



**MARCELA MAGALHÃES MELO**

**USE OF SPENT DOMESTIC SOYBEAN OIL  
BY MICROORGANISMS ISOLATED FROM  
THE ALPERUJO RESIDUE**

**Lavras – MG**

**2017**

**MARCELA MAGALHÃES MELO**

**USE OF SPENT DOMESTIC SOYBEAN OIL BY  
MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE SOLID WASTE OF  
THE ALPERUJO RESIDUE**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, área de  
concentração em Microbiologia  
Agrícola, para obtenção do título de  
Mestre.

Profa. Dr. Cristina Ferreira Silva e Batista  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Melo, Marcela Magalhães.

Use of spent domestic soybean oil by microorganisms isolated  
from the solid waste of the alperujo residue/ Marcela Magalhães

Melo. - 2017.

75 p.

Orientador(a): Cristina Ferreira Silva e Batista.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Microbiologia. 2. Alperujo. 3. Óleo de soja. I. Silva e  
Batista, Cristina Ferreira. . II. Título.

**MARCELA MAGALHÃES MELO**

**USE OF SPENT DOMESTIC SOYBEAN OIL BY  
MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE SOLID WASTE OF  
THE ALPERUJO RESIDUE**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, área de  
concentração em Microbiologia  
Agrícola, para a obtenção do título  
de Mestre.

APROVADA em 11 de agosto de 2017.

Dra. Mariana Dias Moreira - UFSJ

Dra. Cíntia Lacerda Ramos - UFVJM



Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista  
Orientadora

**LAVRAS - MG  
2017**

Aos meus pais, meu irmão, ao André e a todos que me  
ajudaram na realização deste trabalho  
Dedico.

## **Agradecimentos**

À Deus.

A minha mãe, meu irmão e meu pai, pelo carinho, apoio, confiança e incentivo.

Aos meus familiares pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao André, pelo amor, paciência, incentivo e por sempre apoiar meus sonhos.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de mestrado. À CAPES e ao CNPq.

À EPAMIG de Maria da Fé por permitir a coleta das amostras do resíduo do processamento do azeite de oliva utilizada em minha pesquisa.

À professora Cristina Ferreira Silva e Batista, pelo incentivo, dedicação, suporte e orientação. Por acreditar em meu trabalho e em minha capacidade, minha eterna gratidão.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos.

Aos funcionários do DBI, especialmente Rose, Cidinha, Ivani e Jajá pelo auxílio e paciência.

Ao laboratório de química do G-óleo pela ajuda nas análises.

Aos amigos e colegas da Microbiologia Agrícola da UFLA, pela ajuda em todos os momentos, tornando o trabalho de pesquisa, mais agradável e divertido, em especial a Kelly e a Angel, pela amizade.

Aos meus queridos amigos do NEMAI, por toda ajuda, paciência convivência e momentos de descontração, em especial à Jéssica e Josi.

Muito obrigada!

## RESUMO

Óleo de soja doméstico utilizado em processos de fritura compreende um tipo de resíduo que quando descartado de maneira incorreta ao meio ambiente, pode causar graves problemas ambientais, como; incrustação e entupimento das tubulações na rede de esgoto, contaminação da água de rios e represas impedindo a entrada de luz e oxigênio. Impactos negativos no solo também são possíveis bem como a contaminação de lençóis freáticos. Sendo assim, o uso como fonte de carbono de baixo custo em bioprocessos como produção de biomassa é uma alternativa barata para reuso deste óleo. O alperujo é um resíduo gerado durante o processamento do azeite de oliva, e este se mostra tóxico para a maioria dos microrganismos, por apresentar altas concentrações de fenóis, carga orgânica e baixo pH. Sendo assim, o estudo da microbiota deste resíduo possibilitou encontrarmos microrganismos capazes de crescer sobre o óleo de soja usado. Isto posto, o objetivo do trabalho foi isolar e caracterizar microrganismos do alperujo, bem como a produção de biomassa microbiana, em óleo de soja usado. Para isso, foi realizado isolamento, caracterização morfológica e identificação por MALDI TOF dos microrganismos encontrados no alperujo. Houve predomínio populacional de leveduras e fungos filamentosos. As bactérias apresentaram maior diversidade de espécies, sendo *Bacillus* o gênero predominante nas amostras. Para produção de biomassa, foram feitos tratamentos contendo *Rhodotorula mucilaginosa* isolada do alperujo e com *Candida rugosa* CCMA 00371, ambas co- inoculadas com *Bacillus subtilis* CCMA 0085 em meio contendo (% m/v: 0.075 glicose e 0,375 (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub> PO<sub>4</sub>) em 75 mL de água e 75 mL de óleo de soja reutilizado e em meio sintético YEPG como controle positivo. Ao final da fermentação, pode-se observar produção de biomassa em ambos meios. O tratamento com óleo de soja apresentou as menores médias de biomassa, porém observou-se mudanças nas características químicas do óleo de soja, um indicativo de uma possível utilização como fonte de carbono pelo microrganismo.

Palavras chave: Microbiota. Alperujo. Biomassa. Óleo de soja. Re-uso

## ABSTRACT

Domestic soybean oil used in frying process comprises a kind of residue that when improperly discarded to the environment, can cause serious environmental problems, such as; fouling and plugging of pipes in the sewers network, water contamination of rivers and dams blocking the entry of light and oxygen. Negative impacts on the ground are also possible as well as the contamination of groundwater. Thus, the use as carbon source of low cost in bioprocesses as production of biomass is a cheap alternative for reuse of this oil. The alperujo is a waste generated during the processing of olive oil, and it is toxic to most microorganisms, due to high concentrations of phenols, organic load and low pH. Thus, the study of the microbiota of this residue made it possible to found microorganisms able to grow on the used soybean oil. That said, the objective of this work was to isolate and characterize the microorganisms of alperujo, as well as the production of microbial biomass, in used soybean oil. For this reason, it was carried out isolation, morphological characterization and identification by MALDI TOF of microorganisms found on alperujo. There was a predominance population of yeasts and filamentous fungi. The bacteria showed a greater diversity of *Bacillus* species, being the predominant genus in the samples. For biomass production, it were made treatments containing *Rhodotorula mucilaginosa* isolation of alperujo and with *Candida rugosa* CCMA 00371, both co-inoculated with *Bacillus subtilis* CCMA 0085 in medium containing (% m/v: 0,075 glucose and 0.375 (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub> PO<sub>4</sub>) in 75 mL of water and 75 mL of reused soybean oil and in a synthetic medium YEPG as positive control. At the end of fermentation, we could observe the biomass production in both ways. The treatment with soybean oil, presented the lowest averages of biomass, but we observed changes in the chemical characteristics of soybean oil, an indication of a possible use as carbon source by microorganisms.

Keywords: Microbiota. Alperujo. Biomass. Soybean Oil. Re-use



## SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	11
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
4.1	Óleo de soja usado.....	12
4.2	A oliveira.....	13
4.3	O azeite.....	14
4.3.1	Extração do Azeite de Oliva.....	16
4.4	Resíduos agroindustriais .....	19
4.4.1	Resíduos obtidos da extração do Azeite de oliva e formas de utilização.....	20
4.5	Microrganismos encontrados no resíduo da produção do Azeite de Oliva.....	24
4.6	Produção de biomassa em bioprocessos.....	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
	SEGUNDA PARTE ARTIGO.....	41
	ARTIGO: Use of spent domestic soybean oil by microorganisms isolated from the solid waste of the alperujo residue.....	42

## **PRIMEIRA PARTE**

## **1 INTRODUÇÃO**

O óleo de soja utilizado em processos de frituras compreende um composto que quando descartado de forma errônea causa graves problemas ambientais. (FERRARI et al. 2005). O óleo de soja é um óleo vegetal, extraído da semente oleaginosa da soja e utilizado domesticamente e industrialmente em alimentos. Sua molécula é formado a partir da união de moléculas triglicérides, ácidos graxos insaturados que são lipídios e glicerol (MORANDIM et al. 2008).

Este óleo após passar por processo de fritura se torna um resíduo, e este quando descartado de maneira errada ao meio ambiente, pode causar poluição de solo, água e do ar (BALDASSO, 2010). Medidas tem sido implementadas com finalidade de reutilização deste óleo, como na produção de biodiesel, sabão e detergentes (SANTOS, 2013).

Novas alternativas para reuso do óleo de soja usado precisam ser criadas, uma alternativa seria a sua utilização em bioprocessos como fonte de carbono de baixo custo, para produção de compostos de interesse.

