conversão de ARA em EPA aumentou para mais de 70 %, com teor de EPA em TAG de 31,5 %. A concentração alcançada foi de 1,9 g/L de EPA à temperatura ambiente (TANG et al., 2018). Posteriormente, esta concentração foi elevada a 3,47 g/L após otimização dos parâmetros de cultivo (HUANG et al., 2020). Estes estudos destacam as amplas aplicações prospectivas da produção de AGPIs por linhagens de *Mortierellaceae*.

2.4.2 Parâmetros fisiológicos de processo

Alguns elementos nutricionais são conhecidos por influenciar a produção de lipídios. Em microrganismos oleaginosos, o acúmulo de lipídios ocorre quando a fonte de carbono está em excesso e outro componente do meio de crescimento torna-se limitante. A limitação de nitrogênio no meio de cultura tem sido utilizada por muitos autores para induzir a produção de lipídios por microrganismos oleaginosos (LI; JIN, 2020; LU et al., 2021, 2011). A exaustão do nitrogênio induz o um aumento da atividade da AMP desaminase, para equilibrar a falta do suprimento de nitrogênio (BEOPOULOS et al., 2009). Estes efeitos foram observados em culturas de *Mucor circinelloides* (ZHAO et al., 2015), da microalga *Cryptocodium chonii* (SAFDAR et al., 2017) e de *M. alpina* (LU et al., 2021).

A relação C/N é um parâmetro significativo para a síntese de lipídios em microrganismos. De forma geral, estudos apontam que relações C/N inferiores a 10 favorecem o crescimento microbiano, enquanto relações altas de C/N retardam o crescimento do microrganismo e desviam o metabolismo à síntese lipídica (KOIKE et al., 2001; ROSA et al., 2010; XIE; WANG, 2015). No cultivo de *M. alpina*, Koike e colaboradores observaram um melhor rendimento na síntese lipídica para razões C/N entre 15 e 32. Especialmente para a produção de ARA, a faixa ótima da relação C/N para cultivo foi de 15 a 20 (KOIKE et al., 2001).

A fonte de nitrogênio é um fator fundamental ao desenvolvimento celular; a origem deste nutriente pode facilitar a assimilação pelo microrganismo – sendo a fonte orgânica ou inorgânica – ou estar associada a outros nutrientes, a exemplo de fontes complexas como extratos de levedura, ricas em potássio e outros minerais. No estudo de Lu e colaboradores, foram analisadas diferentes fontes de nitrogênio, orgânicas (extrato de levedura, milhocina e ureia) e inorgânicas (nitrato de sódio, nitrato de potássio, sulfato de amônio, nitrato de amônio e cloreto de amônio) (LU et al., 2011). Tanto na produção de células quanto no acúmulo lipídico, os melhores resultados foram obtidos utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio, resultando em 30 g/L de células e 4,4 g/L de ARA. O nitrato de sódio favoreceu o acúmulo de ARA, aumentando a porcentagem deste ácido graxo de 21,4 % (obtido com extrato de levedura) para 35,9 % dos lipídios totais. Contudo, o crescimento celular foi desfavorecido a partir desta fonte, resultando em uma concentração de 17,5 g/L (LU et al., 2011). Com isso, a produtividade de ARA com extrato de levedura foi 12,8 % superior à obtida com nitrato de sódio. Todavia, a tendência de maior acúmulo de ARA utilizando o nitrato de sódio pode ser otimizada através da utilização conjunta destas duas fontes de nitrogênio. Esta estratégia foi utilizada em pesquisas posteriores, onde foram adicionados cerca de 10 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de nitrato de sódio para os cultivos, que atingiram 6,9 g/L (YU et al., 2018), 8,1 g/L (LI et al., 2015) e 13,5 g/L (WU et al., 2017) de ARA no cultivo de *M. alpina*.

As fontes de carbono disponíveis para o cultivo de *Mortierellaceae* e outros microrganismos oleaginosos incluem principalmente sacarídeos, glicerol e materiais ricos em lipídios, como óleos de sementes (DEDYUKHINA et al., 2014; HAO et al., 2015; SHI et al., 2016). De forma geral, a glicose é a fonte de carbono mais utilizada tanto em pesquisas científicas, quanto na produção industrial (CHANG et al., 2021; JI et al., 2014a; MAMANI et al., 2019). Amido de cereais, como trigo e milho, lignocelulose e glicerol bruto também podem ser utilizados como fontes de carbono (CHANG et al., 2021). No cultivo de *M. alpina* TSM-3

utilizando amido solúvel, Yao e colaboradores aumentaram em 30 % o rendimento de biomassa quando comparado ao uso de glicose (YAO et al., 2019).

Considerando o custo de produção um dos principais obstáculos para a produção em larga escala de SCO, considerar fontes alternativas de carbono é fundamental para viabilizar este mercado. Estudos com glicerol, subproduto da produção de biodiesel, já apresentam resultados promissores, com a produção de 3,9-6,8 g/L de lipídios (MIRONOV et al., 2018). Utilizando resíduo da indústria de chips de batata, Goyzueta e colaboradores obtiveram 8 g/L de lipídios, sendo 35 % de ARA no cultivo de *M. alpina* (GOYZUETA-MAMANI et al., 2020). *A. wolfii* foi cultivada utilizando bagaço de cana de açúcar para a produção de AGPIs, e obteve-se 1,6 g/L de lipídios (HASHEM et al., 2021).

Por tratar-se de microrganismos mesófilos, as espécies de *Mortierellaceae* apresentam temperatura ótima de crescimento em 25 a 28 °C. Nesta faixa de temperatura, o acúmulo de biomassa é favorecido e grande parte das reações enzimáticas também (CHANG et al., 2021). Particularmente, a conversão de ARA a EPA, catalisada pela ω 3 dessaturase, é favorecida a temperaturas inferiores a 20 °C (SAKURADANI et al., 2005). Contudo, baixas temperaturas retardam o metabolismo, limitando o acúmulo de biomassa. Para contornar esta problemática, uma estratégia encontrada por Peng e colaboradores foi a de iniciar o cultivo em temperatura mais alta, de 25 °C, favorecendo o crescimento celular pelos 4 primeiros dias. Em seguida, reduziu-se a temperatura para 20 °C, para favorecer a síntese de PUFAs com alto teor de insaturações (PENG et al., 2010b).

Outro parâmetro importante ao crescimento celular e à estabilidade de metabólitos intracelulares *Mortierellaceae* é o pH (MIRONOV et al., 2018). Com a mudança do pH no cultivo, ocorre a alteração da carga da membrana celular, afetando a atividade de enzimas, especialmente as presentes na membrana celular, como elongases e dessaturases. A enzima málica, responsável por parte da geração de NADPH (Item 2.3.1), é sensível a mudanças de pH (CHANG et al., 2021). Comumente a faixa de pH entre 5,5 e 6,5 é utilizada no cultivo de *Mortierellaceae* (JIN et al., 2008; MALAIWONG et al., 2016; WU et al., 2017). Mas estratégias de duas etapas de pH durante o cultivo tem-se mostrado eficientes, como mostra o estudo de Li e colaboradores, com produção de 15,5 g/L de lipídios por *M. alpina*, em um cultivo mantido a pH de 5,5 nas primeiras 48 h e elevado a 6,5 até o fim do cultivo (LI et al., 2015).

A produtividade, tanto de biomassa quanto de lipídios, é sensivelmente afetada por parâmetros como aeração, velocidade de agitação, concentração de oxigênio na entrada e controle morfológico das células (LU et al., 2021). Uma vez que a biossíntese de AGPIs ocorre

por via de alongamento e dessaturação, as reações enzimáticas por dessaturases requerem oxigênio (RADHAKRISHNAN, 2014) e é necessário adequar a dispersão de ar, a fim de controlar a morfologia dos micélios dos fungos e evitar grandes gradientes de concentração. Higashiyama e colaboradores consideraram a faixa de 10 a 15 ppm de oxigênio dissolvido como ótima para essa finalidade (HIGASHIYAMA et al., 2002).

Na produção industrial de AGPIs por microrganismos oleaginosos aeróbios, a alta densidade celular é fundamental para garantir um rendimento final adequado. No entanto, a alta concentração de biomassa pode levar dificultar a transferência de massa no meio, tornando ineficiente a transferência de oxigênio e reduzindo a taxa de reação das dessaturações. Dessa forma, aumentar a velocidade de agitação e taxa de aeração é eficiente para o fornecimento de oxigênio dissolvido (OD), porém esta abordagem pode ser limitada para evitar danos aos micélios do fungo devido à força de cisalhamento, principalmente para estudos de aumento de escala (ZHANG et al., 2017).

Como parâmetro de processo, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) é fundamental para compreensão do processo e para aumento de escala. Para monitorar o fornecimento de oxigênio com mais precisão, a porcentagem de OD não é absoluta, visto que esta é dependente da agitação do meio, concentração celular, tipo de biorreator, entre outros (GARCÍA-OCHOA; CASTRO; SANTOS, 2000). Em contrapartida, o k_{LA} pode ser correlacionado com a combinação de velocidade do agitador, velocidade superficial do gás e viscosidade efetiva do líquido (QU et al., 2013).

Qu e colaboradores (2013) desenvolveram uma estratégia de aumento de escala baseada no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) para melhorar a produção de DHA por *Shizochytrium* sp. e obtiveram melhores resultados quando o k_{LA} de *scale-up* foi o mesmo que o k_{LA} obtido no frasco (QU et al., 2013). Um vetor de oxigênio, como o n-hexadecano, pode atuar como agente tensoativo para diminuir a tensão superficial da água e aumentar a área interfacial específica do gás. Foi relatado que o n-hexano pode servir como um vetor de oxigênio, e a adição de 4% de n-hexano pode melhorar significativamente o OD e promover o acúmulo de biomassa, teor de lipídios e rendimento de óleo em *M. alpina* (PENG et al., 2010a).

A partir disso, este trabalho buscou investigar parâmetros de processo para uma linhagem recém isolada de ambiente extremófilo. Para tal, tomou-se como base estudos de Huang e seu grupo de pesquisa (JI et al., 2014b; JIN et al., 2008; LU et al., 2011; PENG et al., 2010a, 2010b; YU et al., 2018; ZHANG et al., 2017), que possui trabalhos muito relevantes à área, além das pesquisas de Higashiyama e colaboradores (HIGASHIYAMA et al., 1998, 2002;

KOIKE et al., 2001), Mamani e colaboradores (MAMANI et al., 2019) e Chang e colaboradores (CHANG et al., 2021, 2022), devido às importantes contribuições à área e diversas citações na literatura desses grupos e autores.

Neste contexto, o presente trabalho agrega valor à área de produção de AGPIs por espécies da família Mortierellaceae, trazendo a investigação de linhagens isoladas de ambiente extremo, apontando novas linhagens para dois gêneros da família; e a investigação destas para a produção de ácidos graxos, apontando *Linnemannia* sp. ACF 038 como potencial produtor de ácido linoleico. Com isso, apresenta-se uma pesquisa robusta na área de bioprocessos, abordando desde a caracterização genômica até a análise fisiológica para escalonamento e melhoramento das condições de cultivo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

As linhagens utilizadas neste estudo foram obtidas a partir da coleção de fungos da Antártida do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LAMB/P/UFSC). As linhagens de fungos foram isoladas a partir do solo de degelo de geleira da Ilha Rei George, na Antártida, situada na coordenada 62° 23' S 58° 27' O, a 120 km da Península Antártida e 849 quilômetros do sul do Cabo Horn, no Sul da América do Sul. As culturas de trabalho foram mantidas a 6 °C, em placas de Petri, com repique a cada 3 meses. As culturas de estoque foram mantidas a -80 °C em glicerol. As linhagens de fungos estudadas foram nomeadas como ACF 036, ACF 037, ACF 038 e ACF 039.

3.2 CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DOS MICRORGANISMOS

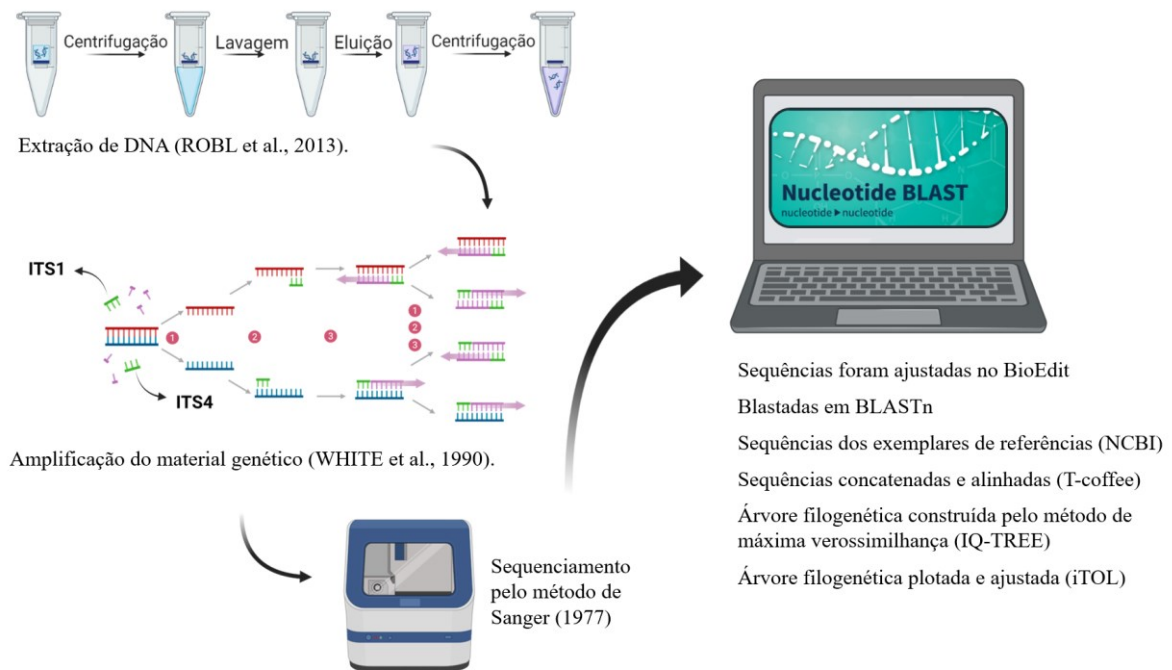
3.2.1 Extração e sequenciamento da região ITS

Os microrganismos (ACF 036, ACF 037, ACF 038 e ACF 039) foram cultivados em caldo Sabouraud por 14 dias a 6 °C. A biomassa obtida para cada microrganismo foi filtrada a vácuo e submetida ao congelamento por nitrogênio líquido. Realizou-se o rompimento celular através da maceração da biomassa congelada em nitrogênio líquido e posteriormente transferiu-se este material para tubos *Eppendorfs* de 2 mL. No tubo, foram adicionados 1000 µL de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e, após agitação, o material foi incubado a 65 °C por 1 h e em seguida centrifugado por 10 min a 6760 × g (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) para a precipitação do resíduo celular. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo no qual foram adicionados 500 µL de solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), novamente agitado e centrifugado por 15 min a 6760 × g (ROBL et al., 2013).

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, juntamente com 2 volumes de etanol 90 % gelado. O DNA foi precipitado a 4°C por 12 h e em seguida centrifugado por 10 min a 27 000 × g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70 %, secado à temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µL de água miliQ. A solução foi tratada com 50 µL de RNase (10 ng/µL), incubada em *termoshaker* por 60 min a 37 °C e posteriormente armazenada a -20 °C (DE HOOG, 1999). O processo de extração está esquematizado na Figura

10. A quantificação do DNA extraído foi realizada por espectrofotômetro NanoDrop, conforme metodologia de Desjardins e Conklin (DESJARDINS; CONKLIN, 2010), no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da UFSC.

Figura 10: Metodologia de extração de DNA, amplificação de material genético, sequenciamento e alinhamento das linhagens.



Fonte: Autora (2022). (Ilustração criada na plataforma BioRender, <https://biorender.com/>).

O material genético foi então submetido à reação de polimerização em cadeia da polimerase (PCR), para amplificação do material genético na região do espaçador interno transcrito (ITS). O rDNA da região ITS foi amplificado utilizando os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990), a solução DFS – *Mastermix of Taq DNA Polymerase (2X)* e o DNA extraído na concentração de 100 ng/μL. Na fase de anelamento da reação, a temperatura inicial foi de 58 °C, reduzindo 1 °C a cada dois ciclos, até atingir 55 °C e mantendo esse valor até o final da reação, que totalizou 35 ciclos. Ao fim da reação, as amostras foram conservadas a -20 °C e a qualidade da reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

O produto da PCR foi purificado com isopropanol 75 %, etanol 70 % e ressuspenso em água miliQ. A partir do produto purificado, foram enviadas amostras à empresa Myleus Facility (Belo Horizonte, MG) para sequenciamento bidirecional pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). As sequências foram ajustadas através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 (HALL, 1999) e comparadas com a base

de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) com o software de alinhamento sequencial BLASTn.

As sequências resultantes do sequenciamento das linhagens isoladas e demais sequências obtidas do NCBI (APÊNDICE - Tabela 18), de linhagens pertencentes à família *Mortierellaceae*, foram concatenadas e alinhadas utilizando o programa T-coffee v11.0 (DI TOMMASO et al., 2011). A árvore filogenética foi construída com *bootstraps* de 10.000 réplicas (HOANG et al., 2018), pelo método de máxima verossimilhança, utilizando a ferramenta IQ-TREE v1.6.12 (TRIFINOPOULOS et al., 2016), com aplicação do modelo de substituição TPM3+F+G4 (YANG, 1994), selecionado estatisticamente pela ferramenta ModelFinder (KALYAANAMOORTHY et al., 2017). Por fim, a árvore foi plotada utilizando a plataforma iTOL v6.5.8 (TRIFINOPOULOS et al., 2016).

3.2.2 Avaliação de características fisiológicas: crescimento em meio BDA e meio sintético

Com o objetivo de selecionar uma linhagem de fungo para os estudos cinéticos, após a caracterização da região ITS, as linhagens de fungos com resultado resolutivo a nível de gênero foram selecionadas para o cultivo estático em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), por 14 dias a 6 °C. A partir desses resultados, que consideraram o grau de identidade com dados do NCBI e a viabilidade de cultivo em laboratório, a linhagem de fungo selecionada foi submetida a um cultivo submerso, em *Erlenmeyers*.

Para o inóculo do cultivo submerso, prepararam-se frascos contendo 400 mL de caldo Batata-Dextrose (BD), para os quais foram transferidos esfregaços contendo esporos e biomassa, coletados das culturas em BDA e padronizados em uma cultura em placa de Petri para cada frasco de meio líquido (400 mL). Estes frascos foram mantidos a 25 °C e 120 rpm de agitação por 72 h, conforme utilizado por Lu e colaboradores no cultivo de *M. alpina*, espécie de referência dentro da família *Mortierellaceae* (LU et al., 2011). Para o cultivo, 10 % (v/v) do inóculo foi transferido para frascos *Erlenmeyer* de 1 L, contendo 400 mL de meio composto por (g/L): 1,3 K₂HPO₄·3H₂O; 0,5 KCl; 0,01 FeSO₄·7H₂O; 0,5 MgSO₄·7H₂O; 20 Glicose; 3 NaNO₃. O cultivo seguiu a 25 °C e 150 rpm por mais 120 h (LU et al., 2011).

3.3 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DE CULTIVO: TEMPERATURA, pH, FONTE E CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

Para a avaliação dos parâmetros cinéticos de cultivo, realizaram-se cultivos em meio sólido, em três blocos distintos. No primeiro bloco de experimentos, avaliou-se a interferência dos fatores pH, entre 4 e 8, e concentração de glicose, entre 20 e 40 g/L, no crescimento do fungo estudado. Ambas as faixas das variáveis avaliadas foram escolhidas com base em resultados da literatura. Para o pH, utilizou-se um valor mínimo de pH 4, tendo em vista a preferência de fungos por meios ácidos (WAGNER et al., 2013) e um valor máximo pouco utilizado na literatura, mas encontrado em algumas referências como Lu e colaboradores (LU et al., 2011).

Tabela 3: Ensaios para avaliação dos fatores pH e Concentração de Glicose

Nível/Variável	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	4	4,6	6	7,4	8
Glicose [g/L]	20	23	30	37	40

O pH foi ajustado utilizando ácido sulfúrico 10 % (v/v). O bloco de experimentos seguiu um planejamento experimental do tipo estrela com ponto central (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010), conforme Tabela 3, com quatro réplicas no ponto central, totalizando 12 ensaios, realizados em triplicata à temperatura de 25 °C. A composição do meio utilizado é descrita na Tabela 4, conforme metodologia utilizada por Lu e colaboradores (LU et al., 2011), e foi igualmente preparada para todos os ensaios.

Tabela 4: Composição do meio para os ensaios de Triagem de Parâmetros

Composto	Concentração (g/L)		
	Bloco 1	Bloco 2	Bloco 3
K ₂ HPO ₄	1.00	1.00	1.00
KCl	0.50	0.50	0.50
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.01	0.01	0.01
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.50	0.50	0.50
Glicose	20/23/30/37/40	35	35
Nitrogênio	1.00 ^A	0.50 / 0.75 / 1.00 / 1.25	1.00 ^B
Ágar	18.00	18.00	18.00

^A Nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. ^B Extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

No segundo bloco de ensaios, avaliou-se a influência da fonte e da concentração de nitrogênio no crescimento do microrganismo estudado. A composição do meio é descrita na Tabela 4. As fontes de nitrogênio testadas foram nitrato de sódio (NaNO₃) (LU et al., 2011), fosfato de diamônio ((NH₄)₂HPO₄) (SHAH et al., 2016), ureia (CH₄N₂O) (LU et al., 2011) e extrato de levedura (JI et al., 2014b). Este último, o extrato de levedura CMF, foi gentilmente fornecido pela empresa Biorigin. Cada fonte foi testada em quatro concentrações de nitrogênio diferentes, como mostra a Tabela 5. Deste fatorial completo, resultaram 16 ensaios, realizados em triplicata e inoculados a 25 °C.

Tabela 5: Ensaios para avaliação dos fatores Fonte e Concentração de Nitrogênio

Variável	Nível			
Fonte de Nitrogênio	NaNO ₃	DAP	UR	YE
Nitrogênio [g/L]	0,50	0,75	1,00	1,25

Por fim, avaliou-se a temperatura de incubação em 20, 25 e 37 °C. A temperatura de 25 °C já vinha sendo utilizada, tendo em vista que o microrganismo, apesar de isolado de local extremófilo, é provavelmente um cosmopolita na região e pode ser caracterizado como mesófilo (RUISI et al., 2007). Dessa forma, as temperaturas de 20 e 25 °C foram escolhidas para avaliar este comportamento em relação à temperatura, enquanto a temperatura de 37 °C foi escolhida por tratar-se da temperatura média corporal humana, a fim de avaliar se o microrganismo

apresenta alguma característica de oportunista. Com base nos resultados dos blocos anteriores, o meio foi composto conforme a Tabela 4 e as placas foram então incubadas nas diferentes temperaturas.

Para inoculação dos ensaios, utilizou-se um recorte de aproximadamente 50 mm² de micélio do fungo e em seguida as placas foram incubadas por 144 a 168 h. Um esquema ilustrativo da metodologia é apresentado na Figura 11. Para todos os blocos experimentais, realizou-se o controle através de cultivos em meio BDA. Como resposta, realizou-se a medida do diâmetro da colônia a cada 24 h de cultivo e este valor foi expresso como porcentagem em relação ao ensaio controle (BDA), conforme mostra a Equação 1.

$$R_{\%} = \frac{d_{ensaio}}{d_{controle}} \times 100 \quad (1)$$

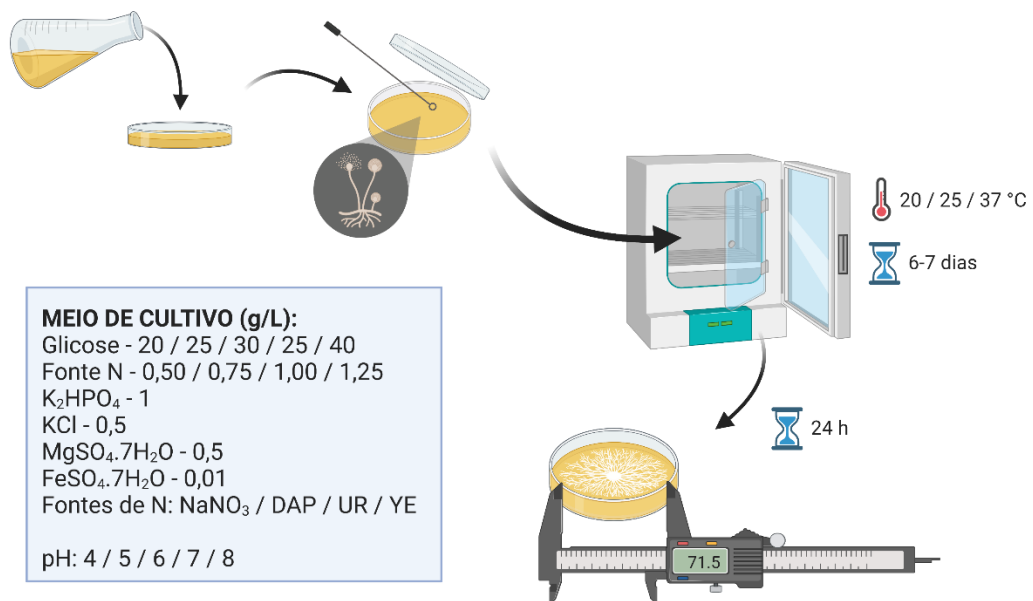
Onde:

d_{ensaio} = Diâmetro do halo de crescimento do fungo no ensaio [mm];

$d_{controle}$ = Diâmetro do halo de crescimento do fungo no controle [mm];

$R_{\%}$ = Porcentagem de crescimento do ensaio em relação ao controle [%].

Figura 11: Esquema da metodologia utilizada na caracterização fenotípica de cultivo estático.



Fonte: Autora (2022). (Ilustração criada na plataforma BioRender, <https://biorender.com/>).

A análise dos resultados e verificação da existência de diferença significativa foram realizadas no software Statistica® 12.5. Realizou-se análise de variância (ANOVA), seguido de um teste de comparação entre médias (Tukey) a um nível de significância de 0,05.

3.4 ESCALONAMENTO E MELHORAMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE SCO

O fungo selecionado na etapa de sequenciamento da região ITS e triagem, bem como as condições de cultivo previamente determinadas foram usadas nesta etapa do trabalho. O intuito desta fase foi observar o crescimento e produção de lipídeos pelo fungo selecionado em condições ideais de controle de oxigenação por meio de cultivos em biorreatores de bancada.

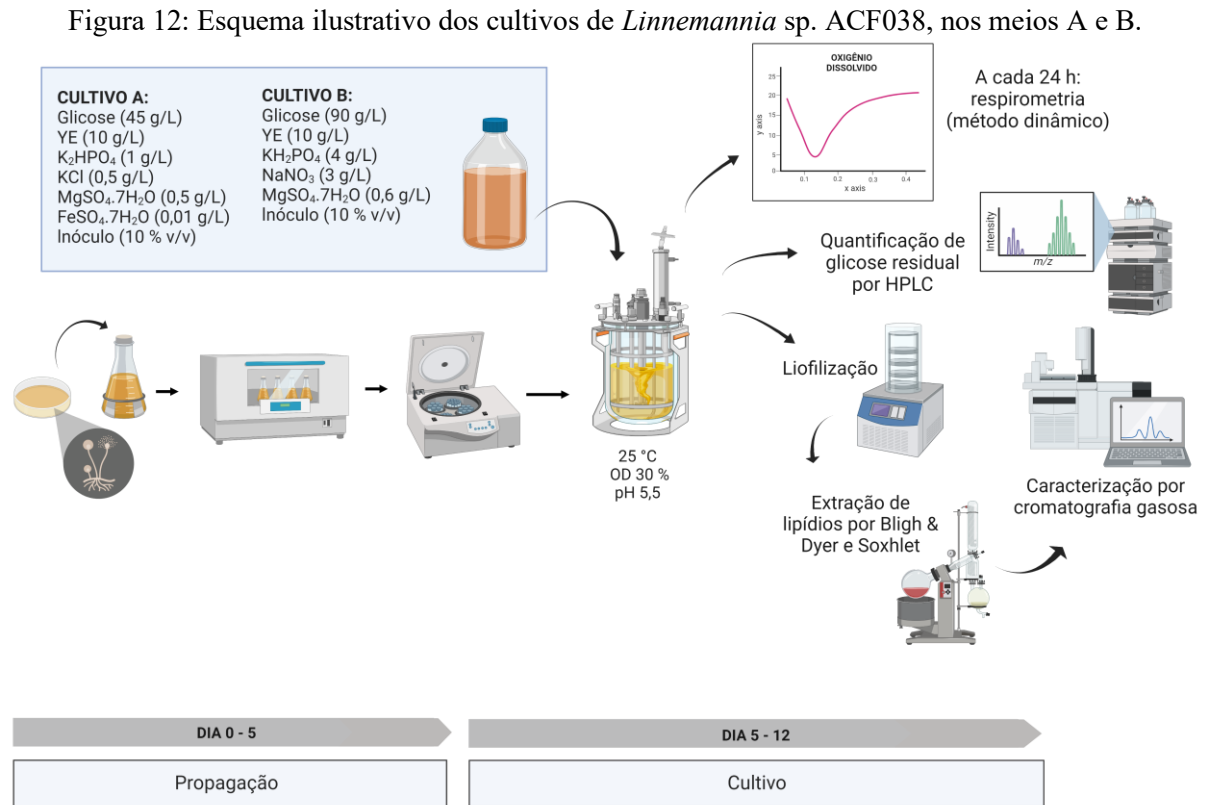
A linhagem selecionada foi transferida para tubos contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 25 °C em *shaker* por 7 dias. Após o crescimento, foram realizados inóculos em meio Batata Dextrose Ágar (BDA). As culturas com crescimento abundante em meio BDA foram utilizadas como inóculo à propagação nos meios líquidos. Sendo estes, caldo Batata Dextrose (BD), para o cultivo A e meio sintético para o cultivo B, descrito na Tabela 6.

Tabela 6: Composição dos meios de propagação e cultivo submerso em biorreator.

Composto	Concentração (g/L)			
	Propagação A	Cultivo A	Propagação B	Cultivo B
Batata Dextrose	27	-	-	-
Glicose	-	45	30	90
Extrato de levedura	-	10	6	10
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	-	-	3	3
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	-	1	3	4
KCl	-	0,5	-	-
Sulfato de ferro II (FeSO ₄ .7H ₂ O)	-	0,01	-	-
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	-	0,5	0,5	0,6

As composições de propagação e meio de cultivo utilizado nesta etapa do trabalho estão descritas na Tabela 6. O meio do cultivo A teve como referência o estudo de Lu et al. (2011), enquanto o meio do cultivo B foi baseado no meio utilizado no estudo de Ji et al. (2014). A

escolha da fonte e concentração de nitrogênio considerou os resultados obtidos na etapa de investigação das características fenotípicas de cultivo (Item 3.3). As principais diferenças entre os cultivos A e B são o aumento da concentração de glicose, de fosfato e de nitrogênio, através da adição de nitrato de sódio.



Fonte: Autora (2022). (Ilustração criada na plataforma BioRender, <https://biorender.com/>).

As propagações foram realizadas em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, com volume útil de 200 mL. Os cultivos foram conduzidos em bioreatores BioFlo® 115 1,5 L (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) com 900 mL de volume de trabalho. O cultivo A foi realizado com 700 mL de meio, pH de 5,5, temperatura de 25 °C, vazão de ar de 0,1 a 1 VVM e agitação entre 150 e 500 rpm para manutenção da porcentagem de oxigênio dissolvido em 30 % em relação a saturação com ar atmosférico, conforme descrito por Ji e colaboradores (JI et al., 2014b). Os mesmos parâmetros foram utilizados para o cultivo B, exceto o volume inicial de meio, que foi aumentado para 900 mL, a fim de facilitar a amostragem. A temperatura de cultivo e o pH foram fixados conforme os melhores valores observados na fase de investigação das características fenotípicas de cultivo (Item 3.3). Um resumo dos parâmetros é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros do processo utilizados no cultivo submerso em biorreator.

Parâmetro	Cultivo A	Cultivo B
Volume total (mL)	700	900
Temperatura (°C)	25	25
pH	5,5	5,5
Concentração inicial de glicose (g/L)	45	90
Oxigênio dissolvido (%)	30	30
Agitação (rpm)	150 – 500	150 – 500
Vazão de ar (VVM)	0,1 – 1	0,1 – 1

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Determinação da biomassa inicial e final

Determinou-se a biomassa por análise gravimétrica, a partir de alíquotas de 10 mL do caldo fermentado, centrifugadas em tubos Falcon de 15 mL, previamente identificados e tarados, a $3\ 000 \times g$ por 20 min. O sobrenadante foi separado e o precipitado ressuspenso em 5 mL de água destilada e centrifugado novamente. Desprezou-se então o sobrenadante e o tubo contendo as células foi levado à estufa a 105 °C por 24 h. Após esse tempo, as amostras foram levadas ao dessecador até atingirem temperatura ambiente e peso constante. O cálculo da concentração de biomassa é apresentado abaixo.

$$X_t = \frac{m_{seca} - m_{tubo}}{V} \times 1000 \quad (2)$$

Onde:

m_{seca} = Massa do tubo falcon após a secagem, em gramas;

m_{tubo} = Massa do tubo falcon seco, em gramas;

V = Volume coletado, em mL;

X_t = Concentração de biomassa total, em g/L.

A biomassa total, obtida pela Equação 2, inclui a massa de lipídios (produto). Logo, para cálculos de parâmetros cinéticos, foi utilizada a biomassa residual como base de cálculo. Para isso, desconta-se a massa de lipídio presente na amostra, conforme a Equação (3).

$$X = X_t - P \quad (3)$$

Onde:

X = Concentração de biomassa residual, em g/L;

P = Concentração de lipídios, em g/L.

X_t = concentração de biomassa total, em g/L

3.5.2 Determinação da concentração de açúcares redutores residuais

As amostras do cultivo foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado em filtros de 0,22 μm (membrana PVDF, marca Analítica) para análise no Cromatógrafo Líquido (LC-20A Shimadzu). A determinação de glicose foi feita por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Precisão (CLAE) por índice de refração, usando uma coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 1,00 μm , 7,8 mm x 9 μm , Bio-rad), com fluxo de 0,6 mL/min e com temperatura de detector e coluna igual a 50 °C. Como fase móvel, foi utilizada solução 5 mM de ácido sulfúrico (SLUITER et al., 2016).

3.5.3 Determinação da concentração de nitrogênio residual

Na composição dos caldos sintéticos, foram utilizadas diferentes fontes de nitrogênio. Na forma inorgânica, através do Nitrato de Sódio, e na forma orgânica, através do Extrato de Levedura. Assim, foram utilizadas duas análises para a quantificação do nitrogênio residual total. Para o nitrogênio na forma de nitrato, foi utilizado o Método do Ácido Salicílico (CATALDO et al., 2008) e, para o nitrogênio proteico, a quantificação foi realizada a partir do método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

O método do ácido salicílico descrito por Cataldo e colaboradores baseia-se na geração de um complexo formado pela nitriação do ácido salicílico em condições ácidas. Na sequência, solução alcalina é adicionada para que o pH fique superior a 12, onde a coloração amarela, proporcional à concentração de nitrato, pode ser quantificada através da absorbância.

Para a análise, foram colocados 200 μL de amostra em um tubo de ensaio com capacidade superior a 25 mL e adicionados 800 μL de solução AS- H_2SO_4 (ácido salicílico 5%

(w/v) em H₂SO₄ concentrado). Aguardaram-se 20 minutos para que a reação ocorresse e em seguida foram acrescentados 19 mL de solução NaOH com concentração de 2 mol/L. Após estabilização da temperatura, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 410 nm. A curva padrão foi preparada com NaNO₃, abrangendo a faixa de 0 a 70 mg N-NO₃/L (CATALDO et al., 2008). Após a análise, as concentrações de nitrato foram convertidas à concentração de nitrogênio pela relação entre as massas molares, de acordo com a Equação (4).

$$C_N = 0,226 \times C_{NO_3} \quad (4)$$

Onde:

C_N = Concentração de nitrogênio, em g/L;

C_{NO_3} = Concentração de nitrato, em g/L.

O método de Lowry baseia-se na redução do reagente Folin Ciocalteau, que é uma mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico. A redução ocorre quando o reagente Folin reage com proteínas na presença do catalizador Cu⁺². A reação resulta em um complexo de cor azul e tem máxima absorção em 750 nm, sendo estável por até 4 horas (SANTOS, 2012).

Para a análise, preparou-se a solução A, na proporção 50:1 das respectivas soluções: Na₂CO₃ 2 % em NaOH 0,1 M e CuSO₄·5H₂O 0,5 % com 1% de citrato de sódio. Para a análise, foram adicionados 100 µL das amostras em tubos de ensaio. Em seguida, adicionou-se 2 mL da solução A e a amostra foi mantida em repouso por 10 min. Então, foram adicionados 200 µL da solução 1:1 de reagente Folin Ciocalteau e água destilada. Os tubos foram então agitados em vórtex e mantidos em repouso por mais 30 min. Após o repouso, as amostras foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm (LOWRY et al., 1951). A curva padrão foi feita com extrato de levedura idêntico ao utilizado no caldo de cultivo.

3.5.4 Determinação da velocidade de respiração (Q_{O₂X}) e do coeficiente volumétrico de transferência oxigênio (k_{LA})

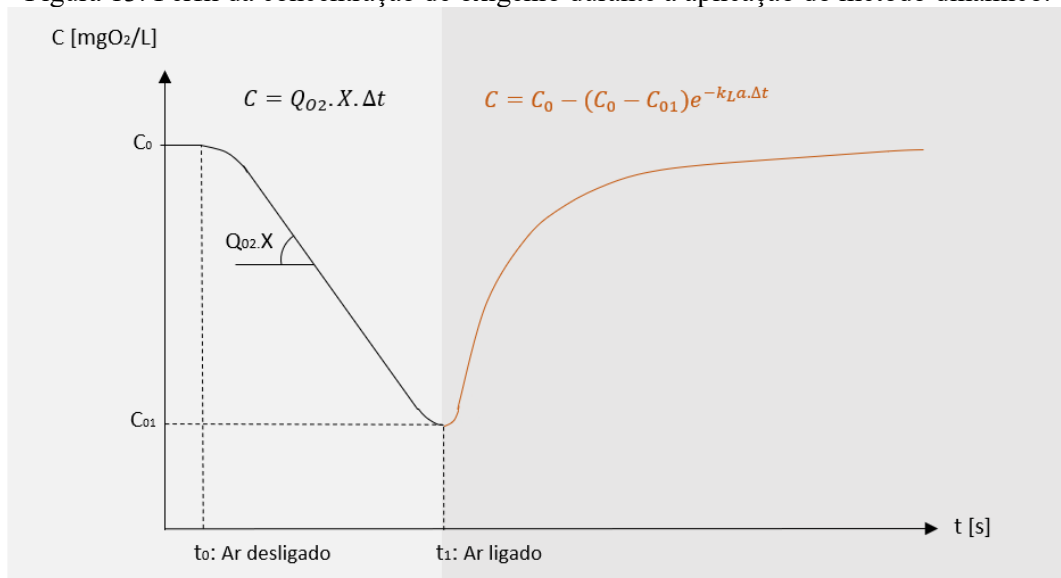
As metodologias referentes à transferência de massa de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida no biorreator são apresentadas a seguir. A sonda utilizada para monitoramento da concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi um sensor óptico de OD InPro 6800 (METLER

e TOLEDO). Para a determinação da velocidade de consumo de oxigênio ($Q_{O_2}X$) e do coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_{La}) utilizou-se o Método Dinâmico (BANDYOPADHYAY et al., 1967).

O balanço de massa de oxigênio no meio, apresentado pela Equação (5), é dado pela diferença entre o teor de oxigênio dissolvido [$k_{La} (C_S - C)$] e a velocidade de respiração ($Q_{O_2}X$). A análise é dividida em duas etapas, a interrupção da aeração e a retomada o fluxo de ar. Em ambas as fases, coletam-se os dados de concentração de oxigênio dissolvido (%) detectados pela sonda, através dos quais é possível traçar o perfil de oxigênio no meio (Figura 13).

$$\frac{dC}{dt} = k_{La} \cdot (C_S - C) - Q_{O_2} \cdot X \quad (5)$$

Figura 13: Perfil da concentração de oxigênio durante a aplicação do método dinâmico.



Fonte: Autora (2022).

Na interrupção da aeração, observa-se a queda gradual e linear da concentração de OD. Nesta etapa, a agitação é mantida e considera-se que a concentração celular é constante no curto intervalo de tempo (BONAN et al., 2020). Os dados obtidos são do teor de oxigênio dissolvido no meio, em porcentagem, e devem ser convertidos em concentração de oxigênio, em miligrama de oxigênio por litro, através da Equação (6).

$$C = C_S \times OD \quad (6)$$

Onde:

C = Concentração de Oxigênio (mgO_2/L);

C_s = Concentração de Saturação de O_2 (mgO_2/L);

OD = Oxigênio Dissolvido (%)

Como concentração de saturação de oxigênio (C_s) no meio de cultivo, equivalente ao OD de 100 %, considerou-se a saturação do oxigênio em água a 25 °C, que é de 8,11 mgO_2/L (CONNELL, 1997).