O azeite de oliva, um dos mais antigos óleos vegetais conhecidos, é extraído da fruta fresca, a partir da utilização de métodos mecânicos ou físicos, que têm a finalidade de liberar as gotículas de óleo que se encontram dentro dos vacúolos das células do mesocarpo da azeitona (ALTIERI et al., 2015).

É crescente a popularidade do azeite de oliva em todo o mundo, não apenas por ser um produto que apresenta propriedades organolépticas únicas, mas também por seus efeitos benéficos à saúde, que estão atribuídos ao seu perfil de ácidos graxos, assim como a presença de numerosos componentes bioativos, como os tocoferóis, os fosfolipídios e os compostos fenólicos (COVAS, 2007).

O azeite de oliva é obtido apenas por processos mecânicos ou físicos em condições nomeadamente térmicas, que não levam a alterações químicas no óleo e que não tenha sofrido tratamentos além da lavagem, decantação,

centrifugação e filtração (GUNSTONE, 2011). Trata-se de uma tarefa difícil, demorada e pouco rentável, pois para cada 5 kg de azeitonas, produz-se em média apenas 1 litro de azeite (BARRANCO, 1998).

Na produção do azeite de oliva diferentes resíduos são gerados, dependendo do método de extração que foi utilizado. Os resíduos gerados durante o processamento do azeite de oliva, se mostram tóxicos para a maioria dos microrganismos, por apresentar altas concentrações de fenóis e baixo pH (AMARAL, 2008). Na literatura são relatados microrganismos isolados a partir da água ruça, no entanto, a microbiota presente no alperujo e seu potencial biotecnológico ainda são pouco conhecidos (BEN SASSI ET AL., 2006).

Apesar das condições desfavoráveis para o crescimento de microrganismos, alguns estudos relatam microrganismos que toleram essas condições e conseguem crescer nestes resíduos. Sendo assim, o estudo da microbiota deste resíduo se faz favorável para o isolamento de microrganismos capazes de se desenvolverem em ambientes adversos, como o óleo de soja usado.

## **4 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **4.1 Óleo de soja usado**

O óleo de soja é um óleo vegetal, extraído da semente oleaginosa da soja e utilizado domesticamente e industrialmente em alimentos. A composição química faz-se pela união de moléculas de triglicerídeos, ou seja, ácidos graxos insaturados e glicerol (MORANDIM et al. 2008; FERRARI et al. 2005).

O óleo de soja apresenta excelente fonte de ácidos graxos essenciais, sendo 50% linoleico e 7% linolênico (7%), além de 24% oleico, e tocoferol (Vitamina E) (MORETTO 1998).

O óleo de soja é mais comumente utilizado em processos de fritura de alimentos em domicílios, empresas e comércios (COSTA NETO et al. 200). Com o grande consumo de alimentos fritos pela população, a geração do resíduo óleo de cozinha usado está cada vez maior. No Brasil no último ano foi produzido 205 milhões de litros de óleo de cozinha usado, onde apenas 2,5 % de todo esse óleo descartado foi reciclado, ou seja, todo o restante foi lançado diretamente no meio ambiente (SABESP 2016). Cada litro de óleo usado em frituras despejado nas redes de esgotos polui cerca de um milhão de litros de água (SABESP, 2016).

O descarte indevido desse óleo na rede de esgoto causa incrustação e entupimento das tubulações e quando estes chegam nos rios e represas causa a contaminação da água, criando uma camada sobre a superfície da água e impedindo assim a entrada de luz e oxigênio, o que pode causar a morte de todo o ecossistema que vive naquele ambiente. No solo esse óleo pode chegar a contaminar os lençóis freáticos ou atrapalhar o desenvolvimento de plantas e microrganismos encontrados naquele lugar. Este resíduo quando entra em contato com os oceanos, reage com a água salgada produzindo gás metano, o que causa um aumento no aquecimento global (SABESP, 2016; MORRIS et al. 2003; ZHANG, 2003)

Planos integrados de gestão de resíduos de diferentes estados brasileiros têm trabalhado a conscientização da população para o descarte correto desse óleo e instalados postos de coletas desse resíduo nas cidades (CELLA, 2002). Algumas alternativas têm sido empregadas para reutilizar este resíduo coletado como, produção de biodiesel, produção de sabão e detergentes e massa de vidraceiro (SANTOS, 2013). Uma alternativa para reutilização deste resíduo é utiliza-lo como substrato para produção de biomassa por microrganismos, sendo uma alternativa com um alto custo benefício.

#### **4.2 A Oliveira**

A oliveira (*Olea europaea Linné*), pertence à família das Oleaceae e é a única espécie desta família que produz frutos comestíveis. É uma das árvores frutíferas mais antigas utilizadas pelo homem, seu cultivo remota há seis mil anos, iniciando-se na região do Mar Morto, expandindo pelo Ocidente e posteriormente pela Bacia do Mediterrâneo, sendo uma planta bem adaptada ao clima subtropical e temperado (EMBRAPA 2014). No Brasil, a oliveira foi introduzida no início do século XIX em quase todos os estados, porém com maior frequência nas regiões Sul e Sudeste (VIEIRA, 2008).

O fruto da oliveira, a azeitona, é constituído em média por 50% de água, 1,6 % de proteínas, 19,1% de carboidratos, 22% de óleo, 5,8% de celulose e 1,5% de minerais (VIEIRA, 2008). A azeitona é uma drupa, constituída por, cutícula, polpa e caroço (Figura 1), onde é encontrada a amêndoa composta pelo embrião, e reservas de nutrientes. O fruto apresenta variação de cores de acordo com a variedade e estado de maturação da azeitona, que vão desde o verde pálido ao negro, passando pelo violáceo ou roxo. (RAMALHEIRO, 2009).

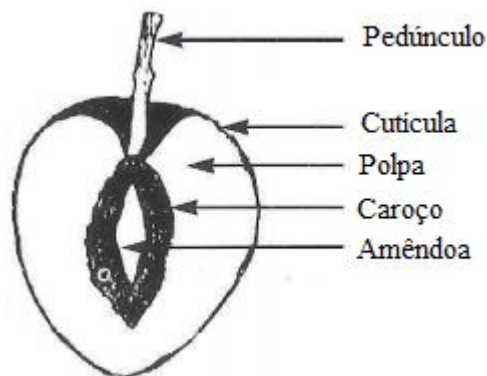


FIGURA 1. Imagem ilustrativa das camadas presentes no fruto azeitona.  
FONTE: Ramalheiro, (2009).

A azeitona in natura possui sabor amargo e forte, devido a presença de oleuropeínas, principal composto fenólico presente nas folhas e no fruto da oliveira. Para que possam ser consumidas, é necessário o uso de alguns processos, sendo comercializadas na forma de conserva, para consumo em mesa, e azeite de oliva (VIEIRA, 2008).

A plantação de oliveiras concentra-se em países do mediterrâneo, que produzem cerca de 3 milhões de toneladas de frutos por ano, sendo responsáveis por aproximadamente 95% da produção mundial, sendo que deste total, 65,9% destes são provenientes de países da União Europeia (COI, 2015), (CHILE OLIVA, 2014). A produção da Argentina e do Chile está ao redor de 0,7% da produção mundial (CHILE OLIVA, 2014). Não possuindo uma produção agrícola para atender ao mercado interno, o Brasil é totalmente dependente da importação de azeitonas em conserva para o consumo em mesa e dos azeites de oliva, sendo o 6º maior consumidor de azeite mundial, ficando abaixo apenas de alguns países da Europa e dos Estados Unidos (EMBRAPA, 2014), (CHILE OLIVA, 2014).

### 4.3 O Azeite

O cultivo da oliveira e a produção de azeite têm aumentado muito nos últimos 15 anos, segundo o Conselho Oleícola Internacional (COI 2015), foram produzidas 2.400 toneladas de azeite a nível mundial na campanha de 2015/2016, valores que se situam acima dos da campanha anterior, 2014/2015, que alcançaram as 2.287 toneladas. Este aumento na produção mundial está diretamente relacionado com o aumento no consumo do azeite de oliva em todo mundo, devido a crescente preocupação com a alimentação, o azeite adquiriu especial relevância pelas propriedades benéficas à saúde humana (COI, 2015).

O azeite de oliva é rico em ácidos graxos e compostos fenólicos, componentes que oferecem grandes benefícios à saúde, devido a várias funções e propriedades biológicas associadas a eles. Em estudos observou-se que o consumo do azeite de oliva rico em compostos fenólicos proporciona efeitos antioxidantes e anti-inflamatório e reduz a proliferação de moléculas de adesão celular (COVAS 2007; FITO TORRE et al., 2007).