A partir das concentrações de oxigênio no meio, plota-se o perfil de oxigênio em função do tempo. Com a interrupção do fluxo de ar, o primeiro termo da Equação (5) é desconsiderado, pois não há oxigênio sendo transferido ao meio – Equação (7).

$$k_L a \cdot (C_s - C) = 0 \quad (7)$$

Assim, a variação de oxigênio no meio é dada apenas pelo segundo termo, referente à respiração celular - Equação (8) (BANDYOPADHYAY; HUMPHREY; TAGUCHI, 1967).

$$\frac{dC}{dt} = -Q_{O_2} \cdot X \quad (8)$$

Integrando, então, a Equação (8), obtém-se a Equação (9), através da qual é possível modelar os dados experimentais e determinar a velocidade de consumo de oxigênio ($Q_{O_2}X$) através do coeficiente angular da reta.

$$C = C_0 - Q_{O_2} \cdot X \cdot \Delta t \quad (9)$$

Após a queda na concentração de OD, a aeração é retomada, antes que a concentração crítica de OD seja atingida, para não prejudicar o crescimento celular. Com a retomada da aeração, a concentração de oxigênio no meio de cultivo aumenta, como mostra a Figura 13 a partir de t_1 , até atingir o equilíbrio novamente. Admite-se, nesse espaço de tempo, que a velocidade de consumo de oxigênio pelo microrganismo é constante e que a concentração de equilíbrio é igual à concentração C_0 , antes da interrupção da aeração. Para essas considerações, a Equação (5) é integrada e o perfil de oxigênio no meio é descrito pela Equação (10).

$$C = C_0 - (C_0 - C_{01})e^{-k_{La} \cdot \Delta t} \quad (10)$$

Onde:

C = Concentração de Oxigênio (mgO₂/L);

C_0 = Concentração de O₂ antes da interrupção da aeração (mgO₂/L);

C_{01} = Concentração de O₂ no momento da retomada da aeração (mgO₂/L);

k_{La} = Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h⁻¹)

A partir do ajuste de regressão não linear dos dados experimentais, utilizando a Equação (10) como modelo matemático, obtém-se o valor do coeficiente k_{La} . Para o ajuste do modelo, utilizou-se a extensão Solver, do software Excel. Como função objetivo a ser minimizada, empregou-se o somatório dos quadrados das diferenças entre os dados experimentais e do modelo - Equação (11)

$$\sum \text{Erro} = \sum (C_{EXP} - C_{MOD})^2 \quad (11)$$

Onde:

C_{EXP} = Concentração de O₂ obtida experimentalmente (mgO₂/L);

C_{MOD} = Concentração de O₂ calculada pelo modelo (mgO₂/L);

3.5.5 Análise qualitativa da produção de lipídios por microscopia de fluorescência

A presença de gotículas de lipídios foi verificada a partir de coloração com o corante lipofílico Vermelho de Nilo (9-dietilamino-5H-benzo[a]fenoxazina-5-ona). A metodologia foi adaptada de Ahmad e colaboradores (AHMAD et al., 2013). Uma amostra de 1 mL de cultivo fresco foi coletada e centrifugada a 3 000 × g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de biomassa foi ressuspensão em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) 20 %. Após agitação em vórtex por 10 min, as células foram centrifugadas novamente a 4 000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de água destilada e agitado em vórtex. Adicionou-se então 12,5 µL da solução de do corante Vermelho de Nilo 10 % em tampão fosfato-salino (PBS) e a amostra foi incubada por 10 min no escuro e à temperatura ambiente.

Na sequência, as células foram fixadas em lâminas de microscopias e observadas em Microscópio Confocal Leica DMI 6000, usando luz UV em campo escuro, com excitação e emissão a 514 nm e 560 nm, respectivamente. A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC.

3.5.6 Extração de lipídios

Foram realizados dois métodos de extração, um a quente, por Soxhlet (1879), para a quantificação do teor lipídico e um a frio, por Bligh-Dyer (1959), para a caracterização do perfil de ácidos graxos. A extração por Soxhlet foi realizada com um extrator adequado, pelo qual foram rodados de 4 a 6 ciclos de extração, no período de 8 h. O solvente utilizado foi uma solução de clorofórmio e metanol na proporção 1:2 (MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2015). No interior do extrator foi colocado um cartucho previamente pesado e contendo 500 mg de biomassa liofilizada. Ao fim da extração, o solvente foi rota-evaporado para obtenção do extrato. O cartucho final foi seco em estufa até massa constante e o quantitativo do extrato foi obtido por gravimetria. O rendimento de lipídios e o teor de lipídios foram expressos em gramas de lipídios por litro de meio de cultivo e gramas de lipídios por grama de células secas (%), respectivamente.

A fim de evitar a degradação dos ácidos graxos poli-insaturados, o método de Bligh-Dyer foi utilizado como alternativa. Por tratar-se de uma extração sem exposição ao calor, o rendimento é significativamente inferior quando comparado ao método de Soxhlet, contudo, a preservação dos AGPIs é significativamente superior pelo método a frio. Para a extração a frio, foi realizado um pré-tratamento ácido, no qual adicionou-se 4 mL de ácido clorídrico 2 mol/L em tubos contendo 300 mg de biomassa liofilizada, que foram incubados a 80 °C por 1 h. Após o tratamento, as amostras foram centrifugadas ($3\ 000 \times g$, 15 min), a solução ácida foi descartada e seguiu-se para a extração pelo método adaptado de Bligh-Dyer (ANSCHAU et al., 2014; BLIGH; DYER, 1959).

Foram adicionados 6 mL de metanol:clorofórmio (2:1, v/v) ao sedimento sólido. A suspensão foi agitada em vórtex por 2 minutos e em seguida, 2 mL de clorofórmio foram adicionados ao tubo e agitados por 2 minutos. Para gerar um sistema com duas fases líquidas, foram adicionados 3,6 mL de água destilada e o sistema foi agitado novamente por 2 minutos. As fases foram separadas por centrifugação durante 10 minutos a $750 \times g$. A fase inferior (primeiro extrato) foi transferida para um frasco utilizando pipeta *Pasteur*. Uma segunda extração foi realizada utilizando 4 mL de metanol a 10% (v/v) em clorofórmio em vórtice por 2 minutos. Após centrifugação, a fase de clorofórmio foi adicionada ao primeiro extrato. O clorofórmio foi evaporado e o resíduo foi seco em estufa a 60 °C por 48 horas. O lipídio final foi quantificado gravimetricamente.

Os lipídios extraídos foram então submetidos à metilação pelo método de O'Fallon (O'FALLON et al., 2007), para obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). No extrato obtido pela extração Bligh-Dyer, foram adicionados 0,7 mL de KOH 10 mol/L e 5,3 mL de metanol e incubados a 55 °C por 1,5 h sob agitação. Após esse período, adicionou-se 0,58 mL de H₂SO₄ 12 mol/L e os tubos foram novamente incubados a 55 °C por 1,5 h sob agitação. Por fim, adicionou-se 3 mL de hexano, agitou-se a amostra em vórtex por 5 min e a fase superior foi recolhida para análise em cromatografia gasosa.

3.5.7 Caracterização do perfil lipídico

A caracterização do perfil lipídico foi feita em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa (CG/MS). A análise GC/MS foi realizada no instrumento Agilent GC 7890A acoplado ao detector MS Agilent 5975C. A coluna, uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Agilent) (30 m de comprimento x 250 µm id x 0,25 µm de espessura de filme composta por 5% de fenil-95% de metilpolissiloxano) foi conectada a um detector quadrupolo operando em EI (Electron Impact Ionization) a 70 eV e a varredura de massa variou de 40 a 550 m/z. O hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 1,2 mL/min.

As temperaturas do injetor (com modo *splitless*) e da interface foram de 300 °C. O atraso do solvente foi de 3,0 minutos. O volume de injeção foi de 1,0 µL com o amostrador automático Agilent GC Sampler 80 equipado com uma seringa de 10 µL. O programa de temperatura do forno consistiu em manter a 60 °C por 3 min, aumentar até 270 °C a 4 °C/min, manter por 2 min nesta temperatura, aumentar até 300 °C a 30 °C/min, mantendo-se nesta temperatura por 5 min. O tempo total de corrida foi de 63,5 min.

Os compostos foram identificados comparando seus espectros de massa com os do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, 2011). O índice de retenção linear foi calculado pelos tempos de retenção de n-alcenos injetados nas mesmas condições cromatográficas, utilizando a aproximação de Van den Dool e Kratz (BIZZO et al., 2020; VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963) conforme a Equação (12):

$$IRL = 100n \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{(t_{Rn+1} - t_{Rn})} \quad (12)$$

Onde:

t_{Rx} = Tempo de retenção dos componentes a serem analisados;

t_{RC_n} = Tempo de retenção do padrão que elui antes de x ;

$t_{RC_{n+1}}$ = Tempo de retenção do padrão que elui após x ;

n = Número de átomos de carbono do padrão que elui antes de x .

3.6 ANÁLISE DE DADOS

3.6.1 Parâmetros cinéticos de cultivo

Com os dados experimentais obtidos, foram calculados os parâmetros cinéticos por meio das equações apresentadas na Tabela 8. Consideraram-se parâmetros de conversão de substrato em biomassa e lipídio, conversão de nitrogênio em biomassa e de biomassa em lipídio, além da produtividade volumétrica global, que considera o tempo de cultivo, e do rendimento, que leva em conta a estequiometria da reação.

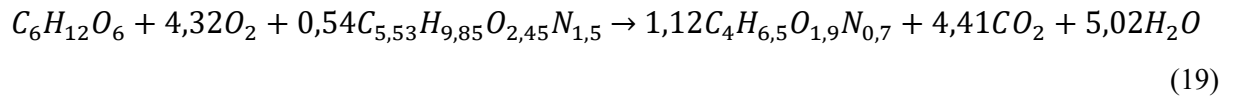
Tabela 8: Parâmetros cinéticos de cultivo, utilizados na análise dos cultivos submersos A e B.

Parâmetro	Equação	Unidade	Número da equação
Fator de conversão de substrato em células	$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$	g/g	(13)
Fator de conversão de substrato em produto	$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}$	g/g	(14)
Fator de conversão de biomassa em produto	$Y_{P/X} = \frac{P_f - P_i}{X_f - X_i}$	g/g	(15)
Fator de conversão de nitrogênio em biomassa	$Y_{X/N} = \frac{X_f - X_i}{N_i - N_f}$	g/g	(16)
Rendimento	$n = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S_{estq}}} \times 100$	%	(17)
Produtividade volumétrica global	$Q_p = \frac{P_f - P_i}{t}$	g/L.h	(18)

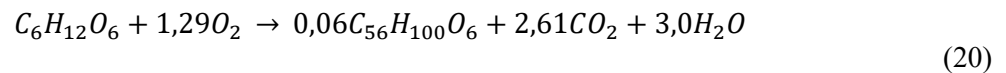
Onde: X = biomassa celular residual (g/L); P_f e P_i = concentração final e inicial de produto (g/L), respectivamente; S_f e S_i = Concentração final e inicial de substrato (g/L), respectivamente; t = tempo (h); $Y_{P/S_{estq}}$ = Fator de conversão estequiométrico de substrato em produto (gP/gS).

Para a estequiometria do cultivo, foram consideradas as equações (19) e (20). A Equação (19) apresenta a conversão de glicose em biomassa, na qual $C_6H_{12}O_6$ é a equação molecular para glicose, $C_{5.35}H_{9.85}O_{2.45}N_{1.5}$ é a equação molecular média para aminoácidos e $C_4H_{6.5}O_{1.9}N_{0.7}$ é a equação molecular para o fungo, conforme descrito por Babel e Muller para leveduras (BABEL; MÜLLER, 1985). Utilizou-se esta referência devido à ausência de estudo similar para fungos, sendo a composição celular de leveduras a mais semelhante encontrada na literatura.

Como fontes de nitrogênio, utilizaram-se extrato de levedura (Cultivos A e B) e nitrato de sódio (Cultivo B). Sendo o extrato de levedura a fonte majoritária de nitrogênio e estando este principalmente na forma de aminoácidos e peptídeos, considerou-se a equação molecular média dos aminoácidos (VIEIRA et al., 2016) na Equação (19).



Para a conversão de glicose em lipídio, foi considerada a Equação (20), apresentada a seguir. Nesta equação, $C_{56}H_{100}O_6$, é a equação molecular obtida por uma média ponderada de um triglicerídeo composto por cadeias de ácidos palmítico (24 %), esteárico (10 %), óleo (18 %) e linoleico (48 %), visando simular a composição observada no perfil lipídico do fungo estudado neste trabalho. A partir dos dados teóricos de conversão, calculou-se o rendimento do cultivo considerando a equação de conversão de glicose em lipídio.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS MICRORGANISMOS

4.1.1 Identificação pelo sequenciamento da região do ITS

A seleção dos fungos isolados na ilha Rei George, Antártida, e que fazem parte da coleção de fungos do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LAMB/UFSC) é descrita no trabalho de CHIARELLI (2022). Esta seleção foi realizada com base na morfologia desses microrganismos e, dos 91 microrganismos isolados, quatro exemplares foram identificados como prováveis fungos pertencentes à família *Mortierellaceae*. Tal conclusão ocorreu com base em características micro e macro morfológicas das linhagens. Estas apresentaram crescimento em halos e a coloração esbranquiçada, micélio cenocítico, esporângios terminais e hialinos, e os esporangióforos ramificados e de base alargada, que são traços típicos da família *Mortierellaceae* (WAGNER et al., 2013). Algumas dessas características podem ser observadas na Figura 14.

Figura 14: Microscopia optica (400X) da linhagem ACF038, mostrando o esporângio característico da família *Mortierellaceae*, corada com lactofenol e azul de algodão.



Fonte: (CHIARELLI, 2022)

As linhagens que apresentaram tais características foram selecionadas para este trabalho (ACF036, ACF037, ACF038 e ACF039) e foram subsequentemente submetidas à identificação através do sequenciamento do rDNA na região ITS (SCHOCH et al., 2012). A partir do alinhamento dessa região com o banco de dados do NCBI, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Identificação de linhagens de *Mortierellaceae* por sequenciamento da região ITS.

Linagem	Microrganismo mais próximo	Número GenBank	Identidade	<i>e-value</i>
ACF036	<i>Linnemannia sclerotiella</i> CBS 529.68	JX975988.1	94,06 %	5×10^{-86}
ACF037	<i>Mortierella antarctica</i> CBS 609.70	NR111580.1	99,32 %	$< 10^{-320}$
ACF038	<i>Linnemannia hyalina</i> CBS 223.35	NR163542.1	90,88 %	$< 10^{-320}$
ACF039	<i>Entomortierella parvispora</i> CBS 311.52	NR077185.1	80,70 %	2×10^{-113}

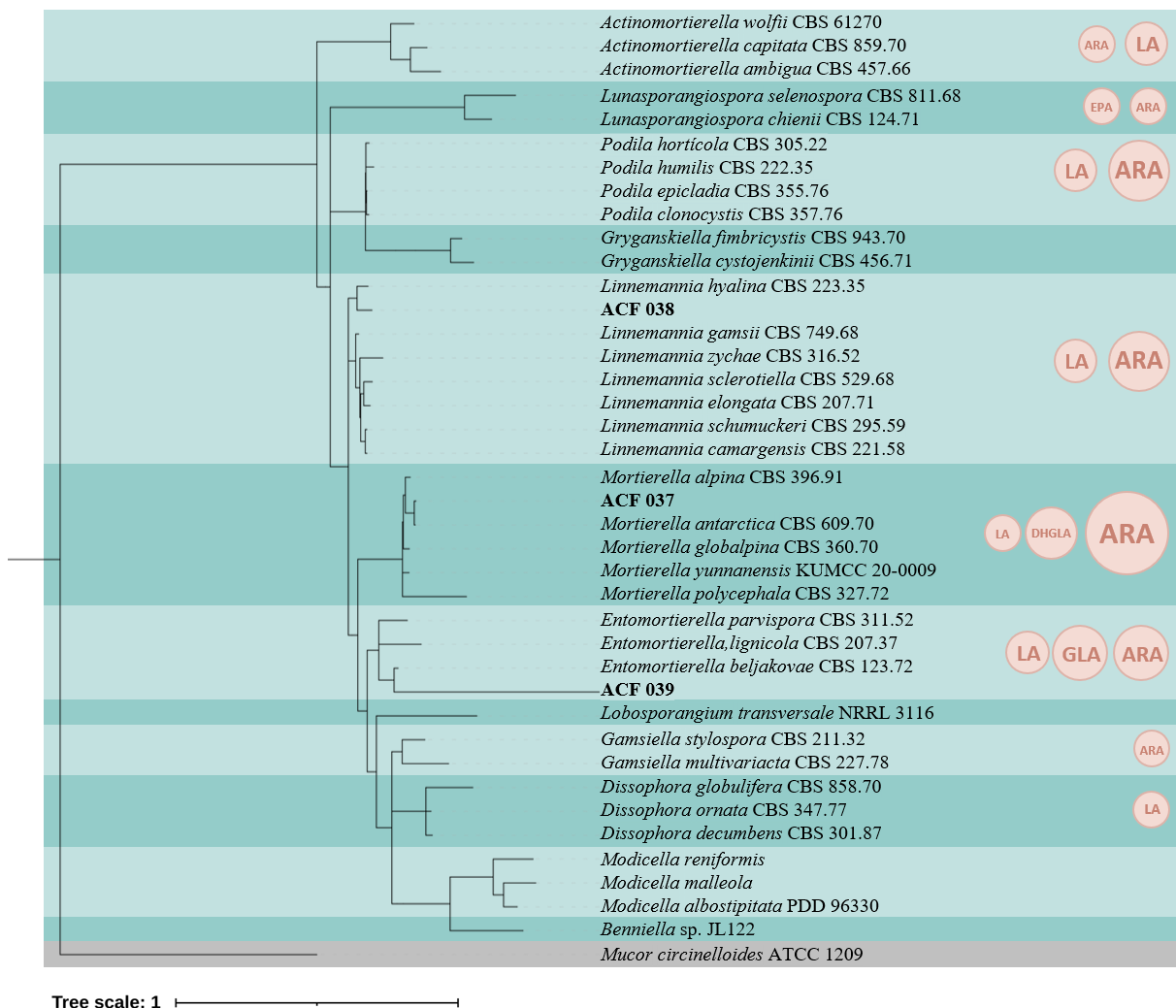
O alinhamento BLAST sugere que o isolado ACF037 provavelmente pertence à espécie *M. antarctica* (CBS 609.70, com 99,32 % de similaridade). Para as linhagens ACF036, ACF038 e ACF039, as espécies mais próximas, de acordo com o alinhamento da região ITS, foram *L. sclerotiella* (CBS 529.68, com identidade de 94,06 %), *L. hyalina* (CBS 223.35, com 90,88 % de identidade) e *E. parvispora* (CBS 311.52, com 80,70 % de identidade), respectivamente. A árvore filogenética com base nas sequências de ITS é apresentada na Figura 15. Os dados obtidos indicam que as linhagens ACF037, ACF038 e ACF039 agruparam com espécies já conhecidas pela produção de AGPIS, enquanto o agrupamento da linhagem ACF036 não foi resolutivo.

Dessa forma, selecionou-se as três linhagens com resolução de gênero para o dar continuidade ao trabalho. Estas três linhagens foram então cultivadas em meio estático (BDA) por 14 dias. A linhagem ACF039 foi cultivada também em caldo Infusão-Cérebro-Coração (BHI), alternativa rica em nutrientes para reativação de microrganismos. Contudo, nas condições testadas, não se desenvolveu e, portanto, não foi selecionada para o andamento do trabalho.

No trabalho de Wagner e colaboradores, uma extensa análise da filogenia da família *Mortierellaceae* foi realizada com base nas sequências da região ITS. Contudo, concluiu-se que, apesar de eficiente para grande parte das espécies, a região do espaçador interno transcrito não é suficiente para elucidar todas as espécies da família (WAGNER et al., 2013). Esta hipótese é sustentada pelo trabalho de Vandepol e colaboradores, no qual as sequências de *L.*

elongata e *L. gamsii* no trecho ITSf-LR5 compartilhavam 98 e 97%, respectivamente, de similaridade com *L. hyalina*, mesmo tratando-se de espécies diferentes. Tal observação reforça a possibilidade de que a diferença de identidade observada nesta etapa seja significativa a nível de linhagem ou espécie (VANDEPOL et al., 2020).

Figura 15: Arvore filogenética dos isolados utilizados nesse trabalho e de membros da família *Mortierellaceae* para a região ITS, contruída pelo método de máxima verossimilhança e modelo TPM3+F+G4, na ferramenta IQ-Tree. As cores alternadas indicam o agrupamento dos clados monofiléticos e as abreviaturas em círculos indicam os principais ácidos graxos produzidos por cada clado.



ARA: ácido araquidônico; LA: ácido linoleico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHGLA: ácido dihomog- γ -linolênico; GLA: ácido γ -linolênico. Os círculos indicam qualitativamente os principais ácidos graxos produzidos por cada gênero. Em negrito, destacam-se as linhagens utilizadas neste trabalho.

Fonte: Autora (2022).

A linhagem *L. sclerotiella* CBS 529.68 foi isolada na Ucrânia, a linhagem *L. hyalina* CBS 223.35 foi isolada na Alemanha e a linhagem *E. basiparvispora* CBS 311.52 foi isolada também na Alemanha. As localizações dos microrganismos mais próximos identificados pelo alinhamento BLASTn corroboram a hipótese de novas linhagens, visto que a distância entre o local do qual os microrganismos foram isolados, a Antártida, e os utilizados como referência, é superior a 15 000 km, sendo improvável que, dada tamanha distância, trate-se de uma mesma linhagem.

Dessa forma, a linhagem ACF038 foi selecionada para dar continuidade ao trabalho, por ser cultivável em laboratório e devido ao menor grau de identidade com linhagens já registradas, tendo em vista a busca por espécies, linhagens ou genes inéditos. A partir do resultado obtido pela identificação da região ITS, foi nomeada de *Linnemannia* sp. ACF038.

4.2 ANÁLISE FISIOLÓGICA DE CULTIVO

4.2.1 pH e concentração de glicose

Para análise dos parâmetros pH e concentração de glicose, cultivou-se a linhagem *Linnemannia* sp. ACF038 em meio contendo nitrato de sódio a 1 g de N/L como fonte de nitrogênio e temperatura de 25 °C, pois a família *Mortierellaceae* é predominantemente composta por linhagens mesófilas, que se desenvolvem melhor na faixa de 25 a 28 °C (RUISI et al., 2007; WAGNER et al., 2013). Os pHs variaram de 4 a 8 e a concentração de glicose de 20 a 40 g/L. Como resposta para a triagem de parâmetros, avaliou-se o diâmetro do halo de crescimento das colônias. A partir dessas respostas, foi realizada a análise estatísticas dos efeitos dos fatores e da superfície de resposta. O modelo estatístico usado é descrito pela Equação (21), na qual β são os coeficientes dos efeitos produzidos por cada um dos fatores, de forma linear (β_1 e β_2), quadrática (β_{11} e β_{22}) e de interação (β_{12}); x_1 é o fator pH e x_2 é o fator concentração de glicose (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_2 x_2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (21)$$

A Tabela 10 resume os diferentes pHs e concentrações de glicose utilizados no cultivo de *Linnemannia* sp. ACF038 e as respectivas respostas para cada ensaio, em função do halo de

crescimento (cm) e o valor percentual do crescimento em relação ao controle (Equação (1)). O crescimento radial, após 7 dias de cultivo, obtido nestes experimentos foi de 56,0 mm (Ensaio 3) a 74 mm (Ensaio 12), equivalentes a 62 e 82 %, respectivamente, em relação ao controle (BDA), que apresentou crescimento radial de 90 mm.