As características físico-químicas do azeite de oliva variam de acordo com o tipo de solo, clima, práticas culturais, variedades, estado de maturação do fruto e com as técnicas de extração, podendo assim produzir azeites de diferentes qualidades (MATIAS; LASTA, 2001).

Para ser comercializado o azeite precisa estar de acordo com os padrões da legislação vigente, com base em análises físico-químicas que o qualificarão dentro de determinadas classes específicas (AUED PIMENTEL et al., 2008). No Brasil a qualidade do azeite é determinada pela Resolução número 270 de 22/05/05 da ANVISA (ANVISA, 2005), sendo analisado o nível de acidez do ácido oleico, a composição dos ácidos graxos definidos em cromatografia em fase gasosa, os peróxidos, iodo, refração absoluta e absorvância em ultravioleta (270 e 232 nm). Classificados de acordo com essas características obtêm os seguintes tipos de azeites (ANGELIS, 2011):

- a) Azeite de oliva extra virgem: possuem acidez até 0,8%.



- b) Azeite de oliva: possuem acidez menor que 1%, é obtido somente da azeitona, não sendo obtido através da utilização de solventes ou processos que envolvam a mistura com outros óleos.
- c) Azeite de oliva refinado: possuem acidez maior que 3%, em seu processamento são utilizados solventes que propicia a perda de grande parte dos compostos fenólicos.
- d) Óleo de bagaço de oliva refinado: possui acidez maior que 3%, adquirido através do tratamento do bagaço da azeitona, obtidos com a utilização de solventes ou tratamentos físicos, refinando os óleos obtidos ou misturando com outros óleos.

#### **4.3.1 Extração do Azeite de Oliva**

O azeite de oliva, pode ser produzido de várias maneiras, dependendo muito do tipo de sistema utilizado e o azeite que quer ser obtido. Os princípios são os mesmos, mas os detalhes de produção, as complexidades do processamento e as prioridades são diferentes entre as empresas. O processamento para obtenção do azeite envolve diferentes etapas, desde a limpeza, lavagem das azeitonas, à moenda, batida e a extração propriamente dita, sendo o processo inicial de limpeza e lavagem etapa comum em todos os processos (GARCIA 2004)

Etapas da elaboração do azeite de oliva segundo UCEDA et al. (2006):

- a) Limpeza: retirada de folhas da oliveira, ramos, pedras, etc.
- b) Lavagem: consiste na lavagem das azeitonas.
- c) Pesagem: nesta etapa as azeitonas são pesadas.
- d) Moenda: passadas não mais de 24 horas, as azeitonas são transformadas em uma pasta, através de sua passagem pelo moinho de martelos mecânicos.
- e) Batedura: nesta fase a pasta sofre um batimento lento e contínuo, com um suave aquecimento a baixas temperaturas (25 a 30°C) durante 25 a 30 minutos nos sistemas clássicos de prensas ou 50 minutos nos sistemas de centrifugação. A temperatura não pode ultrapassar os 30°C, pois a partir

desta temperatura a vitamina E, que ajuda a conservar o azeite (evita a oxidação do azeite provocada pelas lipases), começa a desnaturar. Assim a massa fica uniforme e vai-se proporcionando a junção das pequenas gotículas de azeite.

- f) f) Extração do azeite: a extração do azeite pode ser feita através da decantação (processo mais antigo) ou por centrifugação da massa. O processo de centrifugação consiste em sujeitar a massa a um movimento de rotação em alta velocidade o que provoca a separação do azeite das águas e bagaço da azeitona.
- g) g) Filtragem: depois de separado, o azeite é filtrado de modo a retirar partículas que possam existir. O azeite pode ser filtrado apenas uma vez antes de ser embalado ou duas vezes, uma após a extração e outra antes de ser embalado, ou então não ser filtrado.

São três tipos de processos que podem ser utilizados para extração do azeite: sistema de prensa hidráulica, centrifugação contínua de três fases e centrifugação contínua de duas fases (GOMEZ et al., 2010).

#### 1) Sistema de prensa Hidráulica

O sistema de prensas é o mais antigo dos métodos utilizados para a separação do azeite. As azeitonas depois de lavadas, moídas e batidas, formando uma pasta. Esta pasta é prensada e através da pressão exercida (GOMEZ et al., 2010), separa a fase líquida (mistura de azeite e de água residual) da fase sólida (bagaço de azeitona). A fase líquida é em seguida separada por centrifugação ou decantação obtendo-se azeite e um resíduo líquido, conhecido por água ruça. Este sistema é ilustrado na Figura 2.

#### 2) Sistema de centrifugação contínua de três fases

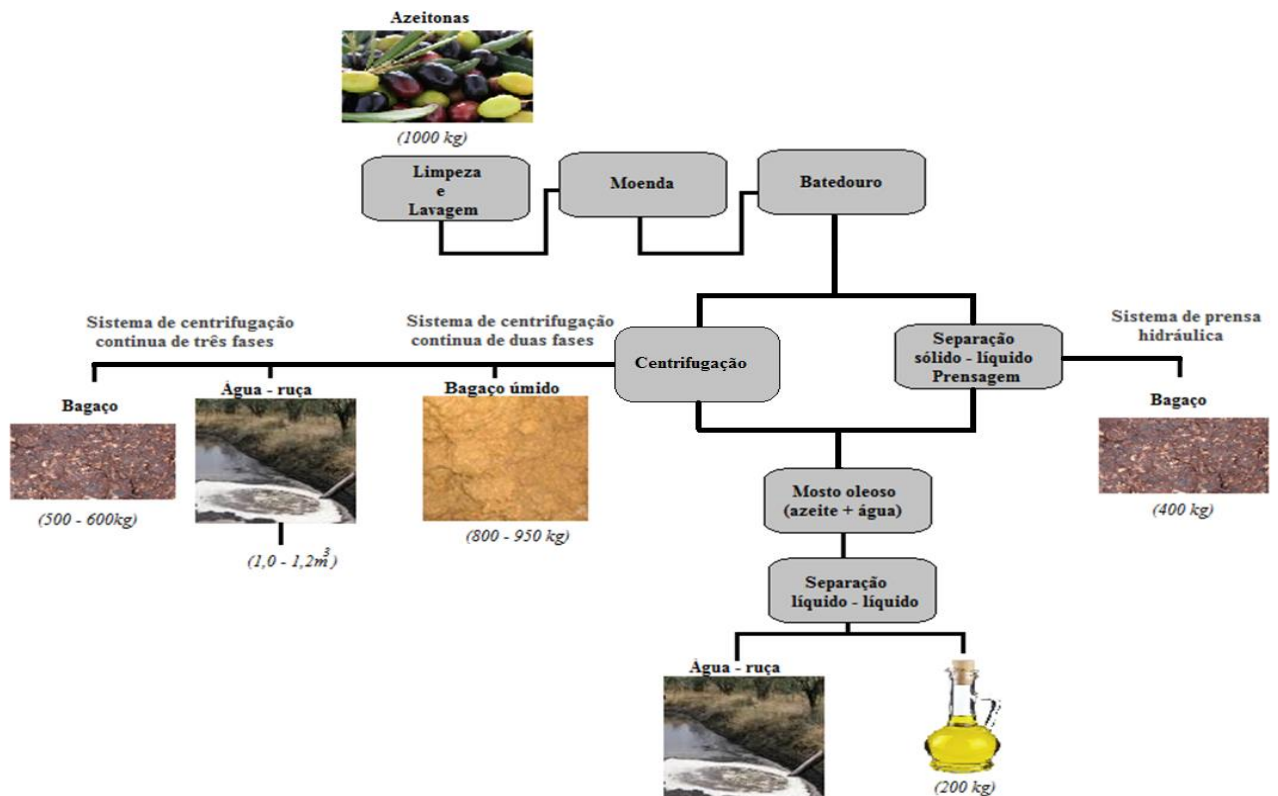
Este é um processo que possibilita aumento da produtividade de azeite. A vantagem deste sistema está na necessidade de uma menor área

industrial para sua instalação, a possibilidade de automatização e uma menor necessidade de mão-de-obra, no entanto suas desvantagens consiste, em necessidade de um maior consumo de água e de energia (AWAD *et al.*, 2006; GOMEZ *et al.*, 2010), uma vez que a pasta deve ser diluída em água quente antes de ser injetada nas centrífugas, e uma maior produção de água ruça. As centrífugas separam o azeite, do bagaço e da água residual por diferença de densidade. O processo não precisa transferir a pasta para os decantadores, o que reduz o custo de produção e permite automatização do processo, possibilitando uma melhor qualidade do azeite obtido (GOMEZ *et al.*, 2010). Este sistema gera uma maior quantidade de água residuária (águas ruças) do que o sistema de prensa hidráulica (SILVA 2009) e está ilustrado na figura 2.