Tabela 10: Crescimento radial de *Linnemannia* sp. ACF038 em experimentos de planejamento composto central (NaNO₃ 1 g N/L, 25 °C).

Ensaio	pH	Glicose [g/L]	Crescimento [cm]	Resposta [%]*
1	4,6	23	7,51 ± 0,09	81
2	4,6	37	6,62 ± 0,03	77
3	7,4	23	5,60 ± 0,09	62
4	7,4	37	5,95 ± 0,10	66
5	4	30	6,90 ± 0,09	76
6	8	30	5,65 ± 0,14	63
7	6	20	7,10 ± 0,06	79
8	6	40	6,65 ± 0,16	73
9	6	30	7,30 ± 0,10	81
10	6	30	7,10 ± 0,09	79
11	6	30	6,85 ± 0,10	76
12	6	30	7,40 ± 0,09	82
Controle	-	-	9,00 ± 0,07	100

* Porcentagem de crescimento do ensaio em relação ao controle. Controle: BDA.

A influência dos fatores pH e concentração de glicose, no crescimento estático de *Linnemannia* sp. ACF038 foi estimado por meio da análise de significância estatística para cada um dos fatores e de sua interação, como mostrado no gráfico de Pareto (Figura 16). O maior efeito observado foi o pH, de forma linear, influenciando de forma negativa o crescimento nas condições avaliadas. Os demais fatores, como mostra a Figura 16, não foram estatisticamente significativos ao crescimento de *Linnemannia* sp. ACF038 nas condições avaliadas. A análise de variância (ANOVA) dos efeitos avaliados é apresentada na Tabela 11.

Figura 16: Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados ($p = 0,05$) de pH e concentração de glicose no cultivo de *Linnemannia* sp. ACF038

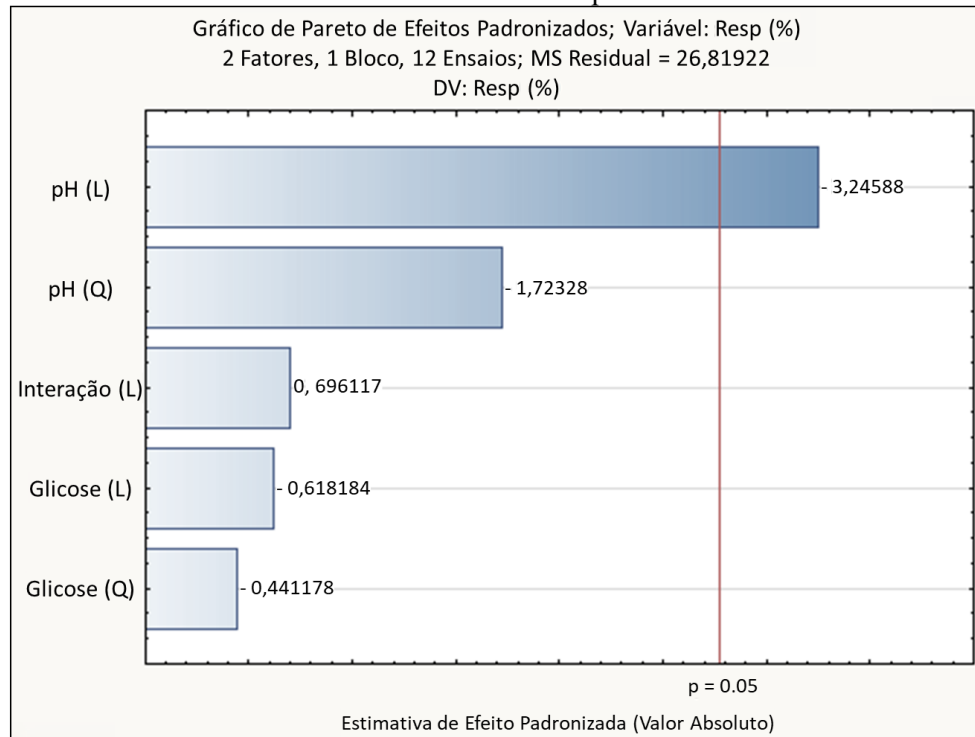


Tabela 11: ANOVA para os fatores pH e concentração de glicose no cultivo de *Linnemannia* sp. ACF038, utilizando MS residual.

Fator	SS	df	MS	F value	P value
pH (L)	2,2969	1	2,2969	10,5264	0,0315
pH (Q)	0,6475	1	0,6475	2,9675	0,1601
Glicose (L)	0,0833	1	0,0833	0,3819	0,5700
Glicose (Q)	0,0426	1	0,0426	0,1952	0,6814
Interação (L)	0,1056	1	0,1056	0,4840	0,5249
Erro	0,8728	4	0,2182		
Total SS	4,0488	9			

SS: Soma dos quadrados; DF: Graus de liberdade; MS: Média dos quadrados.

Contudo, ao considerar apenas o efeito do pH de forma linear, obter-se-ia um modelo linear, no qual o crescimento do microrganismo estudado seria inversamente proporcional ao pH. Ou seja, o menor pH possível seria indicado como ideal ao crescimento microbiano. Todavia, sabe-se que pHs demasiado ácidos (inferiores a 4), não são benéficos ao crescimento

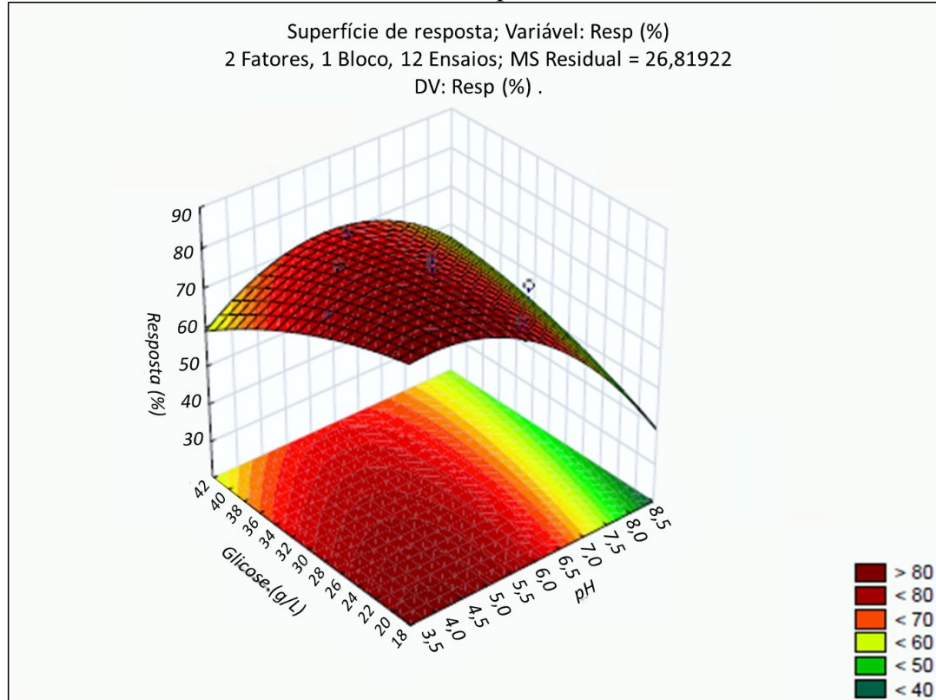
microbiano, apresentando papel inibitório (MAMANI et al., 2019). Com isso, optou-se por utilizar o modelo quadrático que considera todos os efeitos, apresentado na Equação (22).

$$y = 6,9304 - 0,4375x_1 - 0,1975x_1^2 - 0,1667x_2 - 0,1013x_2^2 + 0,3250x_1x_2 \quad (22)$$

Considerando o modelo acima, calculou-se a região de máximo, correspondente na faixa de valores ótimos de pH e concentração de glicose para situação estudada. Nesta análise, obteve-se a faixa de 5,3 a 5,8 para o fator pH e de 31 a 36 g/L para a concentração de glicose. Nestas condições, a resposta teórica seria de 65 a 71 mm de crescimento radial, ou seja, uma resposta de até 79 % de crescimento em relação ao controle.

Para o gráfico de superfície de resposta (Figura 17), que apresenta o perfil de crescimento de *Linnemannia* sp. ACF038 em função de pH e concentração de glicose, foi utilizado o modelo quadrático que considera todos os efeitos, descrito pela Equação (22).

Figura 17: Superfície de resposta para os efeitos de pH e concentração de glicose no cultivo de *Linnemannia* sp. ACF038.



De forma geral, o crescimento foi favorecido por pH na faixa de 5-6, com resposta média de 78,5 % de crescimento em relação ao controle. Este resultado é coerente com a literatura,

visto que fungos, em sua maioria, se desenvolvem melhor em pHs ácidos. Na pesquisa de Wu e colaboradores, onde *M. alpina* foi utilizada para a produção de ARA, o pH utilizado foi de 6,0 e produtividade do ácido graxo desejado foi de 1,8 g/L.d (WU et al., 2017). Com outra linhagem de *M. alpina*, Hwang e colaboradores (2005) alcançaram a produtividade de 1,5 g/L.d de ARA fixando o pH do cultivo em 5,5. O mesmo ocorre para outros estudos, como apresentado na Tabela 12 (HWANG et al., 2005). Considerando o resultado obtido da região ótima de trabalho (5,3 a 5,8) e as referências observadas na literatura, o pH fixado para os próximos experimentos foi de 5,5.

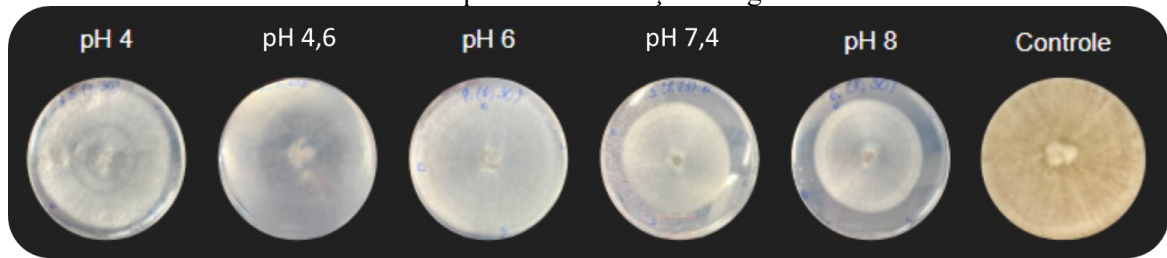
Quanto à concentração de glicose, visto que esta não apresentou efeito significativo ao cultivo, tomou-se como padrão para os próximos cultivos a concentração de 35 g/L. Valor este levemente superior ao ponto central dos ensaios (30 g/L), e dentro da faixa ótima encontrada, tendo em vista o objetivo de otimizar o cultivo, através da maior produção de biomassa e consequente maior consumo da fonte de carbono.

Tabela 12: Relação dos pHs utilizados para o cultivo de *M. alpina* e a produção de lipídios, conforme a literatura.

Linhagem	pH	Lipídios (g/L.d)	Referência
<i>M. alpina</i> R807	6,0	3,0	WU et al., 2017
<i>M. alpina</i> PRAO7-10	5,5	2,0	MALAIWONG et al., 2016
<i>M. alpina</i> R807	6,0	3,3	JI et al., 2014
<i>M. alpina</i> DSA-12	5,5	3,7	HWANG et al., 2005
<i>M. alpina</i> ME-AA01	6,0	3,1	LU et al., 2011
<i>Linnemannia sp.</i>	5,5	0,7	Este trabalho

Além do halo de crescimento, a morfologia das colônias (Figura 18) foi avaliada. Entre os ensaios, a morfologia foi análoga, apresentando colônia pouco densa, sendo possível visualizar o meio de cultura e o fundo posterior à placa. Em contrapartida, a cultura de controle apresentou estrutura densa, preenchendo a placa e impossibilitando a visualização através da cultura.

Figura 18: Morfologia das culturas de *Linnemannia* sp. ACF038 após 7 dias de cultivo a 25°C em diferentes pHs e concentrações de glicose.



Uma hipótese para que o fator “Concentração de Glicose” não apresentar significância estatística para o cultivo de *Linnemannia* sp. ACF038 é o de que outro fator, ainda não avaliado, foi limitante ao processo. A morfologia das colônias, apresentada na Figura 18, corrobora esta hipótese, visto que a cultura obtida no ensaio controle apresentou maior formação de micélio. Levantou-se, então, a suposição de que o nitrato de sódio, utilizado como fonte única de nitrogênio, estaria criando um ambiente salino e inóspito ao crescimento do fungo. Para elucidar esta questão, seguiu-se ao segundo bloco de experimentos, no qual avaliou-se as fontes e concentrações de nitrogênio.

4.2.2 Concentração e fonte de nitrogênio

Para o segundo bloco de ensaios, no qual avaliaram-se as fontes e concentrações de nitrogênio, o pH foi fixado em 5,5, conforme discutido no bloco anterior, a temperatura utilizada foi de 25 °C e concentração de glicose de 35g/L. Avaliaram-se como fontes de nitrogênio o nitrato de sódio, o diamônio fosfato, a ureia e o extrato de levedura, nas concentrações de 0,50, 0,75, 1,00 e 1,25 g de N/L. Para o ensaio controle, utilizou-se meio BDA para o cultivo. Com isso, os resultados em função do crescimento radial, tanto em cm quanto em porcentagem em relação ao controle (100 %), são apresentados na Tabela 13.

Os resultados de crescimento radial, apresentados na Figura 19, apontam um efeito inibitório da ureia, visto que o crescimento do fungo foi inversamente proporcional à concentração deste nutriente. Não há registro na literatura deste comportamento para linhagens da família *Mortierellaceae* em relação à ureia, sendo uma fonte de nitrogênio de baixo custo e comumente utilizada no cultivo de fungos e leveduras (LU et al., 2011). Contudo, para esta linhagem, o efeito inibitório da ureia foi significativo, como mostram a Figura 19 e a Figura 20.

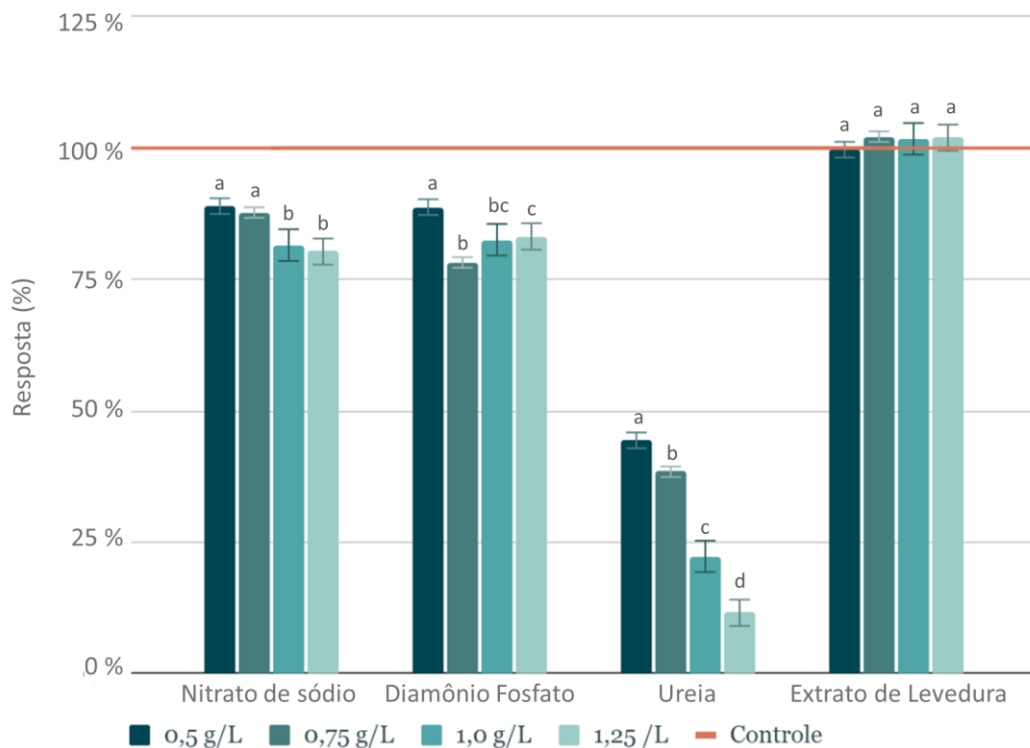
Tabela 13: Crescimento radial de *Linnemannia* sp. ACF038 em experimentos de fatorial completo para diferentes fontes e concentrações de nitrogênio (Glicose 35 g/L, pH 5,5, 25 °C). Controle: BDA.

Ensaio	Fonte de N	Nitrogênio [g/L]	Crescimento [cm]	Resposta [%]*
1	NaNO ₃	0,50	7,20 ± 0,08	89
2	NaNO ₃	0,75	7,10 ± 0,06	88
3	NaNO ₃	1,00	6,60 ± 0,09	82
4	NaNO ₃	1,25	6,50 ± 0,12	80
5	DAP	0,50	7,20 ± 0,12	89
6	DAP	0,75	6,30 ± 0,19	78
7	DAP	1,00	6,70 ± 0,18	83
8	DAP	1,25	6,70 ± 0,13	83
9	Ureia	0,50	3,60 ± 0,15	44
10	Ureia	0,75	3,10 ± 0,20	38
11	Ureia	1,00	1,80 ± 0,41	22
12	Ureia	1,25	0,95 ± 0,06	12
13	YE	0,50	8,05 ± 0,09	100
14	YE	0,75	8,25 ± 0,15	102
15	YE	1,00	8,20 ± 0,26	102
16	YE	1,25	8,25 ± 0,20	102
Controle	-	-	8,10 ± 0,18	100

* Porcentagem de crescimento do ensaio em relação ao controle.

Entre o nitrato de sódio e o diamônio fosfato, observou-se uma sutil diferença significativa entre as respostas, tendo as menores concentrações apresentado um melhor resultado de crescimento radial. No trabalho de Lu e colaboradores, foram testadas diferentes fontes de nitrogênio para o cultivo de *M. alpina*. Entre as fontes inorgânicas, o nitrato de sódio teve o melhor resultado, com 12,2 g/L de lipídios após 168 h de cultivo. Neste mesmo estudo, a ureia apresentou bons resultados, com crescimento celular de 25,7 g/L, sendo 70 % de fração lipídica, comportamento divergente ao observado neste trabalho, o que enfatiza a necessidade de estudo sobre as diferentes espécies da família *Mortierellaceae* (LU et al., 2011)

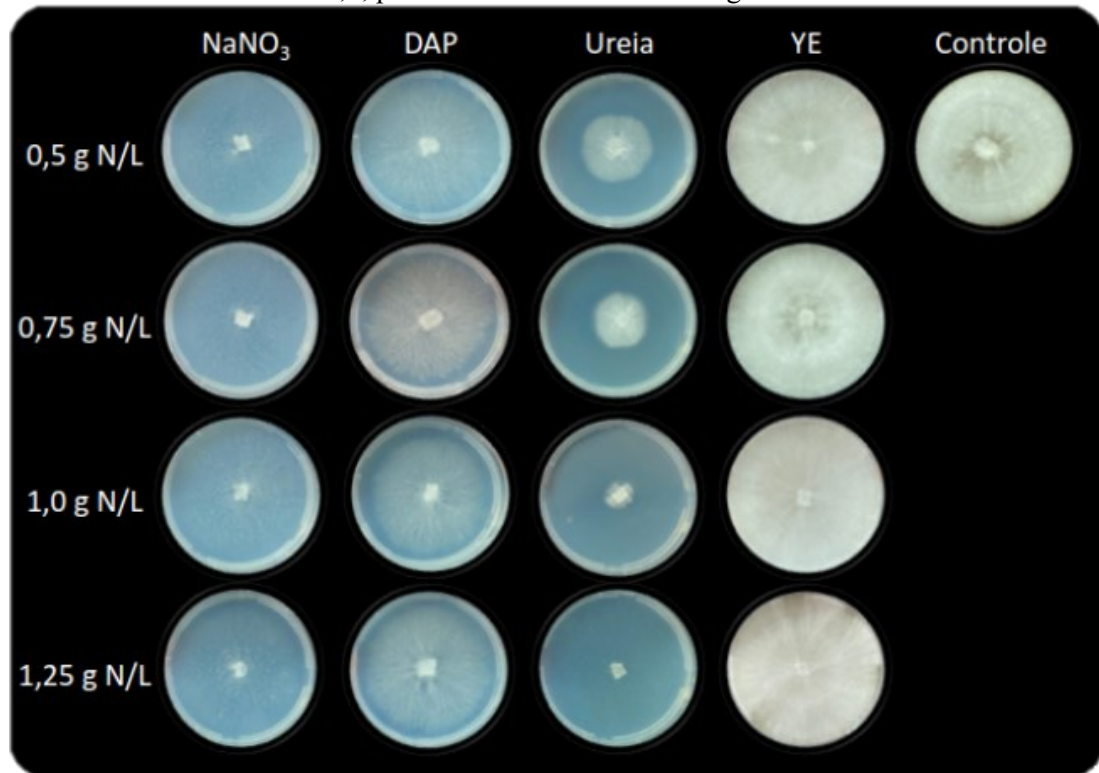
Figura 19: Resposta do crescimento radial, em relação ao ensaio controle, no cultivo de *Linnemannia* sp. ACF038 a 25°C, pH 5,5, 35 g/L de glicose e diferentes fontes e concentrações de nitrogênio.



Por fim, o resultado que se destacou foi o obtido pelo uso do extrato de levedura (YE) como fonte de nitrogênio. Por tratar-se de uma fonte complexa, além de nitrogênio, o extrato de levedura fornece vitaminas e minerais, favorecendo o desenvolvimento da biomassa. Quanto às concentrações utilizadas, não houve diferença significativa. Em relação às diferentes fontes de nitrogênio, o YE apresentou os melhores resultados em relação ao crescimento radial e, para além deste, destacou-se também na morfologia obtida pela cultura, como mostra a Figura 20.

Nota-se pela Figura 20 que o perfil morfológico das colônias em YE foi semelhante ao observado na cultura controle, com BDA. Qualitativamente, observou-se uma diferença significativa na densidade das colônias em YE quando comparadas aos demais ensaios. As colônias com menor densidade foram as observadas em nitrato de sódio, na qual a medida do crescimento radial foi feita contra a luz, para que o halo de crescimento fosse observado. Em diamônio fosfato, a densidade observada foi superior, porém, a colônia ainda apresentava translucidez, sendo possível observar a cor do meio de cultura. Em contrapartida, as culturas em YE formaram-se de forma densa, tornando a placa opaca e impossibilitando a visualização do meio de cultura.

Figura 20: Morfologia das culturas de *Linnemannia* sp. ACF038 após 7 dias de cultivo a 25 °C e pH 5,5, para diferentes fontes de nitrogênio.



NaNO₃ – Nitrato de sódio; DAP – Diamônio Fosfato; YE – Extrato de Levedura ; Controle – Batata-Dextrose-Ágar.

A análise qualitativa da morfologia é importante pois, visando um cultivo em meio líquido para a produção de lipídios, é necessário que o microrganismo cresça de forma abundante, visto que se trata de um produto intracelular. Logo, conclui-se que, para o crescimento abundante do fungo estudado, o extrato de levedura se mostrou como a melhor fonte de nitrogênio. Esta também foi a fonte utilizada por outros autores para a produção de PUFAs por *M. alpina*, *Umbelopsis isabellina* e *L. elongata* (OROZCO COLONIA; VINÍCIUS DE MELO PEREIRA; SOCCOL, 2020).

4.2.3 Temperatura

No terceiro bloco de ensaios para a análise fisiológica da linhagem, investigou-se o efeito do fator temperatura no cultivo de *Linnemannia* sp. ACF038. Foram testadas três temperaturas: 20, 25 e 37 °C. Os ensaios foram realizados em meio sintético descrito na Tabela 4, com 35 g/L de glicose, pH 5,5 e extrato de levedura 10 g/L (1 g de N/L). Para os ensaios controle, utilizou-se meio BDA, incubado às mesmas condições de temperatura que os demais

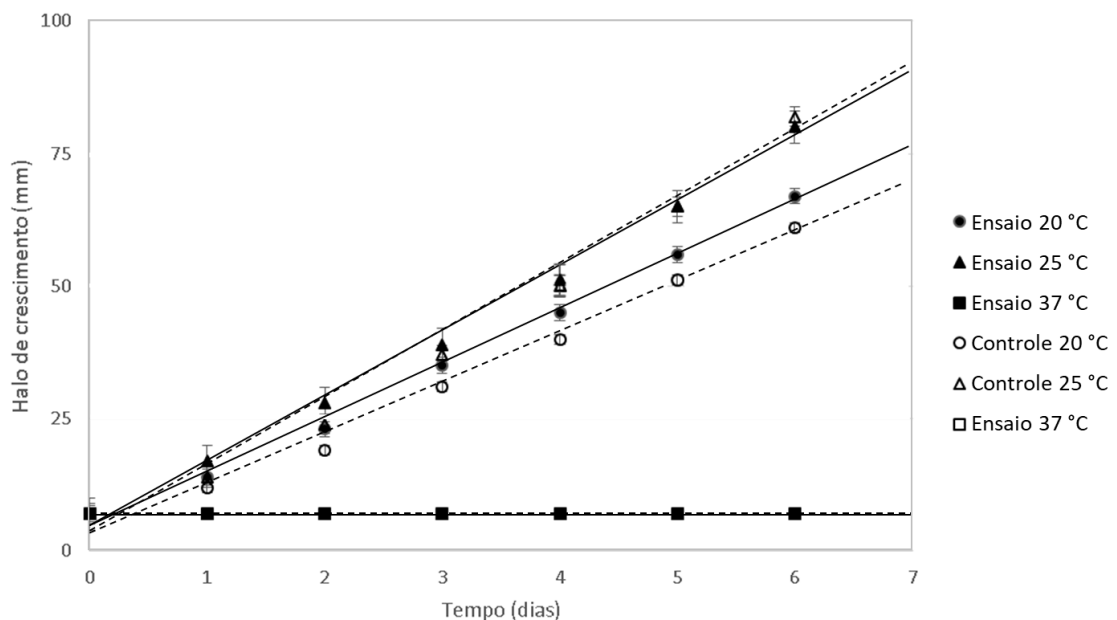
ensaios. A Figura 21 apresenta a cinética de crescimento para os ensaios, em crescimento radial (mm), nas diferentes temperaturas testadas. Ressalta-se que, para a resposta em porcentagem, tomou-se por referência o crescimento radial da cultura cultivada em BDA e inoculada em mesma temperatura que o ensaio. Os resultados obtidos nestes experimentos são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Crescimento radial de *Linnemannia* sp. ACF038 em diferentes temperaturas (YE 1 g N/L, pH 5,5, 35 g/L de glicose).

Ensaio	Temperatura [°C]	Crescimento [cm]	Resposta [%]*
1	20	6,65 ± 0,30	110
2	25	8,00 ± 0,15	98
3	37	0,70 ± 0,05	100
Controle 1	20	6,05 ± 0,19	100
Controle 2	25	8,15 ± 0,09	100
Controle 3	37	0,70 ± 0,05	100

* Porcentagem de crescimento do ensaio em relação ao controle. Controle: BDA.

Figura 21: Cinética de crescimento radial, em mm de halo, para diferentes temperaturas (condições: YE 1 g N/L; pH 5,5; 35 g/L de glicose).



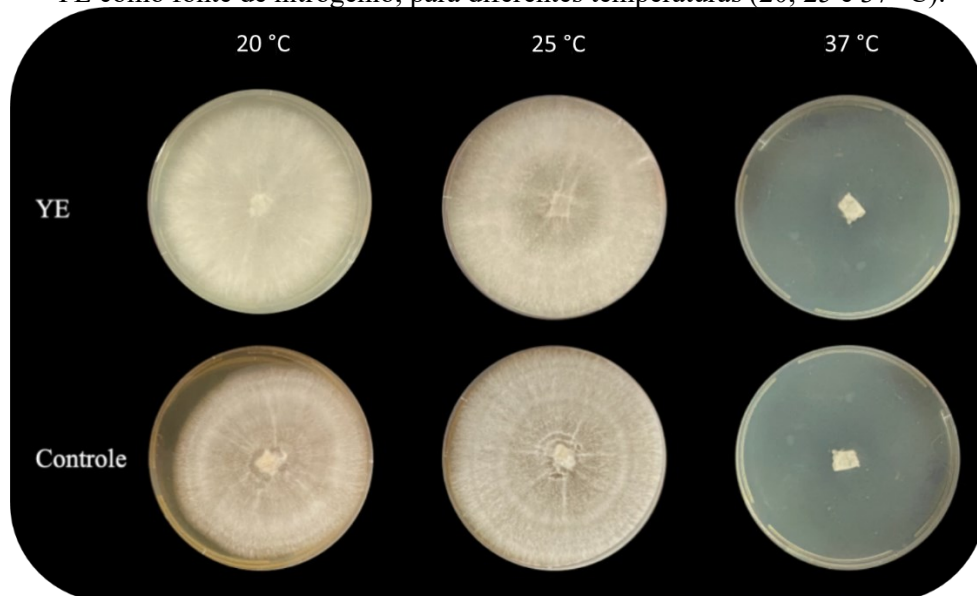
Controle: Batata-Ágar-Dextrose.

Observa-se que não houve crescimento do microrganismo à temperatura de 37 °C, o que sugere que o fungo não seja patogênico a animais de sangue quente. Fato que corrobora o artigo

de Wagner e colaboradores, que relatam somente um caso de infecção por representantes dessa família em bovinos (WAGNER et al., 2013).

Para temperaturas mais amenas, observou-se uma resposta de crescimento 19,5 % superior do ensaio à 25 °C em relação ao cultivo à 20 °C. Para o controle (BDA), este aumento foi de 34,6 %. À temperatura de 20 °C, o ensaio com meio sintético foi 10 % superior ao controle, contudo, para as demais temperaturas testadas, não houve diferença significativa.

Figura 22: Morfologia das culturas de *Linnemannia* sp. ACF038 após 7 dias de cultivo com pH 5,5 e YE como fonte de nitrogênio, para diferentes temperaturas (20, 25 e 37 °C).



Quanto à morfologia, houve uma sutil diferença entre as colônias controle e os ensaios com YE. Como é possível observar na Figura 22, a formação de halos nas colônias, característico da família *Mortierellaceae*, são mais explícitos nos controles (meio BDA). Contudo, não houve diferença quanto à densidade das colônias, em de cada temperatura. Tanto para o controle quanto para o meio sintético, formaram-se culturas densas e robustas, tornando a placa opaca.

Este resultado é coerente com a literatura, que utiliza a faixa de 23 a 28 °C para o cultivo de espécies da família *Mortierellaceae*. Jin e colaboradores utilizaram *M. alpina* para a produção de ácido araquidônico na temperatura de 23 °C e obtiveram ótimos resultados, com produtividade de 1,8 g de ARA/L.d (JIN et al., 2008). Utilizando temperatura de 25 °C, Ji e colaboradores obtiveram 1,3 g de ARA/L.d utilizando outra linhagem de *M. alpina* (JI et al., 2014b). Temperaturas mais elevadas, como 28 °C foram testadas por Higashiyama e

colaboradores e a produtividade de ARA alcançada foi de 0,4 g/L.d (HIGASHIYAMA et al., 1998). Com isso, a temperatura escolhida para as próximas etapas foi de 25 °C.

Tabela 15: Relação entre diferentes temperaturas e a produção de ácido araquidônico por *M. alpina* encontrados na literatura.

Linhagem	Temperatura	Lipídios (g L⁻¹d⁻¹)	Referência
<i>M. alpina</i> ME-1	23	2,4	JIN et al., 2008
<i>M. alpina</i> R807	25	3,0	WU et al., 2017
<i>M. alpina</i> R807	25	1,6	YU et al., 2018
<i>M. alpina</i> PRAO7-10	25	2,0	MALAIWONG et al., 2016
<i>M. alpina</i> R807	25	3,1	JI et al., 2014a
<i>M. alpina</i> DSA-12	25	1,9	HWANG et al., 2005
<i>M. alpina</i> 1S-4	28	1,0	HIGASHIYAMA et al., 1998
<i>Linnemannia</i> sp. ACF038	25	0,7	Este trabalho

4.3 CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR

4.3.1 Parâmetros de processo

Os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos cultivos submersos estão apresentados na Tabela 16. Da biomassa obtida (X_T), descontou-se o teor de lipídios para obtenção da biomassa residual (X), como detalhado no Item 3.5.1. Reitera-se que foi com base nesta biomassa residual que os cálculos de conversão foram realizados.

O crescimento celular do microrganismo aumentou em 46 % nas condições do cultivo B em relação ao cultivo A, indicando eficiência nas alterações de composição de meio realizadas entre os cultivos. O aumento da concentração de glicose é o principal fator para o aumento do crescimento celular. Ressalta-se que o cultivo B recebeu, além do extrato de levedura como fonte de nitrogênio, também o nitrato de sódio na concentração de 3 g/L.

A adição de um sal de nitrato baseou-se no estudo de Yu e colaboradores que, através de análises ômicas, concluíram que o nitrato ativa as vias metabólicas do carboidrato, particularmente na via fosfato-pentose, induzindo o acúmulo de lipídios. Além disso, o sal promoveu a atividade enzimática da ME e da IDH. A regulação adequada dessas vias e das

enzimas citadas aumenta o poder de redução para a síntese de AGPIs e promove a eliminação das espécies reativas de oxigênio, evitando a oxidação das gotículas de lipídios (YU et al., 2018).

Tabela 16: Parâmetros de processo para os cultivos A e B de *Linnemannia* sp. ACF038.

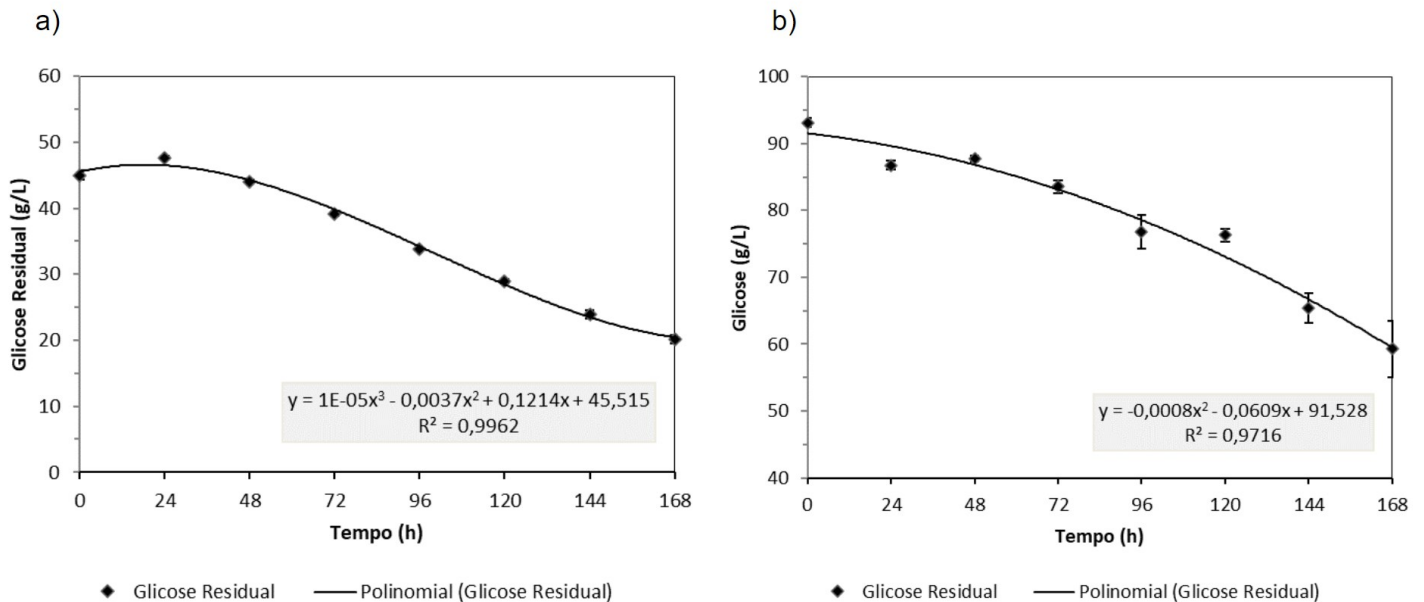
	Cultivo A	Cultivo B
Biomassa total inicial (X_{T0}) [g/L]	1,21 ± 0,06	1,12 ± 0,2
Biomassa residual inicial (X_0) [g/L]	0,92 ± 0,06	0,85 ± 0,2
Biomassa total final (X_{TF}) [g/L]	9,78 ± 1	15,22 ± 1
Biomassa residual final (X_F) [g/L]	6,86 ± 1	10,04 ± 1
Lipídio inicial (P_0) [g/L]	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,01
Lipídio final (P_F) [g/L]	2,92 ± 0,01	5,18 ± 0,08
Teor de ácido linoleico (%)	37,2 ± 2	41,8 ± 2
Glicose inicial (S_0) [g/L]	47,70 ± 0,7	93,10 ± 0,7
Glicose final (S_F) [g/L]	20,14 ± 0,6	59,30 ± 0,4
Glicose consumida (g/L)	27,56 ± 1,3	33,80 ± 1,1
Consumo de glicose (%)	57,78 ± 2	36,31 ± 4
Nitrogênio inicial (N_0) [g/L]	1,46 ± 0,09	2,57 ± 0,03
Nitrogênio final (N_F) [g/L]	1,06 ± 0,09	1,97 ± 0,03
Nitrogênio consumido [g/L]	0,40 ± 0,2	0,60 ± 0,06
Conversão de glicose em biomassa ($Y_{X/S}$) [gX/gS]	0,216	0,272
Conversão de nitrogênio em biomassa ($Y_{X/N}$) [gX/gN]	14,80	15,38
Conversão de glicose em lipídio ($Y_{P/S}$) [gP/gS]	0,095	0,145
Conversão de biomassa em produto ($Y_{P/X}$) [gP/gX]	0,574	0,684
Rendimento de biomassa [%]	36,6	46,1
Rendimento lipídico [%]	36,6	70,2
Rendimento LA [%]	13,7	27,9
Produtividade lipídios [mg/L.d]	375	702
Produtividade LA [mg/L.d]	112	293

Cultivos A e B: diferentes composições, conforme descrito na Tabela 6.

Outros autores também utilizam extrato de levedura e nitrato de sódio como fontes de nitrogênio, a exemplo de Wu e colaboradores, que utilizaram uma estratégia de alimentação de glicose por pulsos para a produção de AGPIs por *M. alpina*, com produtividade de 3,0 g/L.d de lipídios (WU et al., 2017). Com produtividade de 2,4 g/L.d de lipídios, Jin e colaboradores também utilizaram a combinação de YE e NaNO₃, em concentrações similares, 11 e 3,4 g/l, respectivamente, para a produção de AGPIs por *M. alpina* (JIN et al., 2008).

Por conseguinte, aumentou-se também a concentração de glicose no meio, para que houvesse mais substrato disponível ao microrganismo. Assim, a concentração inicial de glicose no cultivo A foi de 45 g/L, enquanto a do cultivo B foi de 90 g/L. Esperava-se que a maior disponibilidade de açúcar impulsionasse o crescimento celular e o acúmulo de lipídios, como observado por Ji e colaboradores (2014). Isso ocorreu, mas de forma sutil, aumentando em apenas 6 g/L o teor de glicose consumido. O perfil de consumo de glicose para os cultivos A e B são apresentados na Figura 23 (a) e (b), respectivamente. Os dados receberam ajuste polinomial, conforme as equações apresentadas nas figuras.

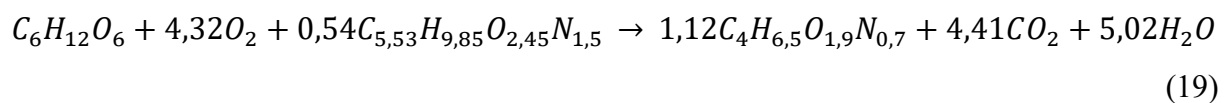
Figura 23: Perfil de consumo de glicose para (a) o cultivo A (b) o cultivo B



Nesse aspecto, é importante considerar as condições em que o microrganismo foi isolado, de um ambiente extremo quanto à temperatura, e oligotrófico quanto à disponibilidade de carbono e nutrientes. Dessa forma, é coerente que a linhagem não apresente, de forma

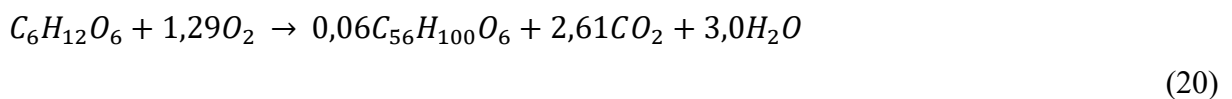
imediate, alta taxa de consumo de glicose. Todavia, este é um parâmetro que pode ser estudado e otimizado, através do melhoramento da linhagem (MELO et al., 2014).

Para melhor compreensão do perfil de consumo, avaliou-se a estequiometria da equação para determinar a conversão teórica. A estequiometria da conversão de glicose em biomassa é a apresentada pela Equação (19) (BABEL; MÜLLER, 1985; VIEIRA et al., 2016). Através de um balanço de massa, calculou-se que um mol de glicose ($C_6H_{12}O_6$, 180 g/mol) gera 1,12 mol de biomassa ($C_4H_{6,5}O_{1,9}N_{0,7}$, 94,7 g/mol). Logo, a conversão teórica de glicose em biomassa é de 0,59 g X/g S.



Assim, calculou-se o rendimento celular do cultivo, como detalhado no Item 3.6.1. Considerou-se a equação de conversão de glicose em biomassa para o cálculo do rendimento. Desse modo, obteve-se um aumento de rendimento de 36,6 para 46 % do cultivo A para o cultivo B, apontando que o crescimento celular ocorreu de forma mais eficiente em B.

Tratando-se da conversão de glicose em lipídios, utiliza-se a Equação (20), que considera um triacilglicerol ($C_{56}H_{100}O_6$) contendo cadeias de ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico, conforme perfil observado no cultivo do microrganismo estudado. Este perfil lipídico é detalhado no Item 4.3.4. Avaliando-se a equação de forma análoga à anterior, obtém-se que a conversão teórica de glicose em lipídio é de 0,21 g P/g S.