#### Sistema de centrifugação contínua de duas fases

Este sistema foi desenvolvido com o intuito de reduzir a produção de água-ruça, sendo conhecido como sistema ecológico. Em seu processo é utilizado centrífugas que possibilitam a não utilização de água para separação do azeite dos outros resíduos gerados, o que faz com que neste sistema a quantidade de água residuária (água ruça) gerada seja menor (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004). Os subprodutos sólidos (caroço, pele, polpa) e a água de vegetação das azeitonas, juntamente com alguma água adicionada à pasta e a água de lavagem são os únicos resíduos gerados (BORJA *et al.*, 2006; ENEAPAI, 2007). Consequentemente, o bagaço deste sistema tem um teor de humidade maior que ao do anterior, sendo denominado de bagaço húmido. Além de sua economia com a água, esse processamento apresenta vantagem de produzir um azeite com maior estabilidade e com melhores características organolépticas. Sua instalação industrial possui menor custo e não há necessidade de adição de água quente à pasta, diminuindo também o consumo energético da produção (AZBAR *et al.*, 2004). Apesar de todas essas características positivas, a extração de

azeite através deste processo possui um problema ambiental, devido à dificuldade em eliminar e manusear grandes quantidades de bagaço húmido conhecido com lamassa ou alperujo produzidos (SILVA, 2009). Este sistema é ilustrado na figura 2.



3) FIGURA 2. Esquema ilustrativo do sistema de prensa Hidráulica; sistema de centrifugação contínua de três fases e sistema de centrifugação contínua de duas fases para produção do azeite de oliva.

FONTE: Adaptado Awad *et al* (2006).

#### 4.4 Resíduos Agroindustriais

Com os avanços tecnológicos na agroindústria vêm ocorrendo um aumento na produção agrícola em todo mundo, o que gera uma maior

quantidade de resíduos durante todo o processamento (FIGUEIREDO *et al.*, 2010). Dos resíduos gerados, apenas uma pequena parcela é reutilizada durante o processo, provocando um acúmulo excessivo de matéria orgânica na natureza. Apesar de serem biodegradáveis, sua produção se dá em grandes quantidades, de forma intensiva, sendo a taxa de geração muito maior que a taxa de degradação (GODOY *et al.*, 2011; MESSIAS *et al.*, 2011). O acúmulo de resíduos agroindustriais na natureza aumenta a cada ano, causando deterioração do meio ambiente e perda de recursos (SANTOS *et al.*, 2012).

O aproveitamento de resíduos agroindustriais em bioprocessos fornece uma ampla gama de substratos de baixo custo, disponíveis, e extremamente abundantes em países em desenvolvimento (GODOY *et al.*, 2011). Com as inovações biotecnológicas na área das fermentações, novas perspectivas estão sendo criadas. Uma destas, é a aplicação destes resíduos como fonte de carbono em bioprocessos, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos de aroma, produção de biomassa, entre outros (UENOJO; PASTORE, 2007; MESSIAS *et al.*, 2011; REZENFDE *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012).

#### **4.4.1 Resíduos obtidos da extração do Azeite de oliva e formas de utilização**

Os resíduos gerados pela indústria oleícola durante a produção do azeite de oliva dependem do tipo de sistema usado na extração do azeite. Para produção do azeite de oliva, pode ser utilizar três tipos de sistemas: de prensa hidráulica, centrifugação contínua de três fases e centrifugação contínua de duas fases. Estes sistemas geram resíduos com características e em quantidades diferentes. De maneira geral, os resíduos gerados durante o processamento de azeite de oliva, apresentam baixo valor de pH, elevada

salinidade e elevado teor de polifenóis, que potencialmente lhes confere características fitotóxicas (GARCIA, 2004).

O bagaço da azeitona é formado pela polpa e caroço do fruto, contém em sua composição entre 25 e 50% de umidade e 5 a 7% de azeite. Dentre os resíduos produzidos no processamento do azeite é o que causa um menor dano ao meio ambiente. Depois de seco, extrai-se o óleo do bagaço, podendo assim ser utilizados em indústrias de extração de óleo de bagaço (CABRERA CAPITÁN, 1995), sendo o subproduto utilizado como combustível (ARJONA *et al.*,1999). Em processamentos do azeite de oliva que são separados o caroço da azeitona, possibilita-se um melhor reaproveitamento do resíduo gerado, uma vez que aumenta a eficiência de extração do óleo e a polpa pode ser reutilizada para produção de alimento animal (AGUILERA *et al.*, 1986), ou como aditivo orgânico em compostagens utilizadas em processos agrícolas (RAMOS AYERBE, 1986). Os caroços das azeitonas separados durante o processo, ainda podem ser utilizados como combustíveis em fábrica de carvão (Figura 3) (RAMOS SURIA,1986).



FIGURA 3. Imagem ilustrativa do bagaço de azeitona, resíduo proveniente da produção do azeite de oliva utilizando prensa hidráulica ou sistema de centrifugação contínua de três fases.

FONTE: Diário digital Castelo Branco (2014).

A água residuária ou água ruça (Figura 4) é composta pela água de vegetação da azeitona, água utilizada na lavagem dos frutos e a água

adicionada durante a extração do azeite de oliva. Possui coloração e cheiro, que pode variar de acordo com o tempo de armazenamento, assim, quando “fresca”. Apresenta uma coloração avermelhada (ruça) e cheiro idêntico ao do azeite, mas com o decorrer do tempo, a coloração passa a castanho muito escuro ou preto, e o cheiro torna-se fétido (CABRERA CAPITÁN, 1995). Estas características são consequência da sua composição e da ocorrência de processos de degradação biológica, particularmente em anaerobiose. Fatores que podem influenciar na composição da água ruça são, o processo de extração, as condições climáticas, a variedade da cultivar de azeitona utilizada, grau de maturação do fruto, condições e período de armazenamento. De uma forma geral, as águas residuárias são constituídas por 83 a 94% água, 4 a 16% de matéria orgânica e 0,4 a 2,5% de sais minerais (RAMOS-CORMENZANA, 1996). Este resíduo, possui caráter altamente poluente, devido a presença de elevados valores de carga orgânica e presença de compostos fenólicos, lhes conferindo propriedades antimicrobianas e fitotóxica, (CASA *et al.*, 2003). O método de tratamento mais utilizado é a evaporação em bacias a céu aberto, sendo uma opção de baixo investimento necessário para a sua implantação (AZBAR *et al.*, 2004). Este resíduo também dispensado diretamente nos solos como corretivo orgânico e fonte económica de água. Os efeitos desta aplicação têm sido analisados, revelando-se positivos quando se considera a presença de quantidades substanciais de nutrientes (AZBAR *et al.*, 2004).



FIGURA 4. Imagem ilustrativa da água ruça, resíduo proveniente da produção do azeite de oliva utilizando prensa hidráulica ou sistema de centrifugação contínua de três fases.

FONTE: Iniav (2014).

O bagaço úmido, alperujo ou lamassa (Figura 5) é constituído por uma mistura sólido-líquido formada pelo caroço, polpa do fruto, e ainda água de vegetação da azeitona. Tem em sua composição, além da elevada proporção de água (cerca de 65%), 18 a 20 % de celulose e hemicelulose, 13 a 15% lignina (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004, SAMPEDRO *et al.*, 2004) 2,5 a 3,5% de óleos residuais (GIANNOUTSOU *et al.*, 2004; BORJA *et al.*, 2006), e outras matérias orgânicas que incluem açúcares, poli-alcoóis, polifenóis, ácidos graxos voláteis e proteínas (Borja *et al.*, 2002, 2006). Em termos ambientais, este resíduo apesar de ser produzido em menor quantidade que a água residuária, é um subproduto com poucas opções de reaproveitamento em outros sistemas. Apresenta alta concentração de água, sendo pouco rentável em refinarias de óleos (ARJONA *et al.*, 1999). Têm sido feitas tentativas de aplicar o alperujo como fertilizante, alimento animal ou para extração de produtos de elevado valor agregado, porém a demanda de produção ainda é maior que de utilização (FERNANDEZ-BOLAÑOS *et al.*, 2002; GIANNOUTSOU *et al.*, 2004). Como alternativa para a reutilização do alperujo este foi seco e usado para cogeração de energia eléctrica, mas foi percebido presença de açúcares dissolvidos tornando-o pegajoso e difícil de secar. Além disso, após a secagem, identificaram hidrocarbonetos aromáticos policíclicos na sua composição. Estes problemas tornaram necessária a procura de alternativas de reutilização ou tratamento deste resíduo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004; SAMPEDRO *et al.*, 2004).





FIGURA 5. Imagem ilustrativa do alperujo obtido da extração de azeite de oliva pelo sistema de centrifugação de duas fases de Maria da Fé, MG.

FONTE: A autoria própria (2016).

Os resíduos gerados durante os processamentos do azeite de oliva causam grandes problemas ambientais, apesar de possuir possíveis alternativas para reutilização destes, os países com grande produção do azeite de oliva, sofrem com problemas de acúmulo desses resíduos. Na literatura são encontrados vários estudos relatando, quantificando e demonstrando a importância dos constituintes encontrados no resíduo do azeite, mas pouco se encontra de trabalhos que reutilizem esses resíduos em bioprocessos.

#### **4.5 Microrganismos encontrados no resíduo da produção do Azeite de Oliva**

Os resíduos gerados durante o processamento do azeite de oliva, se mostram tóxicos para a maioria dos microrganismos, por apresentarem altas concentrações de fenóis e baixo pH (AMARAL, 2008). Os fungos filamentosos e as leveduras são os microrganismos que apresentam uma maior resistência para sobrevivência nestes resíduos por tolerarem essas condições adversas de crescimento (AMARAL, 2008).

Em estudos com as águas-ruças residuais dos lagares de azeite da região de Marraquexe e Taza, MOUNCIF *et al.* (1993) encontraram uma microbiota formada por leveduras e fungos filamentosos *Pichia* sp, *P. carsoni*, *Debaryomyces hansenii*, *D. castelli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides*, *C. oleophila*, *C. versatilis*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Geotrichum* sp). Em estudos realizados por MILLÁN *et al.* (2000) observou-se a microbiota dos fungos filamentosos presentes nas águas-ruças residuais dos lagares de azeite da província de Xaén (Espanha), onde isolou 50 estirpes pertencentes a 12 gêneros diferentes (*Acremonium butyri*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chalara paradoxa*, *Fusarium*, *Lecytophora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phycomyces*, *Phoma*, *Rhinocladiella*, *Scopulariopsis*).

FEDERICI *et al.* (2011) relataram microbiota bacteriana das águas-ruças residuais do sistema de duas fases composta por *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Microbacterium esteraromaticum*, *Microbacterium indicum*, *Microbacterium foliorum*, *Kocuria palustris*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Pseudomonas stutzeri*, *Tetrathlobacter kashmirensis*, *Bacillus mojavenensis*, *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus caprae*, *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Pusillimonas terraem*, *Pseudomonas stutzeri*.

Em geral, estes estudos realizados por diferentes autores sobre microrganismos isolados da água residuária do azeite de oliva, demonstram a constante presença dos seguintes gêneros de microrganismos: *Penicillium*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Candida*. Isto indica que estes microrganismos provavelmente representam parte da microbiota natural deste resíduo. (ETTAYEBI *et al.*, 2003; MILLAN *et al.*, 2000; BEN SASSI *et al.*, 2008; MORILLO *et al.*, 2008).

Em relação a microbiota presente no resíduo alperujo, S. NTOUGIAS (2012) relatou microrganismos pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Candida*,

*Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Curtobacterium*. Sendo estes gêneros de microrganismos também encontrados nos outros resíduos do processamento do azeite de oliva. Porém, publicações que relatam a microbiota encontrada neste resíduo são escassas, aproximadamente 10 publicações, o que sugere a necessidade de mais pesquisas sobre os microrganismos encontrados nesses resíduos e suas possíveis aplicações.

#### **4.6 Produção de biomassa em bioprocessos**

O uso de microrganismos como alimento ou como suplemento proteico tem atraído grande interesse, pois estes são capazes de crescer em diferentes tipos de subprodutos industriais, produzindo grandes quantidades de células, denominadas proteína unicelular ou proteína microbiana (PARAJÓ *et al.*, 2004.) A biomassa microbiana, considerada como um concentrado proteico natural, contém proteínas completas, com todos os aminoácidos essenciais (VILLAS BÔAS E ESPOSITO, 2000).

A produção de biomassa através da bioconversão de rejeitos agroindustriais tem sido uma alternativa valiosa para as aplicações tradicionais destes resíduos, pois os substratos lignocelulósicos são amplamente disponíveis e de baixo custo, ideais para serem usados na produção de biomassa (SHOJAOSADATI *et al.*, 1999).

As leveduras foram os primeiros microrganismos a serem cultivados em grande escala (LITCHFIELD, 1983). Atualmente, a proteína unicelular tem sido produzida a partir do cultivo de diferentes microrganismos, Algas, leveduras, fungos e bactérias. Entre as algas, as mais utilizadas são as espécies de *Spirulina*. As mais comumente citadas entre as leveduras são as dos gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Saccharomyces*. Entre as bactérias, *Cellulomonas* e *Alcaligenes* são os gêneros mais frequentemente usados, entre os fungos filamentosos os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* são os mais utilizados (PARAJÓ *et al.*, 2004.).

Para o consumo de seres humanos os principais microrganismos utilizados são *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, *Spirulina* e *Chlorella*. Essas espécies são consideradas seguras e aceitas para o consumo humano (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000). As leveduras *S. cerevisiae* e *C. utilis* são especialmente interessantes devido ao seu alto conteúdo proteico, que pode chegar a mais de 50 % (ZIINO *et al.*, 1999).

O alto custo de recuperação da biomassa de bactérias em resíduo de casca de laranja tem limitado sua utilização para produção de biomassa. (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000). As leveduras crescem mais lentamente que as bactérias, mas são capazes de utilizar diferentes substratos e de crescer em baixos valores de pH, com pouco risco de contaminação. Seu tamanho um pouco maior que o das bactérias facilita sua recuperação (RHISHIPAL E PHILIP, 1998). Os fungos filamentosos possuem velocidade específica de crescimento menor que a das leveduras e são cultivados principalmente em resíduos lignocelulósicos, numa ampla faixa de pH (de 3,0 a 8,0) (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000).

O uso da proteína microbiana em rações tem sido reportado em diversos estudos (BROWN, 1996; EL-SAYED, 1999; KIM E LEE, 2000; CHIOU *et al.*, 2001; LEE E KIM, 2001; VILLAS BÔAS, 2001; VILLAS BÔAS, 2002). O desenvolvimento de processos produtivos inovadores e, sobretudo econômicos, tem sido de grande valor na obtenção de proteína para o consumo animal (PHETTEPLACE *et al.*, 2000).

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O óleo de soja utilizado em frituras é outro composto que quando descartado no meio ambiente causa graves problemas ambientais, como poluição da água e do solo. Sendo assim são necessárias novas alternativas para reutilização deste óleo para produção composto de interesse.

Durante a produção do azeite de oliva, diferentes resíduos são gerados e estes possuem carga orgânica e compostos fenólicos elevados, além de possuírem pH ácido. Estes quando descartados no meio ambiente podem causar sérios problemas. Além disso, pouco se conhece sobre a microbiota presente no resíduo sólido do processamento de duas fases, o alperujo. Este por possuir características tão adversas pode apresentar uma microbiota composta por microrganismos com características de interesse biotecnológicos.

Portanto, estudos visando o isolamento, identificação e caracterização dos microrganismos se faz necessário, bem como sua aplicação para degradar e produzir compostos de interesse em resíduos como o óleo de soja reutilizado são necessários.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, CARLA; LUCAS, MARCO S; COUTINHO, JOÃO; CRESPI, ANTONIO L; DO ROSÁRIO A. M; PAIS, CÉLIA. "Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal", **Bioresource Technology** 99, 15: 7215 - 7223. 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 270, de 22 setembro de 2005. **Aprova o Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal**. Brasília, 2005.

AGUILERA JF, MOLINA E, BOZA J. "Nutritional properties of olive residue". Proceedings of International Symposium on Olive By-products **Valorization** (FAO). 447-471. 1986.

ALBUQUERQUE, J; GONZALVÉS, J; GARCÍA, D; CEGARRA, J. "Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction". **Bioresource Technology**, 91:195–200, 2004.