Dessa forma, é possível calcular o rendimento lipídico do cultivo, como detalhado no Item 3.6.1. Considerou-se a equação de conversão de glicose em lipídio para o cálculo do rendimento. Desse modo, obteve-se um aumento de rendimento de 46 para 70 % do cultivo A para o cultivo B, apontando que a conversão de lipídios ocorreu de forma mais eficiente em B. A partir desses resultados, supõe-se que a estratégia de utilizar batelada alimentada como modo de operação apresenta potencial de melhoria dos resultados de acúmulo lipídico. A batelada alimentada é uma estratégia amplamente utilizada para o cultivo de microrganismos oleaginosos, pois permite que os nutrientes sejam adicionados ao meio em momentos

determinados. Logo, há maior controle da concentração de nutrientes, possibilitando controlar principalmente a relação C/N, que rege a mudança entre a fase de crescimento e a fase de acúmulo (CHRISTOPHE; FONTANILLE; LARROCHE, 2019).

Wu e colaboradores utilizaram a estratégia de batelada alimentada no cultivo de *M. alpina*. Nesta abordagem, foi realizada uma batelada inicialmente com 20 g/L de glicose, alimentada por pulsos de solução 500 g/L de glicose para que a fonte de carbono fosse mantida entre 5 e 20 g/L. Como resultado, o teor de lipídios alcançou 22,2 g/L, 25,8 % superior ao controle (WU et al., 2017).

Ji e colaboradores buscaram uma operação próxima a um sistema contínuo no cultivo de *M. alpina*. A pesquisa foi realizada em duas etapas: a primeira, com a otimização de uma batelada alimentada, utilizando diferentes concentrações de glicose no meio. Nesta etapa, a produtividade em termos de teor lipídico passou de 2,2 g/L.d em uma batelada simples, com 80 g/L inicial de glicose), para 3,1 g/L.d através de uma batelada alimentada, com 25 g/L de glicose inicial e glicose residual mantida entre 5 e 10 g/L. A segunda etapa do trabalho buscou, através da repetição de uma batelada alimentada em quatro ciclos consecutivos, assemelhar-se a um sistema contínuo. Cada ciclo teve duração de 5 dias, assim como a batelada alimentada. Todavia, diferente desta, apenas um inóculo, com duração de 6 dias, foi necessário para todos os ciclos. Isto é, a operação em batelada alimentada repetida totalizou 26 dias de cultivo, enquanto quatro ciclos de batelada convencional levariam, no mínimo, 40 dias (JI et al., 2014b).

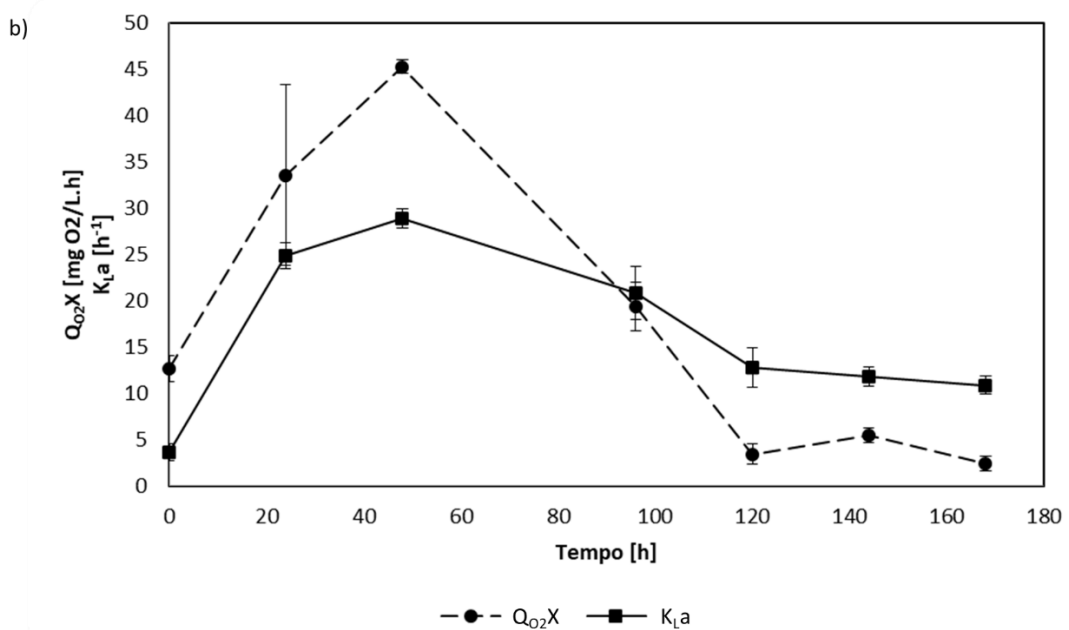
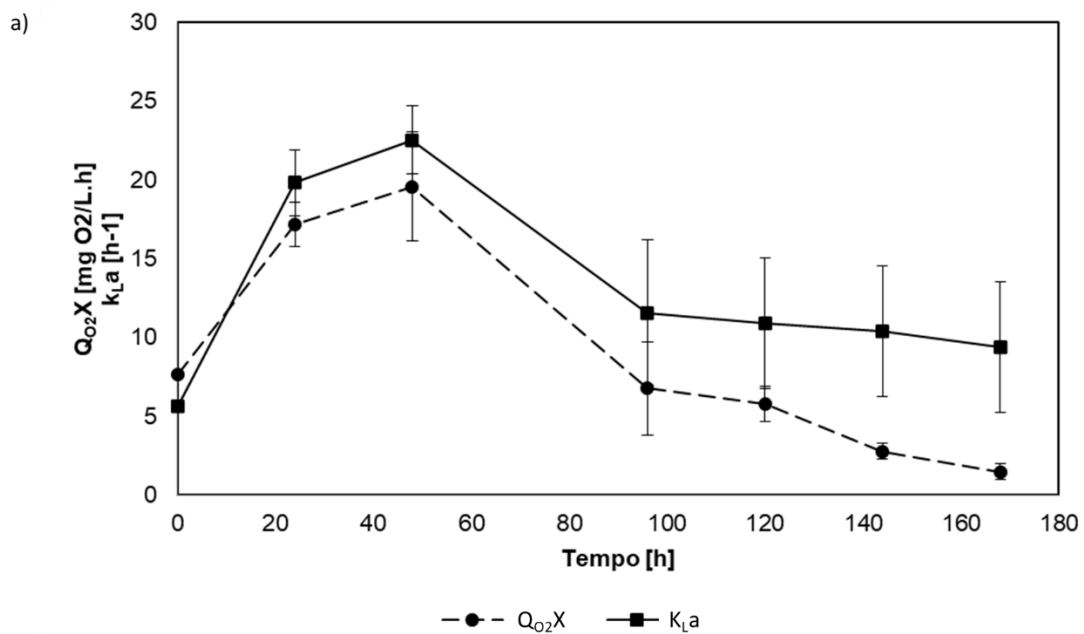
4.3.2 Perfil de velocidade de consumo de oxigênio e do coeficiente de transferência de oxigênio

Como estratégia de cultivo, optou-se pelo controle da saturação de oxigênio no meio em 30 %, conforme descrito por Ji e colaboradores (JI et al., 2014b). Para isso, definiu-se que o controle de agitação e aeração ocorresse de forma automática. Consequentemente, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio não foi constante e seu valor foi determinado através do método dinâmico, conforme descrito no Item 573.5.4.

Devido às características morfológicas do fungo, o perfil de crescimento não pôde ser obtido através da biomassa seca (somente inicial e final com elevado volume de amostragem), pois as amostras se mostraram heterogêneas e irregulares devido à aderência das hifas nas extremidades do biorreator. Todavia, o perfil de respiração é um indicador do perfil de crescimento, pois a velocidade específica de consumo de oxigênio é diretamente proporcional

à velocidade específica de crescimento celular (BONAN et al., 2020). Dessa forma, estima-se que a velocidade máxima de crescimento do microrganismo tenha sido atingida próxima às 48 h de cultivo, momento em que foram registradas as maiores velocidades de respiração. Para o cultivo A, este valor foi de 19,6 mgO₂/L.h e para o cultivo B, a máxima velocidade de consumo de oxigênio foi de 45,3 mgO₂/L.h, também após 48 h de processo. A Figura 24 apresenta os dados de Q_{O₂X} e do k_La para os cultivos A e B.

Figura 24: Perfil da velocidade de consumo de oxigênio e Perfil do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para o cultivo A (a) e para o cultivo B (b).



O aumento da demanda de oxigênio no cultivo B, em comparação ao cultivo A, pode ser devido a dois fatores. Primeiramente, ao crescimento celular, que, como mostra a Equação (19), consome oxigênio para a produção de biomassa. Este crescimento, por sua vez, foi 33 % maior no cultivo B, devido à maior disponibilidade de açúcar e nitrogênio. O segundo ponto para o aumento da taxa de respiração, é o acúmulo de ácidos graxos poli-insaturados. A síntese desses lipídios é mediada pelo oxigênio na etapa de dessaturação, como é detalhado no item 2.4.1 e pode ser observado na Equação (20), de conversão de glicose em lipídios. Na dessaturação, a $\Delta 9$ dessaturase requer uma molécula de oxigênio para converter uma molécula de ácido esteárico em ácido oleico, e o mesmo ocorre na conversão de ácido oleico em ácido linoleico e nas demais etapas de dessaturação, como mostra a Figura 9 (Item 2.4.1). Portanto, se o oxigênio for limitante no meio durante a fase de acúmulo de lipídios, o grau de saturação dos lipídios será maior (CHRISTOPHE; FONTANILLE; LARROCHE, 2019).

A via de biossíntese de lipídio é bastante similar para os microrganismos oleaginosos de diferentes gêneros e o perfil lipídico dependerá das enzimas produzidas por cada linhagem e das condições de cultivo. Para *Rhodotorula gracilis*, a diminuição dos ácidos esteárico (C18:0) e oleico (C18:1 n6) e aumento de PUFAs foram observados quando a concentração de oxigênio dissolvido aumentou (CHOI; RYU; RHEE, 1982). Em espécies de *Mortierellaceae*, o comportamento foi similar e o aumento da saturação também foi observado com a limitação de oxigênio por Lu e colaboradores em uma análise metabolômica da atuação do oxigênio no acúmulo lipídico em condições de limitação de nitrogênio (LU et al., 2021). Contudo, o fornecimento excessivo de oxigênio pode ser prejudicial ao acúmulo de lipídios, podendo acumular radicais de oxigênio (ROS) e oxidar os lipídios poli-insaturados (LIU et al., 2015), o que foi evitado neste trabalho, no qual manteve-se a 30 % o teor de oxigênio disponível no meio.

Com o crescimento celular, a formação de *pellets* filamentosos e a produção de polissacarídeos extracelulares durante o cultivo de fungos (WU et al., 2017), aumentam a viscosidade do meio e reduzem, conseqüentemente, o k_{LA} (SUN et al., 2018). Logo, faz-se necessário o ajuste do k_{LA} para obtenção de uma taxa de transferência de oxigênio adequada à alta demanda de oxigênio pelo crescimento no caldo mais viscoso.

Qu e colaboradores utilizaram o k_{LA} como parâmetro para melhorar seus resultados durante o aumento de escala do cultivo de *Shizochytrium* sp. para a produção de DHA. Com estratégia de modelagem, chegou-se a um k_{LA} de 89 h^{-1} , que permitiu escalonar um cultivo de

bancada em frascos (500 mL), para projetos piloto de 1500 e 7000 L na produção de DHA (QU; REN; HUANG, 2013).

Dados de k_{LA} para o cultivo de microrganismos da família *Mortierellaceae* são escassos na literatura. Como referência, tem-se o trabalho de Peng e colaboradores, que utilizou este parâmetro para avaliar a eficiência da adição de n-hexadecano no aumento da disponibilidade de oxigênio no meio durante o cultivo de *M. alpina*. No estudo, o k_{LA} de controle – sem a adição de n-hexadecano – foi de 29 h^{-1} . Com o suprimento de 4 % do aditivo, obteve-se o aumento do k_{LA} para 76 h^{-1} , aumentando conseqüentemente a produção de lipídios em aproximadamente 25 %, devido à maior disponibilidade de oxigênio (PENG et al., 2010a).

No presente trabalho, obteve-se os maiores valores de k_{LA} em 48 h de cultivo, coincidindo com os maiores valores de QO_2X e reforçando a hipótese de que a fase exponencial de crescimento ocorreu entre 24 e 48 h. Para o cultivo A, o valor máximo de k_{LA} foi de $22,5 \text{ h}^{-1}$ e para o cultivo B, foi de $28,9 \text{ h}^{-1}$. Comparando aos valores ao controle utilizado no trabalho de Peng e colaboradores, o coeficiente volumétrico encontrado é coerente, visto que nenhuma estratégia de intensificação desse parâmetro foi adotada.

Ou seja, a transferência de oxigênio no meio foi suficiente ao crescimento celular e acúmulo lipídico pelo microrganismo. Contudo, maiores valores de k_{LA} podem levar a um aumento no acúmulo lipídico, através da maior disponibilidade de oxigênio. Os resultados deste trabalho servirão como base para estudos futuros visando escalonamento de processo. O parâmetro k_{LA} pode ser controlado através da agitação e aeração do meio e pode ser otimizado por modelagem matemática, respeitando as limitações morfológicas do fungo.

4.3.3 Análise qualitativa da produção de lipídios

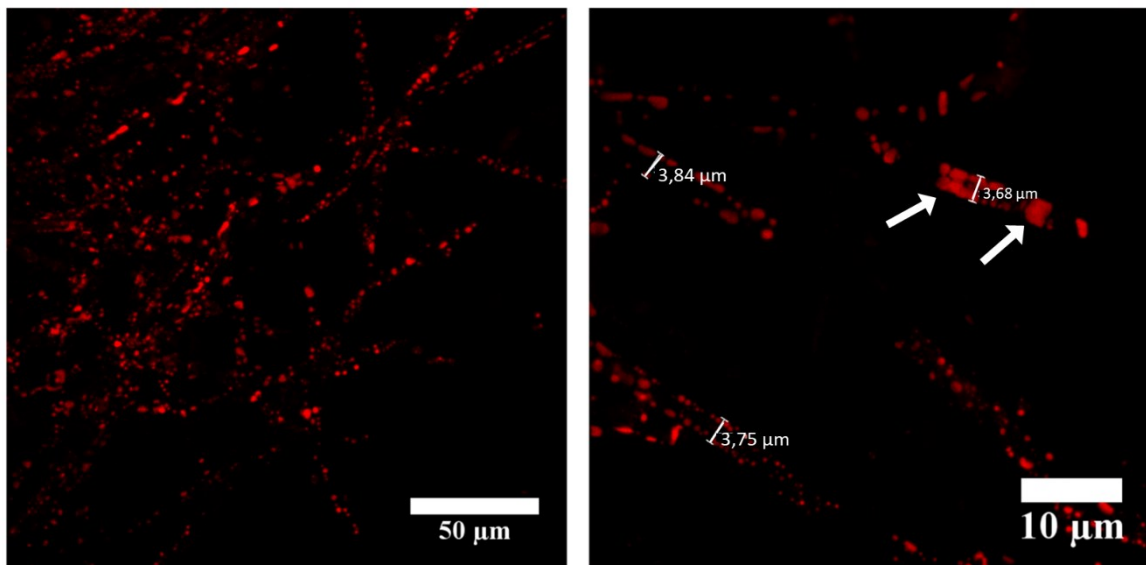
Preliminarmente à extração de lipídios, realizou-se uma análise qualitativa da produção de lipídios por *Linnemannia* sp. ACF038. Durante os cultivos submersos, utilizou-se o corante lipofílico Vermelho de Nilo, amplamente utilizado para a triagem de microrganismos oleaginosos (CHANG et al., 2022), que adere às gotículas de lipídios intracelulares. Este método, eficiente e rápido, permite visualizar o conteúdo lipídico das células, o tamanho das gotículas e seu grau de coloração – frequentemente proporcional à produtividade lipídica.

Neste trabalho, a coloração foi utilizada para aferição da produção lipídica, confirmação fundamental para seguir com a extração de lipídios. Dessa forma, as amostras do cultivo de

Linnemannia sp. ACF 038 foram coradas conforme descrito no item 3.5.5 e observadas em microscopia de fluorescência, como mostra a Figura 25.

Na imagem observa-se o acúmulo das gotículas de lipídio no interior das hifas em maior quantidade na região periférica da célula. As gotículas variam de tamanho, chegando a ocupar todo o diâmetro da hifa, com cerca de 3,75 μm , como mostra a Figura 25. Logo, com acúmulo expressivo de lipídios no interior das células, torna-se viável prosseguir à etapa de extração.

Figura 25: Microscopia de fluorescência com coloração de Vermelho de Nilo para a detecção de gotículas de lipídios em *Linnemannia* sp. ACF038. Em vermelho, observam-se as gotículas de lipídios no interior das hifas. Estas, apresentam cerca de 3,75 μm de diâmetro.



4.3.4 Extração e caracterização do perfil lipídico

Ao final dos cultivos, toda biomassa foi coletada e separada por centrifugação. Para a extração de lipídios foram realizados dois métodos: Soxhlet (1959) e Bligh&Dyer (1959). Este, a frio, visou a extração dos AGPIs sem degradação, para a caracterização do perfil lipídico, enquanto aquele, a quente, visou a máxima extração de lipídios da biomassa, para o cálculo do teor lipídico total produzido.

Como mostra a Tabela 16, o inóculo utilizado nos cultivos (A e B) apresentou teor lipídico de $24,3 \pm 2$ %. Após sete dias de cultivo submerso, a biomassa do Cultivo A apresentou 28,9 % de lipídios e o cultivo B 34,1 %. Tais valores indicam um aumento de 14,4 % no teor

total de lipídios, apontando para uma maior eficiência de acúmulo lipídico nas condições experimentais de B.

A principal hipótese para este aumento é a adição de nitrato de sódio, realizada no cultivo B. A adição de sais de nitrato ativa as vias metabólicas de consumo de carboidrato, em particular a pentose/fosfato. O estudo de Yu e colaboradores aponta que o sal estimula a atividade da ME e da IDH, que atuam no ciclo TCA e no ciclo Malato/Piruvato. A ME mitocondrial é uma das principais responsáveis pelo fornecimento de NADH à biossíntese de AGPIs (RATLEDGE; WYNN, 2002), já tendo sido utilizada como ferramenta de prospecção de lipídios através de superexpressão em *M. alpina* (HAO et al., 2014). Dessa forma, supõe-se que a adição do sal de nitrato induziu ao maior consumo de glicose e consequentemente à produção de lipídios em maior quantidade e com maior grau de insaturação.

Parte da biomassa liofilizada foi utilizada para a quantificação do teor lipídico por meio da extração à quente e outra parte foi submetida à extração à frio, para a caracterização do perfil lipídico. Após a extração a frio, o material foi esterificado e analisado por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos por esta análise são apresentados na Tabela 17, com os respectivos índices de retenção calculados e de referência. Os resultados apresentados são referentes ao Cultivo B, pois a variação do perfil lipídico não foi significativa entre os cultivos. O cromatograma é apresentado no APÊNDICE (Figura 27).

Tabela 17: Índices de retenção do perfil lipídico obtido a partir do Cultivo B de *Linnemannia* sp. ACF038.

Pico	Identificação	Teor (%)	IR _{CALC}	IR _{LIT}	Referência
1	Ácido Pentadecanóico	C15:0	2,2	1809	1823 ZIEGENBEIN et al., 2006
2	Ácido Palmitolêico	C16:1 n7	1,31	1886	1884 HANAI; HONG, 1989
3	Ácido Palmítico	C16:0	19,73	1913	1927 PALMEIRA et al., 2004
4	Ácido Heptadecanoico	C17:0	1,33	2008	2010 HANAI; HONG, 1989
5	Ácido Linoleico	C18:2 n6	41,83	2083	2078 HANAI; HONG, 1989
6	Ácido Oleico	C18:1 n9	15,35	2087	2097 NOROUZI-ARASI et al., 2006
7	Ácido Esteárico	C18:0	7,18	2110	2128 PALMEIRA et al., 2004

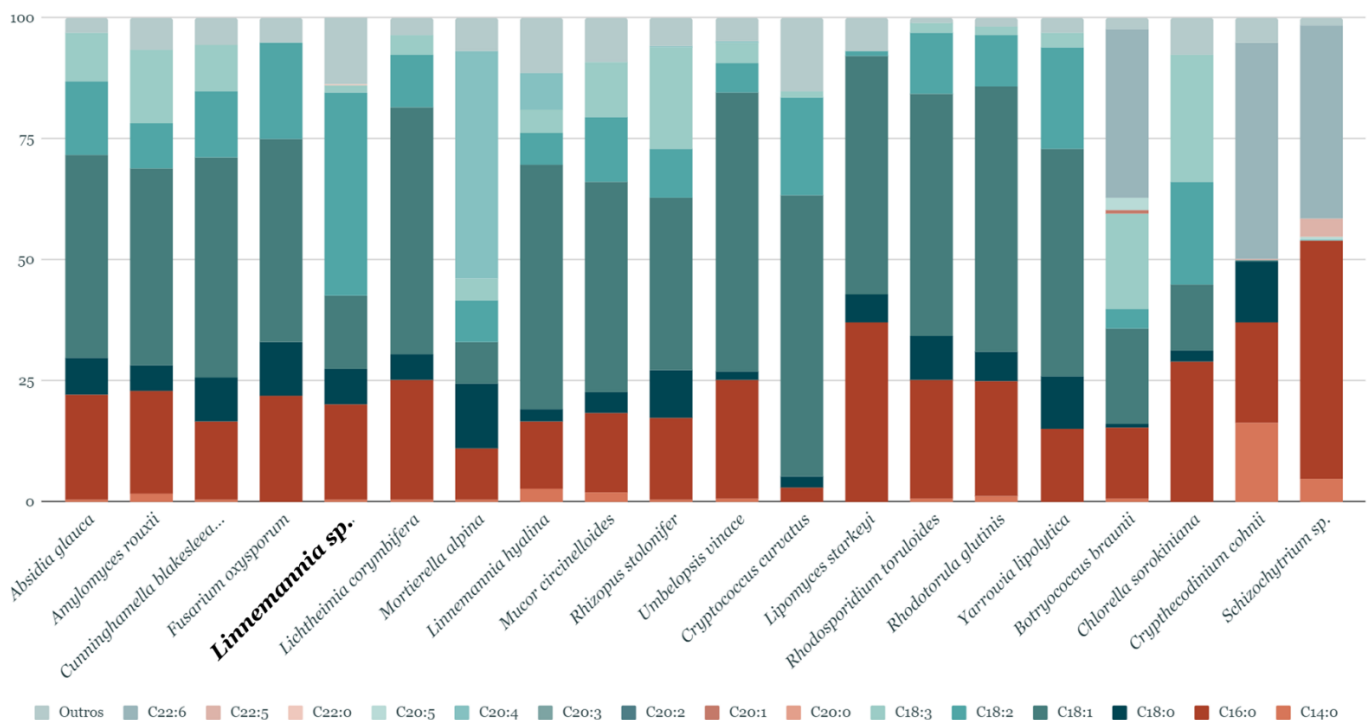
Nota-se que o ácido graxo majoritário foi o ácido linoleico, com 41,8 % dos lipídios totais, seguido pelos ácidos palmítico (saturado) e oleico (monoinsaturado), com 19,7 e 15,4 % dos lipídios totais. O ácido linoleico, AGPI da família ω 6, com duas insaturações, é considerado essencial para humanos, sendo sua ingestão fundamental à saúde, devido à ausência das

dessaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$ no metabolismo humano (DAS, 2006). Sendo precursor da família ômega-6 em humanos, após ingerido, o LA é metabolizado por consecutivas reações de dessaturação e alongamento, até a formação de GLA (18:3 n6) e ARA (20:4 n6).