ALTIERI, G.; GENOVESE, F.; TAURIELLO, A.; RENZO, G. C. Innovative plant for the separation of high quality virgin olive oil (VOO) at industrial scale. **Journal of Food Engineering**, n. 166, p. 325-334, 2015.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410. 1990.

ANDRADE, M. J. et al. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 48-58, 2006.

ANGELIS, R. C. Novos conceitos em nutrição. Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. **Arq Gastroenterol**, v.38, n.4, out./dez., 2011

ANUPAMA; RAVINDRA P. Value-added food: single-cell protein. **Biotechnology Advances**, v.18, n.6, p.459-479, 2000.

ANUPAMA; RAVINDRA P. Studies on production of single cell protein by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of rice bran. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, n.1, p.79-88, 2001.

AUED-PIMENTEL, S.; TAKEMOTO, E.; KUMAGAI, E.E.; CANO, C.B. Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo ECN 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. **Revista Química Nova**, v.31, p.31-34, 2008.

ARJONA R, GARCÍA A, OLLERO P. “The drying of alpeorujo, a waste product of the olive oil mill industry”. **Journal of Food Engineering**, 41, 229-234, 1 999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - **AOAC**. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists: 16. ed. Washington:, 1995.

AWAD, A; SALMAN, H; HUNG, Y. “Olive Oil Waste Treatment”. **Taylor & Francis Group, LLC**. 2006.

AZBAR N, BAYRAM A, FILIBELI A, MEUZZINOGLU A, SENGUL F, OZER A. “A review of waste management options in olive oil production”. **Science and Technology**, 34, 209-247. 2004

BARNETT, J.A., PAYNE, R.W., YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**, 3 ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2011, p. 1139.

BARRANCO, D.; TORO, C. DE.; RALLO, L. Épocas de maduración de cultivares de olivo en cordoba. **Investigacion Agraria: Produccion y Proteccion Vegetales**, Madrid, v. 13, n. 3, p. 359-368, 1998.

BEN SASSI, A., BOULARBAH, A., JAOUAD, A., WALKER, G., BOUSSAID, A. A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. **Process Biochem.** 41, 74–78. 2006.

BEN SASSI, A., OUZZANI, N., WALKER, G.M., IBNSOUDA, S., EL MZIBRI, M., BOUSSAID, A. Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast isolates. **Biodegradation** 19, 337–346. 2008.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2005.

BOCCHESI CAC, MARTINELLI JA, MATSUMURA ATS, FEDERIZZI LC, PRESTES AM. Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados de *Pyrenophora chaetomioides*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. **Fitopatologia Brasileira** 28:11-16. 2003

BORJA, R; RINCÓN, B; RAPOSO, F; ALBA, J; MARTÍN. A. “A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature” **Process Biochemistry**, 38:733/742, 2002.



BROWN, M. R.; BARRET, S. M.; VOLKMAN, J. K.; NEARHOS, S. P.; NELL, J. A.; ALLAN, G. L. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve culture. **Aquaculture**, v.143, n.3-4, p.341-360, 1996.

CABRERA CAPITÁN F. “El alpechin: un problema mediterráneo”. In La Calidad de las Aguas Continentales Españolas. **Estado actual e investigación**. Pag. 141-154. Geoforma Ediciones. Logroño. España, 1995.

CASA R, D’ANNIBALE A, PIERUC CETI F, STAZI SR, GIOVANNOZZI SERMANNI G, CASCIO BL. “Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability”. **Chemosphere**, 50, 959-966, 2003.

CELLA, R.C.F.; D’ARCE, M.A.B.R.; SPOTO, M.H.F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.2, p.111-116, 2002.

CHILE OLIVA – Asociacion de Productores de Aceite de Oliva. **Informe Anual del Mercado de Aceite de Oliva – 2015**.

CHIOU, P. W. S. Value of *Aspergillus niger* fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, n.3- 4, p.171-182, 2001.

COI – INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL **Disponível em:** <http://www.internationaloliveoil.org/news/view/686-year-2016-news/662-market-newsletter-december-2015>. Acessado em 2 de janeiro de 2016.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de Biocombustível Alternativo ao Óleo Diesel Através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras. In: **Revista química nova**, n.23, ano 4, p.516, 2000.

COVAS, M. I. Olive oil and the cardiovascular system. **Pharmacol. Res.** 55: 175–86, 2007.

DIARIO DIGITAL – Castelo branco. **Disponível em:** <http://www.diariodigitalcastelobranco.pt/detalhe.php?id=28866>. Acessado em 24 de março de 2016.

EL-SAYED, A.-F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* **Aquaculture**, v.179, n.1, p.149-168, 1999.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultivo de Oliveira (*Olea europaea L.*) Embrapa Clima Temperado Sistemas de Produção, 16. ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica. Dez./2016. Disponível em:[http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/sistema\\_16\\_novo/11\\_merca\\_dos\\_e\\_comercializacao.htm](http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/catalogo/tipo/sistemas/sistema_16_novo/11_merca_dos_e_comercializacao.htm). Acesso em: 12 de jan de 2016.

ERTUGRUL, S.; DONMEZ, G.; TAKAÇ, S. Isolation of lipase producing *Bacillus sp.* from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, n. 149, p. 720-724, 2007.

ETTAYEBI, K., ERRACHIDI, F., JAMAI, L., TAHIRI-JOUTI, M.A., SENDIDE, K., ETTAYEBI, M., Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. **FEMS Microbiol. Lett.** 223, 215–219. 2003.

FEDERICI, E.; PEPI, M.; ESPOSITO, A.; SCARGETTA, S.; FIDATI, L.; GASPERINI, S.; CENCI, G.; ALTIERI, R. Two-phase olive mill waste composting: Community dynamics and functional role of the resident microbiota. **Bioresource Technology**, n. 102, p. 10965-10972, 2011.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja: taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, 28(1), p. 19-23, 2005

FIGUEIRÊDO, MARIA CLÉA BRITO ; RODRIGUES, GERALDO STACHETTI ; CALDEIRA-PIRES, ARMANDO ; ROSA, MORSYLEIDE DE FREITAS ; DE ARAGÃO, FERNANDO ANTÔNIO SOUSA ; VIEIRA, VICENTE DE PAULO PEREIRA BARBOSA ; MOTA, FRANCISCO SUETÔNIO BASTOS . Environmental performance evaluation of agro-industrial innovations part 1: Ambitec-Life Cycle, a methodological approach for considering life cycle thinking. **Journal of Cleaner Production**, v. 18, p. 1366-1375, 2010.

FITO, M., DE LA TORRE, R. AND COVAS, M. I. Olive oil and oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1215–24. 2007.

GARCIA, G. M. Evolución temporal del alperujo procedente de almazara. **Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes**. p. 22-74, 2004.

GÓMEZ, A; ZUBIZARRETA, J; RODRIGUES, M; DOPAZO, C; FUEYO, N. “An estimation of the energy potential of agro-industrial residues in Spain”. **Resources, Conservation and Recycling**, 54:972–984, 2010.

GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38: 945–53. 2011.

GUNSTONE, F. D. Vegetable Oils in Food Technology – Composition, Properties and Uses - 2<sup>nd</sup> ed. **Wiley-Blackwell**, p. 262, 2011.

INIAV – Instituto nacional de investigação agrária e veterinária. Utilização de subprodutos da indústria de extração de azeite como matéria fertilizante. **Disponível em:** [http://www.iniaiv.pt/fotos/editor2/cristina\\_sempiterno.pdf](http://www.iniaiv.pt/fotos/editor2/cristina_sempiterno.pdf). Acessado em 24 de março de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA, “**Estatísticas Agrícolas 2013**”. Edição 2014. ISSN 0079-4139, 2010.

JIN, B. et al. A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. **Advances in Environmental Research**, v.6, p.179-189, 2002.

KASANA R. C. et al. A Rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

KIM, J. K.; LEE, B.-K. Mass production of *Rhodospseudomonas palustris* as diet for aquaculture. **Aquacultural Engineering**, v.23, n.4, p.281-293, 2000.

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. (Eds.). **The Yeasts a Taxonomic Study**, 4 Edition. Elsevier, Amsterdam, 2011. p. 756–762.

LEE, B.-K.; KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in diferente culture types. **Aquacultural Engineering**, v.25, n.2, p.111-124, 2001.

LEISTRITZ, F. L.; HODUR, N. M.; SENECHAL, D. M.; STOWERS, M. D.; MCCALLA, D.; SAFFRON, C. M. **Biorefineries Using Agricultural Residue Feedstock in the Great Plains**, 2007.