Atualmente, as principais fontes de LA são óleos vegetais, como óleo de girassol, linhaça, soja e algodão. Contudo, as monoculturas geram diversos impactos ambientais, como desmatamento, erosão e empobrecimento do solo, poluição da água e interferências na cadeia trófica (ALTIERI, 2009; DE GROOT et al., 2021; PICCINETTI et al., 2021).

Entre as alternativas microbianas para a produção de LA, estão a levedura *Y. lipolytica*, com teores de 21 % de LA nos lipídios totais (PAPANIKOLAOU et al., 2002), a microalga *Chlorella sorokiniana*, com teores de 21,5 % de LA nos lipídios totais (FERREIRA et al., 2019) e, dentre fungos filamentosos, *Fusarium oxysporum* produz cerca de 20 % de LA do teor total de lipídios (MATSAKAS et al., 2017). Estas e outras fontes estão descritas na Figura 26, juntamente com o perfil lipídico obtido por *Linnemannia* sp. ACF038, obtido neste trabalho.

Figura 26: Perfil lipídico de fontes microbianas (fungos filamentosos, leveduras e microalgas) de AGPIs.



Em destaque, a linhagem *Linnemannia* sp. ACF038, utilizada neste trabalho.
Fonte: Autora (2022).

A linhagem estudada neste trabalho destaca-se na produção de LA entre os microrganismos listados, com um percentual de mais de 40 % em LA, cerca de duas vezes maior que os demais, apresentando-se como alternativa às fontes convencionais. Tratando-se de uma linhagem que se encontrava congelada por tempo indeterminado e, em cerca de três anos de estudo, apresentou excelentes resultados de conteúdo e perfil lipídico a partir de meios simples de cultivo, conclui-se que há grande potencial de *Linnemannia* sp. ACF038 como produtor de LA em escala industrial. Todavia, mais estudos são necessários para o melhoramento do processo, como o sequenciamento completo para mapeamento de genes únicos e codificantes de enzimas chave na biossíntese de ácidos graxos e a aplicação de outras estratégias de cultivo, como utilização de batelada alimentada e variação de parâmetros como pH e aeração de acordo com a etapa metabólica do processo.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo principal triar linhagens de *Mortierellaceae* isoladas da Antártida para a produção de lipídios. Para isso, realizou-se a identificação molecular das quatro cepas estudadas, através do sequenciamento da região ITS. A partir deste resultado, foi possível inferir os gêneros das espécies isoladas e selecionar, com base neste resultado e nas características fisiológicas, a linhagem ACF 038, identificada como *Linnemannia* sp. ACF038 para o seguimento do trabalho.

Para a investigação de parâmetros de cultivo, pH, concentração de glicose, fonte e concentração de nitrogênio e temperatura foram avaliados. Nesta etapa, concluiu-se que o crescimento de *Linnemannia* sp. ACF038 foi favorecido em pH 5,5, temperatura de 25 °C e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Estes resultados indicaram que a linhagem segue um padrão semelhante ao descrito na literatura para outras espécies da família *Mortierellaceae*.

O escalonamento e caracterização do cultivo em escala de bancada foi realizado com sucesso e, com melhorias nos parâmetros de processo utilizados, obteve-se uma produção de lipídios de 5,2 g/L. Com a caracterização do perfil lipídico produzido por *Linnemannia* sp. ACF038, concluiu-se que, com 40 % de teor de ácido linoleico, a linhagem destaca-se na produção de LA quando comparada a outros microrganismos oleaginosos. Mesmo com rendimento e produtividade a serem melhorados, a alta porcentagem no teor de LA mostra um grande potencial de *Linnemannia* sp. ACF038 como produtor deste AGPI, apresentando-se como alternativa às fontes convencionais.

Conclui-se, então, que este trabalho elucidou as características e parâmetros de cultivo de uma nova linhagem que ainda deve ser identificada a nível de espécie, atingindo seus objetivos inicialmente propostos. Ainda que o isolamento da cepa em questão seja recente, excelentes resultados foram alcançados, encorajando a continuidade do estudo, visto que a linhagem ainda pode ser melhorada, aumentando seu consumo de glicose, por exemplo, e levando a rendimentos e produtividade ainda mais altos.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados apresentados, é possível sugerir experimentos futuros, visando complementar os dados obtidos pelo presente trabalho. Seriam eles:

- Sequenciamento do genoma das linhagens estudadas, em particular de *Linnemannia* sp. (ACF 038), elaborando a inferência filogenética do fungo;
- Melhoramento da linhagem, através de engenharia evolutiva, para aumento das velocidades de consumo de glicose;
- Otimização do modo de cultivo, através de bateladas alimentadas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I. et al. DNA barcode and lipid analysis of new marine algae potential for biofuel. **Algal Research**, v. 2, n. 1, p. 10–15, 1 jan. 2013.
- AHMAD, T. B. et al. Correlation between Fatty Acid Profile and Anti-Inflammatory Activity in Common Australian Seafood by-Products. **Marine Drugs** 2019, Vol. 17, Page 155, v. 17, n. 3, p. 155, 6 mar. 2019.
- ALTIERI, M. A. The Ecological Impacts of Large-Scale Agrofuel Monoculture Production Systems in the Americas: <http://dx.doi.org/10.1177/0270467609333728>, v. 29, n. 3, p. 236–244, 21 abr. 2009.
- ANDO, A. et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an oleaginous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, and its application for eicosapentaenoic acid producer breeding. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5529–5535, set. 2009.
- ANSCHAU, A. et al. Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 214–222, 1 abr. 2014.
- BABEL, W.; MÜLLER, R. H. Correlation between cell composition and carbon conversion efficiency in microbial growth: a theoretical study. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 201–207, jul. 1985.
- BANDYOPADHYAY, B.; HUMPHREY, A. E.; TAGUCHI, H. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 9, n. 4, p. 533–544, 1 out. 1967.
- BENJAMIN, R. K. *Gamsiella*, A New Subgenus of *Mortierella* (Mucorales: Mortierellaceae). **Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany**, v. 9, n. 2, p. 157–170, 1 jan. 1978.
- BENNY, G. L.; BLACKWELL, M. *Lobosporangium*, a new name for *Echinosporangium* Malloch, and *Gamsiella*, a new genus for *Mortierella* *multidivariata*. <http://dx.doi.org/10.1080/15572536.2005.11833004>, v. 96, n. 1, p. 143–149, 2017.
- BEOPOULOS, A. et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in lipid research**, v. 48, n. 6, p. 375–387, nov. 2009.
- BIZZO, H. R. et al. UM CONJUNTO DE PLANILHAS ELETRÔNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES DE ÓLEOS ESSENCIAIS. **Química Nova**, v. 43, n. 1, p. 98–105, 16 mar. 2020.

- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BOHRER, B. M. An investigation of the formulation and nutritional composition of modern meat analogue products. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 4, p. 320–329, 1 dez. 2019.
- BONAN, C. I. D. G. et al. Redox potential as a key parameter for monitoring and optimization of xylose fermentation with yeast *Spathaspora passalidarum* under limited-oxygen conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 8, p. 1509–1519, 1 ago. 2020.
- BOUKID, F. Plant-based meat analogues: from niche to mainstream. **European Food Research and Technology** 2020 247:2, v. 247, n. 2, p. 297–308, 14 out. 2020.
- CABANELAS, I. T. D. et al. Botryococcus, what to do with it? Effect of nutrient concentration on biorefinery potential. **Algal Research**, v. 11, p. 43–49, 1 set. 2015.
- CALDER, P. C. et al. A systematic review of the effects of increasing arachidonic acid intake on PUFA status, metabolism and health-related outcomes in humans. **British Journal of Nutrition**, v. 121, n. 11, p. 1201–1214, 14 jun. 2019.
- CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1 jan. 2008.
- CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Kinetic analysis of oil biosynthesis by an arachidonic acid-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 224–230, 2000.
- CHANG, L. et al. Advances in improving the biotechnological application of oleaginous fungus *Mortierella alpina*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2021 105:16, v. 105, n. 16, p. 6275–6289, 23 ago. 2021.
- CHANG, L. et al. Lipid metabolism research in oleaginous fungus *Mortierella alpina*: Current progress and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 54, p. 107794, 1 jan. 2022.
- CHAUDHURI, S. et al. Effect of mustard meal on the production of arachidonic acid by *Mortierella elongata* SC-208. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 1998 75:8, v. 75, n. 8, p. 1053–1055, 1998.
- CHOI, S. Y.; RYU, D. D. Y.; RHEE, J. S. Production of microbial lipid: Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 5, p. 1165–1172, 1 maio 1982.

- CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Research and Production of Microbial Polyunsaturated Fatty Acids. **Bioprocessing for Biomolecules Production**, p. 167–194, 15 nov. 2019.
- COOPER, J. A.; PARK, D. *Modicella albostipitata*, a new species of sporocarp-forming fungus from New Zealand (Mortierellaceae: Mortierellomycota). **Phytotaxa**, v. 453, n. 3, p. 293–296–293–296, 23 jul. 2020.
- DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. Artmed ed. [s.l.: s.n.]. v. 5
- DAS, U. Essential Fatty Acids - A Review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 467–482, 13 dez. 2006.
- DE GROOT, G. S. et al. Large-scale monoculture reduces honey yield: The case of soybean expansion in Argentina. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 306, p. 107203, 1 fev. 2021.
- DEDYUKHINA, E. G. et al. Arachidonic acid synthesis from biodiesel-derived waste by *Mortierella alpina*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 4, p. 429–437, 2014.
- DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 45, p. e2565, 22 nov. 2010.
- DITOMMASO, P. et al. T-Coffee: A web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 2, 1 jul. 2011.
- DIAO, J. et al. Cellular engineering strategies toward sustainable omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids production: State of the art and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107497, 1 maio 2020.
- DIEZ-SIMON, C.; MUMM, R.; HALL, R. D. Mass spectrometry-based metabolomics of volatiles as a new tool for understanding aroma and flavour chemistry in processed food products. **Metabolomics 2019 15:3**, v. 15, n. 3, p. 1–20, 12 mar. 2019.
- DUARTE, A. W. F. et al. Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 41, n. 12, p. 2511–2521, 1 dez. 2018.
- DYAL, S. D.; NARINE, S. S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 38, n. 4, p. 445–467, 2005.

- DZURENDOVA, S. et al. The influence of phosphorus source and the nature of nitrogen substrate on the biomass production and lipid accumulation in oleaginous Mucoromycota fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 18, p. 8065–8076, 1 set. 2020.
- EROSHIN, V. K. et al. **Arachidonic-acid production by species of Mortierella** **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. [s.l: s.n.]. . Acesso em: 17 jun. 2020.
- FANG, H.; ZHAO, C.; CHEN, S. Single cell oil production by *Mortierella isabellina* from steam exploded corn stover degraded by three-stage enzymatic hydrolysis in the context of on-site enzyme production. **Bioresource technology**, v. 216, p. 988–995, 1 set. 2016.
- FERREIRA, G. F. et al. A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 109, p. 448–466, 1 jul. 2019.
- GAMS, W. A KEY TO THE SPECIES OF MORTIERELLA. v. c, p. 381–391, 1977.
- GARCÍA-OCHOA, F.; CASTRO, E. G.; SANTOS, V. E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 9, p. 680–690, 15 nov. 2000.
- GE, C. et al. Application of a ω -3 desaturase with an arachidonic acid preference to eicosapentaenoic acid production in *Mortierella alpina*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. JAN, p. 89, 22 jan. 2018.
- GOYZUETA-MAMANI, L. D. et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* using wastes from potato chips industry. 2020.
- GUALDA, I. P. et al. Centesimal composition, fatty acids profile and the nutritional quality index of four seafood species from the southern region of Brazil. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 40, n. 1, p. e39351, 1 jul. 2018.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, p. 95–98, 1999.
- HANAI, T.; HONG, C. Structure-retention correlation in CGC. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 12, n. 5, p. 327–332, 1 maio 1989.
- HAO, G. et al. Role of malic enzyme during fatty acid synthesis in the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 2672–2678, 2014a.
- HAO, G. et al. Increased fatty acid unsaturation and production of arachidonic acid by homologous over-expression of the mitochondrial malic enzyme in *Mortierella alpina*. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 9, p. 1827–1834, 27 maio 2014b.

- HAO, G. et al. Metabolic engineering of *Mortierella alpina* for arachidonic acid production with glycerol as carbon source. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 23 dez. 2015.
- HAO, G. et al. Metabolic engineering of *Mortierella alpina* for enhanced arachidonic acid production through the NADPH-supplying strategy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 11, p. 3280–3288, 1 jun. 2016.
- HASHEM, A. H. et al. Consolidated Bioprocessing of Sugarcane Bagasse to Microbial Oil by Newly Isolated Oleaginous Fungus: *Mortierella wolfii*. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 46, n. 1, p. 199–211, 1 jan. 2021.
- HIGASHIYAMA, K. et al. Enhancement of arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 11, p. 1501–1505, 1998.
- HIGASHIYAMA, K. et al. Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 5, p. 252–262, 2002.
- HOANG, D. T. et al. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 2, p. 518–522, 1 fev. 2018.
- HOU, C. T. Production of arachidonic acid and dihomo- γ -linolenic acid from glycerol by oil-producing filamentous fungi, *Mortierella* in the ARS culture collection. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 501–506, 1 jun. 2008.
- HUANG, D. et al. Directed optimization of a newly identified squalene synthase from *Mortierella alpina* based on sequence truncation and site-directed mutagenesis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 10, p. 1341–1352, 2015.
- HUANG, M. et al. Two-stage pH control combined with oxygen-enriched air strategies for the highly efficient production of EPA by *Mortierella alpina* CCFM698 with fed-batch fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 9, p. 1725–1733, 1 set. 2020.
- HWANG, B. H. et al. High-level production of arachidonic acid by fed-batch culture of *Mortierella alpina* using NH_4OH as a nitrogen source and pH control. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 10, p. 731–735, 2005.
- JACOBS, A.; BOTHA, A.; VAN ZYL, W. H. The production of eicosapentaenoic acid by representatives of the genus *Mortierella* grown on brewers' spent grain. **Biologia** 2009 64:5, v. 64, n. 5, p. 871–876, 10 set. 2009.
- JI, X. J. et al. Fungal arachidonic acid-rich oil: Research, development and industrialization. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 197–214, 2014a.

- JI, X. J. et al. Efficient arachidonic acid-rich oil production by *Mortierella alpina* through a repeated fed-batch fermentation strategy. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 356–360, 2014b.
- JIANG, Y.; CHEN, F. Effects of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1205–1209, 1 jul. 2000.
- JIN, M. J. et al. A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. **Biotechnology letters**, v. 30, n. 6, p. 1087–1091, jun. 2008.
- KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods** 2017 **14:6**, v. 14, n. 6, p. 587–589, 8 maio 2017.
- KAWASHIMA, H. Intake of arachidonic acid-containing lipids in adult humans: Dietary surveys and clinical trials. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 16 abr. 2019.
- KOH, H. J. et al. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39968–39974, 14 jul. 2004.
- KOIKE, Y. et al. Effect of consumed carbon to nitrogen ratio of mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *mortierella alpina*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 4, p. 382–389, 1 jan. 2001.
- KYRIAKOPOULOU, K.; DEKKERS, B.; VAN DER GOOT, A. J. Plant-Based Meat Analogues. **Sustainable Meat Production and Processing**, p. 103–126, 1 jan. 2019.
- LEE, J. W. et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. **Nature Chemical Biology** 2012 **8:6**, v. 8, n. 6, p. 536–546, 17 maio 2012.
- LI, C. H. et al. Sporangiospore Size Dimorphism Is Linked to Virulence of *Mucor circinelloides*. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 6, p. e1002086, jun. 2011.
- LI, L.; JIN, N. Effect of Nitrogen Concentration on the Growth and Fatty Acid Content of *Mortierella alpina*. **Article in International Journal of Agriculture and Biology**, 2020.
- LI, X. et al. Efficient production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* through integrating fed-batch culture with a two-stage pH control strategy. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 275–282, 2015.
- LIANG, M. H.; JIANG, J. G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 395–408, 2013.
- LIN, S.; HUFF, H. E.; HSIEH, F. Texture and Chemical Characteristics of Soy Protein Meat Analog Extruded at High Moisture. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 2, p. 264–269, 1 mar. 2000.

- LING, F. et al. Role of the mitochondrial citrate-oxoglutarate carrier in lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. **Biotechnology Letters**, v. 43, p. 1455–1466, 2021.
- LIPP, M. et al. Composition of Genuine Cocoa Butter and Cocoa Butter Equivalents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 4, p. 399–408, 1 ago. 2001.
- LIU, B. et al. Sesamol Enhances Cell Growth and the Biosynthesis and Accumulation of Docosahexaenoic Acid in the Microalga *Cryptocodinium cohnii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 5640–5645, 17 jun. 2015.
- LOWRY, O. H. et al. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** . Acesso em: 3 abr. 2022.
- LU, H. et al. Metabolomics analysis reveals the role of oxygen control in the nitrogen limitation induced lipid accumulation in *Mortierella alpina*. **Journal of Biotechnology**, v. 325, p. 325–333, 10 jan. 2021.
- LU, J. et al. Fermentation characteristics of *Mortierella alpina* in response to different nitrogen sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 979–990, 2011.
- MALAIWONG, N.; YONGMANITCHAI, W.; CHONUDOMKUL, D. Optimization of arachidonic acid production from *Mortierella alpina* PRAO7-10 by response surface methodology. **Agriculture and Natural Resources**, v. 50, n. 3, p. 162–172, 1 maio 2016.
- MAMANI, L. D. G. et al. Industrial production, patent landscape, and market trends of arachidonic acid-rich oil of *Mortierella alpina*. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 103–119, 2019.
- MARANGONI, F. et al. Dietary linoleic acid and human health: Focus on cardiovascular and cardiometabolic effects. **Atherosclerosis**, v. 292, p. 90–98, 1 jan. 2020.
- MATSAKAS, L.; GIANNAKOU, M.; VÖRÖS, D. Effect of synthetic and natural media on lipid production from *Fusarium oxysporum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 95–102, 1 nov. 2017.
- MELO, I. S. et al. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. **Extremophiles**, v. 18, n. 1, p. 15–23, 2014.
- MEYER, W.; GAMS, W. Delimitation of *Umbelopsis* (*Mucorales*, *Umbelopsidaceae* fam. nov.) based on ITS sequence and RFLP data. **Mycological research**, v. 107, n. Pt 3, p. 339–350, 1 mar. 2003.
- MINGJIE, J. et al. Metabolic flux analysis on arachidonic acid fermentation. **Front. Chem. Eng. China**, v. 1, n. 4, p. 421–426, 2007.