LITCHFIELD, J. H. Single-cell proteins. **Science**, v.219, p.740-746, 1983.

MCALEECE, N. Biodiversity professional statistics analysis software. London: **Scottish Association for Marine and Natural History Museum**, 1997.

MATIAS, A. C.; LASTA, F. D. *Calidad y estabilidad del aceite de oliva*. Olivo: Estación **Experimental Agropecuária Catamarca**. p. 118-123. 2001.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32 (2): 213- 234. 2011.

MILLÁN, B.; LUCAS, R.; ROBLES, A.; GARCÍA, T.; CIENFUEGOS, G. A.; GÁLVEZ, A. A study on the microbiota from olive-mill wastewater (OMW) disposal lagoons, with emphasis on filamentous fungi and their biodegradative potential. **Microbiological Research**, n. 155, p. 143-147, 2000.

MORANDIM, A. A.; RIBEIRO, R. L.; SANTOS, R. O.; COMPRI, I. G.; TORRES, R. B. Estudo comparativo da produção de biodiesel proveniente do óleo de fritura e do óleo de soja. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL**,. p. 164-178, 2008.

MORETTO, ELIANE; FETT, ROSEANE. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. São Paulo: **Varela Editora e Livraria Ltda**, 1998.

MORILLO, J.A., AGUILERA, M., RAMOS-CORMENZANA, A., MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M., Production of a metal binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate. **Curr. Microbiol.** 53, 189– 193. 2006.

MORILLO, J.A., AGUILERA, M., ANTÍZAR-LADISLAO, B., FUENTES, S., RAMOS-CORMENZANA, A., RUSSELL, N.J., MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M.,Molecular microbial and chemical investigation of the bioremediation of two-phase olive mill waste using laboratory-scale bioreactors. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 79, 309–317. 2008.

MORRIS, R.E.; POLLACK, A.K.; JIA, Y. Impact of biodiesel fuels on air quality and human health summary report. **Environ International** Corporation Novato, Califórnia, 2003. 53p.

MOUNCIF, M.; TAMOH, S.; FAID, M.; ACHKARIA-BEGDOURI, A. A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco. **Grasas y Aceites**, n. 44, p. 335-338, 1993.

NIELSEN, D. S. et al..The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-depenent and culture independent methods. International Journal of **Food Microbiology**, v. 114, p. 168e186, 2001.

NTOUGIAS S, BOURTZIS K, TSIAMIS G. The microbiology of olive mill wastes. **Biomed Res Int** 2013.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., SOCCOL, V.T., VANDENBERGHE, L.P.S., MOHAN, R. Technological potential of agro-industrial residues. II:cassava bagasse. **Bioresouce Technology**, 74:81-87. 2000.

PARAJÓ, J.C., GARROTE, G., CRUZ., DOMINGUEZ, H. Production of xylooligosaccharides by autohidrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*, 15:115-120. 2004.

PERES, J.A.; DOMÍNGUEZ, J.R.; GARCIA, J.; BELTRAN-HEREDIA, J.; BOAVENTURA, R.; "Tratamento integrado de efluentes de lagares de azeite: reagente de Fenton conjugado com processo biológico aeróbio", Proceedings da Chempor **International Chemical Engineering Conference**, Coimbra, 21 – 23 Setembro 2005

RAMALHEIRO, J. “Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades”. **Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa**. 2009.

RAMOS AYERBE F. “Application for extracted olive residue”. **Proceedings of International Symposium on Olive By-products Valorization** (FAO). 365-370. 1986.

RAMOS SURIA R. “Extracted olive residue as an energy source”. **Proceedings of International Symposium on Olive By-products Valorization** (FAO). 518-525. 1986.

REZENDE, C.R., LIMA, M.A., MAZIERO, P., AZEVEDO, E.R., GARCIA, W., POLIKARPOV, I. Sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuel**, 4:54. 2011.

SABESP. Programa de Reciclagem de Óleo de Fritura da Sabesp. Disponível em: [http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp\\_doctos/programa\\_reciclagem\\_oleo\\_com\\_pleto.pdf](http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/programa_reciclagem_oleo_com_pleto.pdf). Acesso em 11/06/2016

SAMPEDRO I, ARANDA E, MARTÍN J, GARCIA-GARRIDO JM, GARCIA-ROMERA I, OCAMPO JÁ. “Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues”. **Applied Soil Ecology**, 26, 149-156. 2004.

SAENZ, A. J. et al. Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.13, p. 1580–1585, 1999.

SANTOS, A. M; et al. Fabricação de sabão ecológico: Uma alternativa para o desenvolvimento sustentável. In: **III Conferencia Internacional de Gestão de Resíduos Sólidos**, p. 1641, 2013.

SANTOS, F.A., QUEIRÓZ, J.H., COLODETTE, J.L., FERNANDES, S.A., GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quim Nova**, 35:1004-1010. 2012.



SHOJAOSADATI, S. A.; FARAIDOUNI, R.; MADADI-NOUEI, A.; MOHAMADPOUR, I. Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*. **Resources, Conservation and Recycling**, v.27, n.1-2, p.73-87, 1999.

SILVA, A. M. de; LUCENA, A. D. Aspectos da sustentabilidade na reciclagem do óleo proveniente de fritura - o caso do Projeto Soluz. **In: IV SEPRONE**, Fortaleza, CE, 2009.

SILVA, C. “Aplicación directa de residuos de almazaras de dos fases en un olivar con riego localizado: Efectos en las propiedades edáficas y el cultivo”**Facultad de Ciencias; Universidad de Extremadura**. 2009.

SILVA, M. V.; et. al. Reciclagem de óleos residuais para a produção de sabão no município de Itapetinga-BA. Extensio: **Revista Eletrônica de Extensão**, v. 9, p. 106-120, 2012.

UCEDA, M.; JIMÉNEZ, A.; BELTRÁN, G.; GARCIA-ORTIZ, C.; AGUILERA, M. P. Elaboração de azeite de oliva de qualidade. **Informe Agropecuário**. Azeitona e azeite de oliva: tecnologias de produção, v. 27, n. 231, p. 90-97, 2006.

UENOJO, M, PASTORE, G.M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, 30:388-394. 2007.

VIEIRA NETO, João; OLIVEIRA, Adelson Francisco de; OLIVEIRA, Nilton Caetano de; DUARTE, Henrique da Silva Silveira; GONÇALVES, Emerson Dias. **Aspectos técnicos da cultura da oliveira**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2008. 56 p. (EPAMIG. Boletim Técnico, 88).

VILLAS BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã: enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado **Biocologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.14, p.38-42, 2000.

ZIINO, M.; LO CURTO, R. B.; SALVO, F.; SIGNORINO, D.; CHIOFALO, B.; GIUFFRIDA, D. Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture. **Bioresource Technology**, v.67, n.1, p.7- 11, 1999.

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

ZHENG, S.; KATES, M.; DUBE, M. A.; MCLEANA, D. D. Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 3, p. 267-272, 2006

## SEGUNDA PARTE

### **Use of spent domestic soybean oil by microorganisms isolated from the solid waste of the alperujo residue**

Elaborado de acordo com as normas do periódico Biomass and waste valorization

## ABSTRACT

In the processing of olive oil, different types of waste are generated depending on the method of extraction: Olive-pomace oil, water-ruça and solid residue or alperujo. These wastes are generated in large quantities, since only 25% of the olive is used for extraction of oil, and all the remainder corresponding to water, peel, pulp and seed which represent the composition of the waste generated. Of these, the solid residue is produced in greater proportion, once every 1000 kg of olives used in the process of extraction of the olive oil are generated 800 to 950 kg of waste. These wastes are characterized by the presence of phenolic and organic compounds, acid pH and low water activity. Thus, indigenous microorganisms of this residue can present physiological characteristics of biotechnological interest. In this sense, the objective of this work was to isolate and characterize the microbiota present on alperujo, and select Lipolytics microorganisms with capacity of growth in culture medium containing used soybean oil. The microorganisms were isolated and identified by analyzes of the protein profile (MALDI-TOF). We observed a predominance of yeast population in the order of  $6.20 \log \text{ cfu mL}^{-1}$ . The greatest diversity of species, was observed by bacteria, especially of the genus *Bacillus*. For biomass production, were made treatments containing *Rhodotorula mucilaginosa* previously selected of alperujo in specific culture medium for microorganisms producers of lipase and *Candida rugosa* CCMA 00371, both co-inoculated with *Bacillus subtilis* CCMA 0085 in medium containing (% m/v: 0,075 glucose and 0.375  $(\text{NH}_4)_3 \text{PO}_4$ ) in 75 mL of water and 75 mL of reused soybean oil in a synthetic medium YEPG as positive control. There was a growth of inoculated microorganisms in oil, producing biomass with average values of 0.089850.08225g g g, 0.078550.090050.1879g and g, respectively, for the strains of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 and *Candida rugosa* CCMA 00371, the production of biomass was satisfactory, but it will be necessary future studies to the achievement of optimize this process. In addition, at the end of fermentation could be noted changes in chemical characteristics such as iodine index and saponification of used soybean oil in the fermentation process, which is an indication of the use of soybean oil as carbon source by microorganisms.