- MIRONOV, A. A. et al. The Effect of pH and Temperature on Arachidonic Acid Production by Glycerol-Grown *Mortierella alpina* NRRL-A-10995. **Fermentation**, 2018.
- MONDO, S. J. et al. Widespread adenine N6-methylation of active genes in fungi. **Nature Genetics** 2017 **49:6**, v. 49, n. 6, p. 964–968, 8 maio 2017.
- MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, v. 7, p. 117–123, 1 jan. 2015.
- NAGY, L. G. et al. Where is the unseen fungal diversity hidden? A study of *Mortierella* reveals a large contribution of reference collections to the identification of fungal environmental sequences. **The New phytologist**, v. 191, n. 3, p. 789–794, ago. 2011.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. [s.l: s.n.].
- NOROUZI-ARASI, H. et al. Volatile constituents of *Stachys inflata* Benth. from Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 2, p. 262–264, mar. 2006.
- O'FALLON, J. V. et al. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of animal science**, v. 85, n. 6, p. 1511–1521, jun. 2007.
- OLIVER, L. et al. Producing Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Review of Sustainable Sources and Future Trends for the EPA and DHA Market. **Resources** 2020, **Vol. 9, Page 148**, v. 9, n. 12, p. 148, 16 dez. 2020.
- ONOFRI, S. et al. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances in Space Research**, v. 40, n. 11, p. 1657–1664, 1 jan. 2007.
- OROZCO COLONIA, B. S.; VINÍCIUS DE MELO PEREIRA, G.; SOCCOL, C. R. Omega-3 microbial oils from marine thraustochytrids as a sustainable and technological solution: A review and patent landscape. **Trends in Food Science and Technology**, v. 99, n. October 2019, p. 244–256, 2020.
- PALMEIRA, S. F. et al. Neutral components from hexane extracts of *Croton sellowii*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, n. 1, p. 69–71, 1 jan. 2004.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 43–49, 1 mar. 2002.
- PATEL, A.; MATSAKAS, L. A comparative study on de novo and ex novo lipid fermentation by oleaginous yeast using glucose and sonicated waste cooking oil. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 52, p. 364–374, 1 abr. 2019.

- PENG, C. et al. Effects of n-Hexadecane Concentration and a Two-Stage Oxygen Supply Control Strategy on Arachidonic Acid Production by *Mortierella Alpina* ME-1. **Chemical Engineering & Technology**, v. 33, n. 4, p. 692–697, 1 abr. 2010a.
- PENG, C. et al. A temperature-shift strategy for efficient arachidonic acid fermentation by *Mortierella alpina* in batch culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 1, p. 92–96, 15 dez. 2010b.
- PETKOVITS, T. et al. Data partitions, Bayesian analysis and phylogeny of the zygomycetous fungal family Mortierellaceae, inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. **PloS one**, v. 6, n. 11, 10 nov. 2011.
- PICCINETTI, C. F. et al. Soybean in rotation with cereals attenuates nitrous oxide emissions as compared with soybean monoculture in the Pampas region. **Geoderma**, v. 402, p. 115192, 15 nov. 2021.
- QU, L.; REN, L. J.; HUANG, H. Scale-up of docosahexaenoic acid production in fed-batch fermentation by *Schizochytrium* sp. based on volumetric oxygen-transfer coefficient. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 82–87, 15 ago. 2013.
- RADHAKRISHNAN, G. K. Production of fatty acids in microbial systems. n. June, 2014.
- RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807–815, 2004.
- RATLEDGE, C.; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Advances in applied microbiology**, v. 51, p. 1–52, 2002.
- ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New Phytologist**, v. 151, n. 2, p. 341–353, 1 ago. 2001.
- ROBL, D. et al. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 31 out. 2013.
- ROSA, S. M. et al. Improvement of a two-stage fermentation process for docosahexaenoic acid production by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 applying statistical experimental designs and data analysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2367–2374, 1 abr. 2010.
- RUISI, S. et al. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1–3, p. 127–141, 2007.
- RUSSELL, N. J. Cold adaptation of microorganisms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 326, n. 1237, p. 595–611, 30 jan. 1990.

- SAFDAR, W. et al. Growth kinetics, fatty acid composition and metabolic activity changes of *Cryptocodium cohnii* under different nitrogen source and concentration. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2017.
- SAKURADANI, E. et al. A novel fungal ω 3-desaturase with wide substrate specificity from arachidonic acid-producing *Mortierella alpina* 1S-4. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 6, p. 648–654, 5 mar. 2005.
- SAKURADANI, E.; KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, S. Delta9-Fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing fungus . Unique gene sequence and its heterologous expression in a fungus, *Aspergillus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, n. 1, p. 208–216, 5 fev. 1999.
- SAKURADANI, E.; SHIMIZU, S. Gene cloning and functional analysis of a second Δ 6-fatty acid desaturase from an arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 704–711, 1 jan. 2003.
- SAKURADANI, E.; SHIMIZU, S. Single cell oil production by *Mortierella alpina*. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 31–36, 2009.
- SALEM, N.; VAN DAEL, P. Arachidonic Acid in Human Milk. **Nutrients**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2020.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SANTOS, F. R. **Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza**. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/88341>>. Acesso em: 3 abr. 2022.
- SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 17 abr. 2012.
- SCHOCH, C. L. et al. Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. **Database**, v. 2014, 1 jan. 2014.
- SHAH, S. H. et al. Improvement in lipids extraction processes for biodiesel production from wet microalgal pellets grown on diammonium phosphate and sodium bicarbonate combinations. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 199–209, 1 ago. 2016.
- SHI, H. et al. Application of a delta-6 desaturase with α -linolenic acid preference on eicosapentaenoic acid production in *Mortierella alpina*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 30 jun. 2016.

- SLUITER, J. B. et al. Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 99, n. 3, p. 579–585, 1 maio 2016.
- SMITH, M. E. et al. Phylogenetic analysis of the genus *Modicella* reveals an independent evolutionary origin of sporocarp-forming fungi in the Mortierellales. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 61, p. 61–68, dez. 2013a.
- SMITH, M. E. et al. Phylogenetic analysis of the genus *Modicella* reveals an independent evolutionary origin of sporocarp-forming fungi in the Mortierellales. **Fungal Genetics and Biology**, v. 61, p. 61–68, 1 dez. 2013b.
- STREEKSTRA, H. **Arachidonic Acid: Fermentative Production by Mortierella Fungi**. Second Edi ed. [s.l.] ©2010 by AOCS Press. All rights reserved., 2010.
- SUN, X. M. et al. Influence of oxygen on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 868–876, 1 fev. 2018.
- TANG, X. et al. Characterization of an omega-3 desaturase from *Phytophthora parasitica* and application for eicosapentaenoic acid production in *Mortierella alpina*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1878, 14 ago. 2018.
- TANG, X. et al. Role of beta-isopropylmalate dehydrogenase in lipid biosynthesis of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 152, p. 103572, 1 jul. 2021.
- TOTANI, N.; SOMEYA, K.; OBA, K. Industrial Production of Arachidonic Acid by *Mortierella*. **Industrial Applications of Single Cell Oils**, 30 jun. 1992.
- TRIFINOPOULOS, J. et al. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W232–W235, 8 jul. 2016.
- VADIVELAN, G.; VENKATESWARAN, G. Production and enhancement of Omega-3 fatty acid from *mortierella alpina* CFR-GV15: Its food and therapeutic application. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014a.
- VADIVELAN, G.; VENKATESWARAN, G. Production and enhancement of Omega-3 fatty acid from *mortierella alpina* CFR-GV15: Its food and therapeutic application. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014b.
- VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. C, p. 463–471, 1 jan. 1963.

- VAN DEN ENDE, A.; DE HOOG, G. S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Stud Mycol**, v. 43, p. 151–162, 1999.
- VANDEPOL, N. et al. Resolving the Mortierellaceae phylogeny through synthesis of multi-gene phylogenetics and phylogenomics. v. 104, p. 267–289, 2020.
- VASCONCELOS, B. et al. Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—from biodiesel to surf boards, a wide range of “green” applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019.
- VIEIRA, J. P. F. et al. Microbial lipid production: screening with yeasts grown on Brazilian molasses. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 12, p. 2433–2442, 2014.
- VIEIRA, J. P. F. et al. Single cell oil production integrated to a sugarcane-mill: Conceptual design, process specifications and economic analysis using molasses as raw material. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 478–485, 30 out. 2016.
- VONGSANGNAK, W. et al. Genome-scale analysis of the metabolic networks of oleaginous Zygomycete fungi. **Gene**, v. 521, n. 1, p. 180–190, 25 maio 2013.
- VU, D. et al. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 135–154, 1 mar. 2019.
- WAGNER, L. et al. A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 30, p. 77–93, 2013.
- WANG, F. et al. Metabolic engineering to enhance biosynthesis of both docosaehaenoic acid and odd-chain fatty acids in *Schizochytrium* sp. S31. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 8 jun. 2019.
- WANG, L. et al. Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.
- WEBER, R. W. S.; TRIBE, H. T. Oil as a substrate for *Mortierella* species. **Mycologist**, v. 17, n. 3, p. 134–139, 2003.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **Biology**, p. 315–322, 1990.
- WOO, K. S. et al. Glacial melting pulses in the Antarctica: Evidence for different responses to regional effects of global warming recorded in Antarctic bivalve shell (*Laternula elliptica*). **Journal of Marine Systems**, v. 197, p. 103179, 1 set. 2019.

- WU, W.-J. et al. An efficient multi-stage fermentation strategy for the production of microbial oil rich in arachidonic acid in *Mortierella alpina*. **Bioresources and Bioprocessing** 2017 **4:1**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 18 jan. 2017.
- WYNN-WILLIAMS, D. D.; EDWARDS, H. G. M. Antarctic ecosystems as models for extraterrestrial surface habitats. **Planetary and Space Science**, v. 48, n. 11, p. 1065–1075, 1 set. 2000.
- XIE, Y.; WANG, G. Mechanisms of fatty acid synthesis in marine fungus-like protists. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 20, p. 8363–8375, 22 out. 2015.
- XUE, Z. et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. **Nature Biotechnology** 2013 **31:8**, v. 31, n. 8, p. 734–740, 21 jul. 2013.
- YANG, Z. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. **Journal of Molecular Evolution** 1994 **39:3**, v. 39, n. 3, p. 306–314, 1994.
- YAO, L. et al. Elevated acetyl-CoA by amino acid recycling fuels microalgal neutral lipid accumulation in exponential growth phase for biofuel production. **Plant biotechnology journal**, v. 15, n. 4, p. 497–509, 1 abr. 2017.
- YAO, Q. et al. An efficient strategy for screening polyunsaturated fatty acid-producing oleaginous filamentous fungi from soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 158, p. 80–85, 1 mar. 2019.
- YU, Y. et al. Mechanism of Arachidonic Acid Accumulation during Aging in *Mortierella alpina*: A Large-Scale Label-Free Comparative Proteomics Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 47, p. 9124–9134, 30 nov. 2016.
- YU, Y. et al. How nitrogen sources influence *Mortierella alpina* aging: From the lipid droplet proteome to the whole-cell proteome and metabolome. **Journal of Proteomics**, v. 179, p. 140–149, 15 maio 2018.
- ZAMORA, R.; HIDALGO, F. J. The Maillard reaction and lipid oxidation. **Lipid Technology**, v. 23, n. 3, p. 59–62, 1 mar. 2011.
- ZHANG, H.; CUI, Q.; SONG, X. **Research advances on arachidonic acid production by fermentation and genetic modification of *Mortierella alpina***. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** Springer Science and Business Media B.V., , 1 jan. 2021. . Acesso em: 7 mar. 2021

ZHANG, X. et al. Effects of aeration on metabolic profiles of *Mortierella alpina* during the production of arachidonic acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 8, p. 1225–1235, 1 ago. 2017.

ZHAO, L. et al. (13)C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Bioresource technology**, v. 197, p. 23–29, 1 dez. 2015.

ZHU, M. et al. Isolating *Mortierella alpina* strains of high yield of arachidonic acid. **Applied Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 332–335, 2004.

ZŁOTEK, U.; WÓJCIK, W. Effect of arachidonic acid elicitation on lettuce resistance towards *Botrytis cinerea*. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 16–20, 24 nov. 2014.

APÊNDICE

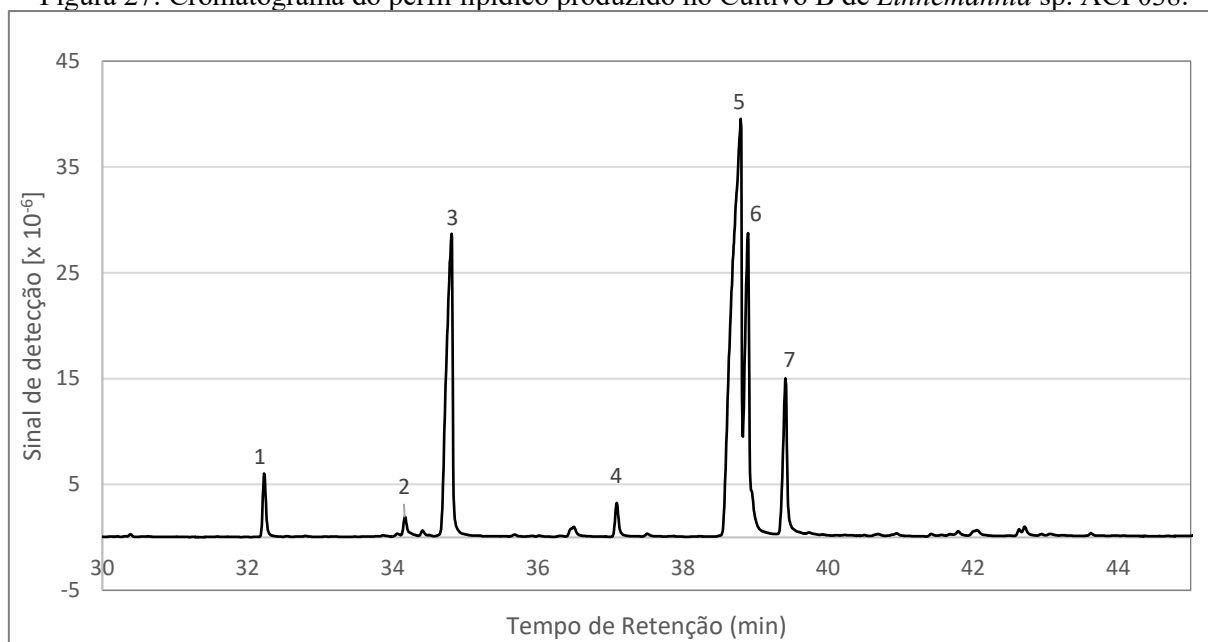
Figura 27: Cromatograma do perfil lipídico produzido no Cultivo B de *Linnemannia* sp. ACF038.

Tabela 18: Linhagens utilizadas para construção da árvore filogenética da família *Mortirellaceae* com base na região ITS.

Espécie	Nº GenBank	Local de isolamento	Referência
<i>Actinomortierella wolfii</i> CBS 612.70	HQ630304.1	Nova Zelândia	(NAGY et al., 2011)
<i>Actinomortierella capitata</i> CBS 859.70	MH859983.1	EUA	(VU et al., 2019)
<i>Actinomortierella ambigua</i> CBS 457.66	JX976041.1	Armênia	(WAGNER et al., 2013)
<i>Benniella</i> sp. JL122	MW580775.1	EUA	(LIBER et al., 2021)
<i>Dissophora globulifera</i> CBS 858.70	NR_077211.1	Inglaterra	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Dissophora ornata</i> CBS 347.77	NR_111554.1	Colômbia	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Dissophora decumbens</i> CBS 301.87	JX976001.1	EUA	(WAGNER et al., 2013)
<i>Entomortierella lignicola</i> CBS 207.37	NR_145301.1	Colômbia	(WAGNER et al., 2013)
<i>Entomortierella beljakovae</i> CBS 123.72	NR_111584.1	Ucrânia	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Entomortierella parvispora</i> CBS 311.52	NR_077185.1	Alemanha	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Gamsiella stylospora</i> CBS 211.32	NR_111556.1	Austrália	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Gamsiella multivariacta</i> CBS 227.78	NR_111566.1	Rússia	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Gryganskiella fimbricystis</i> CBS 943.70	NR_152949.1	Argentina	(JIANG et al., 2010)
<i>Gryganskiella cystojenkinii</i> CBS 456.71	NR_111581.1	Países Baixos	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Linnemannia hyalina</i> CBS 223.35	NR_163542.1	Alemanha	(VU et al., 2019)
<i>Linnemannia gamsii</i> CBS 749.68	NR_152954.1	Países Baixos	(NAGY et al., 2011)
<i>Linnemannia zychae</i> CBS 316.52	NR_111576.1	Alemanha	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Linnemannia sclerotiella</i> CBS 529.68	NR_145298.1	Ucrânia	(WAGNER et al., 2013)
<i>Linnemannia elongata</i> CBS 207.71	MH860069.1	Países Baixos	(VU et al., 2019)

<i>Linnemannia schumuckeri</i> CBS 295.59	NR_111578.1	México	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Linnemannia camargensis</i> CBS 221.58	NR_111577.1	França	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Lobosporangium transversale</i> NRRL 3116	OL739375.1	EUA	(MONDO et al., 2017)
<i>Lunasporangiospora selenospora</i> CBS 811.68	NR_145296.1	Países Baixos	(WAGNER et al., 2013)
<i>Lunasporangiospora chienii</i> CBS 124.71	NR_160130.1	EUA	(VU et al., 2019)
<i>Modicella reniformis</i>	KF053136.1	Argentina	(SMITH et al., 2013b)
<i>Modicella malleola</i>	KF053135.1	Espanha	(SMITH et al., 2013b)
<i>Modicella allostipitata</i> PDD 96330	NR_171266.1	Nova Zelândia	(COOPER; PARK, 2020)
<i>Mortierella alpina</i> CBS 396.91	MH862257.1	EUA	(VU et al., 2019)
<i>Mortierella antarctica</i> CBS 609.70	NR_111580.1	Antártida	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Mortierella globalpina</i> CBS 360.70	NR_160121.1	Países Baixos	(VU et al., 2019)
<i>Mortierella yunnanensis</i> KUMCC 20-0009	NR_172421.1	China	(TIBPROMMA, 2021)
<i>Mortierella polycephala</i> CBS 327.72	MH860490.1	Inglaterra	(VU et al., 2019)
<i>Podila horticola</i> CBS 305.52	NR_111572.1	Alemanha	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Podila humilis</i> CBS 222.35	NR_077209.1	México	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Podila epiclada</i> CBS 355.76	NR_111571.1	Espanha	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Podila clonocystis</i> CBS 357.76	NR_111570.1	Espanha	(SCHOCH et al., 2014)
<i>Mucor circinelloides</i> ATCC 1209b	HM754254.1	USA	(LI et al., 2011)

Tabela 19: Perfil lipídico de microrganismos oleaginosos.

Microrganismo	Conteúdo lipídico		Perfil lipídico (%)										Ref.
	g/L	%	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:4	C22:6	Outros	
Fungos filamentosos													
<i>Absidia glauca</i>	5,7	47,9	0,5	21,6	0,6	7,5	42,1	15,0	10,2	0,0	0,0	2,5	[1]
<i>Amylomyces rouxii</i>	3,8	37,6	1,8	21,3	2,3	5,3	40,6	9,4	15,0	0,1	0,0	4,3	[1]
<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	2,9	36,9	0,6	16,1	0,5	9,0	45,5	13,5	9,6	0,1	0,0	5,2	[1]
<i>Fusarium oxysporum</i>	3,8	17,7	0,0	22,0	0,0	11,0	42,0	20,0	0,0	0,0	0,0	5,0	[2]
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	3,0	31,1	0,6	24,8	1,0	5,2	51,1	10,7	4,2	0,0	0,0	2,5	[1]
<i>Linnemannia hyalina</i>	5,1	55,2	2,7	14,1	2,8	2,5	50,3	6,6	4,9	7,4	0,0	8,7	[1]
<i>Linnemannia sp. ACF038</i>	5,2	34,0	0,5	19,7	1,3	7,2	15,3	41,8	1,5	0,0	0,0	12,7	Este trabalho
<i>Mortierella alpina</i>	3,3	55,6	0,5	10,7	0,1	13,4	8,6	8,5	4,5	47,0	0,0	6,8	[1]
<i>Mucor circinelloides</i>	5,1	46,1	2,0	16,4	4,2	4,3	43,5	13,3	11,4	0,0	0,0	4,9	[1]
<i>Rhizopus stolonifer</i>	2,0	29,9	0,6	16,7	0,3	9,9	35,7	10,0	21,0	0,1	0,0	5,7	[1]
<i>Umbelopsis vinace</i>	12,6	58,9	0,7	24,6	2,3	1,6	57,5	6,3	4,3	0,0	0,0	2,7	[1]
Leveduras													
<i>Cryptococcus curvatus</i>	5,2	53,0	0,0	3,1	0,0	2,2	58,0	20,2	1,4	0,0	0,0	15,2	[3]
<i>Lipomyces starkeyi</i>	10,2	48,0	0,0	37,0	4,0	6,0	49,0	1,0	0,0	0,0	0,0	3,0	[3]
<i>Rhodospidium toruloides</i>	15,3	44,0	0,6	24,7	1,0	9,0	50,0	12,5	2,2	0,0	0,0	0,0	[4]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	11,6	36,0	1,2	23,8	1,2	5,9	54,8	10,7	1,7	0,0	0,0	0,7	[4]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	3,5	43,0	0,0	15,0	2,0	11,0	47,0	21,0	3,0	0,0	0,0	1,0	[5]
Microalgas													
<i>Botryococcus braunii</i>	0,4	47,1	0,6	14,7	1,1	0,7	19,9	4,0	19,5	0,0	34,8	4,6	[6]
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0,7	43,0	0,0	28,9	3,0	2,5	13,4	21,4	26,3	0,0	0,0	4,6	[7]
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	0,3	9,9	16,4	20,8	0,0	12,6	0,1	0,0	0,0	0,0	44,7	5,4	[8]
<i>Schizochytrium sp.</i>	12,4	61,1	4,9	49,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	39,8	5,8	[6]

[1] (DZURENDOVA et al., 2020); [2] (MATSAKAS et al., 2017); [3] (PATEL; MATSAKAS, 2019); [4] (VIEIRA et al., 2014); [5] (PAPANIKOLAOU et al., 2002); [6] (CABANELAS et al., 2015); [7] (FERREIRA et al., 2019); [8] (JIANG; CHEN, 2000).