Keywords: Microbial diversity Alperujo. Biomass. Soybean Oil.

## INTRODUCTION

The olive oil, one of the oldest known vegetable oils, is extracted from fresh fruit, from the use of mechanical or physical methods, with the purpose of releasing the oil droplets that are within the vacuoles of cells of the olive mesocarp (ALTIERI *et al.*, 2015).

In recent years there has been an increase in the popularity of olive oil around the world (IOC, 2015). This is directly related with the increasing concern with healthy food, olive oil has acquired special relevance due to its beneficial properties to human health (IOC, 2015). These are assigned to your profile of fatty acids, as well as the presence of numerous bioactive components, such as the TOCOPHEROLS, the phospholipids and phenolic compounds (BURROWS, 2007). The quality of olive oil can vary according to the climate, soil fertility, variety of olives, as well as the process of extraction of the olive oil used (MATIAS; LASTA, 2001).

During the production of olive oil different residues are generated, the amount and the type produced will depend of the extraction method used (Gómez *et al.*, 2010). In the system of presses and continuous system of three phases, the products and sub-products formed are: olive oil, ruça water and olive pomace, while in the system of two phases it is formed the olive oil and the alperujo (GARCIA, 2004). In the lattest one every 5 kg of olives, produces only an average of 1 liter of oil, thus a process that generates enormous quantities of waste (SILVA, 2009).

The sub-products generated during the processing of the olive oil, are toxic for most organisms, by presenting high concentrations of phenols and low pH (AMARAL, 2008). Despite of unfavorable conditions for the growth of microorganisms, some genres such as *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Novosphingobium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* and *Candida* have already been isolated from Water ruça (ETTAYEBI *et al.*, 2003). However, little is known about the microbiota present on alperujo and its potential of biotechnology (BEN SASSI ET AL, 2006).

Some isolated microorganisms of alperujo feature as physiological characteristics, the ability to change the lipids of the membrane, ensuring a greater tolerance to these conditions of acid pH and high concentration of oil in the environment, as well as the use of phenolic compounds as the sole carbon source (FEDERICI *et al.* 2011; KRASTANOV *et al.* 2013).

The consumption of fried food is well disseminated and used by the whole world population. So there is a generation of millions of liters of oil for domestic use whose small portion is reused for the production of soap and detergent, biodiesel and glazier mass (SANTOS, 2001). However, a large part of the volume produced is disposed incorrectly in the environment causing serious damages, such as contamination of soil, groundwater and rivers preventing the entry of light and oxygen and its accumulation produces methane gas (BALDASSO, 2010; SILVA, 2012).

Thus, the BIOPROCESSES are low-cost alternatives for reuse of this byproduct, for example the biomass production for animal feed (GODOY, 2011; SANTOS, 2013).

By presenting favorable physiological conditions to the development in a substrate containing oil, lipolytic microorganisms isolated from the solid residue from the processing of olive oil, can be used in the production of biomass for animal feed, in culture medium composed of used cooking oil. The objective of this work was to isolate, identify and characterization of microorganisms present in the alperujo, as well as to evaluate its growth capacity in used cooking oil.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Collection of the samples of alperujo**

The sub-product, alperujo, was collected in an experimental farm of the Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), in the city of Maria da Fé at the southern region of Minas Gerais, Brazil (Figure 1) derived from the processing of olive oil, by the system of two phases. The

samples were collected in two consecutive years, 2015 and 2016. After collection, the samples were refrigerated and immediately taken to the Laboratory of Environmental and Industrial Microbiology, located in the Department of Biology of the Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil, for the achievement of physical-chemical analysis and microbiological analysis.



**FIGURE 1.** Illustrative image of solid residue, alperujo, obtained from the extraction of olive oil by centrifugation system of two phases of Maria da Fé, MG.

Source: Author itself (2016).

### **Physico-chemical analysis of alperujo**

The Analyzes consisted of pH measurements with digital pH meter and crude protein was dosed using the conversion factor of 6.25 ( $N \times 6.25$ ). The samples also were subjected to analysis of the presence of alkaloids, volatile aromatic hydrocarbons, esters, fatty acids and halogenated hydrocarbon compound in GC - MS. For the identification of the compounds it was used a chromatograph (Shimadzu, Model GC-MS QP 2010) equipped with a fused silica capillary column model Rtx®- 5MS and stationary phase (5% diphenyl, 95% DIMETHYLPOLYSILOXANE). We used helium gas drag with a constant flow rate of 1 ml/min. The column temperature was 80 °C during 1 minute and 20 ° C min ramp to 250 °C for 15 minutes, with injector temperature of 250 ° C.

The identification of compounds was performed using automated software to mass spectral identification (AMDIS) v. 2.63 and the NIST search software of mass spectra v. 1.7, both programs provided by the database (Washington-DC, USA). The identification of the detected compounds was performed by comparing them with the library of mass spectra in comparison with alkane that were reported in the literature.

### **Isolation of total and lipolytics microorganisms**

Samples from the year of 2015 were divided into enriched and not enriched samples. For the enrichment process, the product was dried in a forced ventilation oven at 65°C for 24h. At the time of drying, the samples were crushed in a blender and sieved in a 0.71mm sieve (with modifications, ERTUGRUL *et al.*, 2007). The sample was enriched in the proportion (1:1), where 5g of dried and crushed and more 5g of in natura residue were added to 10 ml of nutrient broth (% m/v: 0.3 beef extract and peptone 0.5). The byproduct was incubated in BOD at 30°C for 24h. The sample of the year 2016, has not been subject to enrichment.

All samples were plated on surface by serial deciamal dilution. For plating the samples were diluted in a proportion of 10g of residue for 90ml of peptone water (0.1%) (% w/v: soy peptone 0.1), and homogenized in shaker for 30 min at 28°C with an agitation of 130 rpm. The samples were plated on nutrient agar (NA) (% m/v: 0.3 beef extract and peptone agar 0.5, 1.5), to count the total microbiota; Nutrient Agar plus nystatin (% m/v: 0.3 beef extract, 0.5 peptone agar 1, 1.5 mL of Nystatin) for counting bacteria; YEPG (% m/v: 1.0 peptone, yeast extract 1.0, 2.0 and 1.5 glucose agar, with pH 3.5) for counting of yeasts, Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC) (% m/v: 0.5 peptone glucose, 1.0, 0.1, 0.05 potassium dihydrogen phosphate Magnesium sulphate, 0.003g dichloran, 0,025 rose bengal, 15G, 0,1G Chloramphenicol agar) for counting of filamentous fungi and yeasts, potato dextrose agar (PDA) (% m/v: 20.0 infusion of potato dextrose agar 2.0, 1.5) for counting of filamentous fungi Agar and CMC (% m/v: 1.0 peptone, yeast extract 1.0, 2.0 and 1.5 glucose agar, with pH 3.5)



m/v: 0.2% NaNO<sub>3</sub>, 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05, MgSO<sub>4</sub>, 0.05, KCl, 0.2, carboxymethylcellulose (CMC), 0.02, and 1.7 peptone agar) for counting of microorganisms producers of cellulase and lipolytic microorganisms in the middle for lipase producers (% m/v: 1.0 peptone, 9.4 NaCl, 0,001 of CaCl<sub>2</sub>, and 1.5 of agar, 1 mL of Tween - 20 with pH 6) (BOCCHESE (2003)). The Petri dishes were incubated in BOD, at 30°C, for up to 72 hours in triplicate.

### **Macroscopic and microscopic Characterization, and protein profile characterization by MALDI-TOF**

After the incubation period the colonies were morphologically characterized, counted and randomly selected for isolation. The isolates were purified from bacteria, filamentous fungi and yeasts. The bacterial isolates were characterized using differential staining of Gram (GRAM, 1884).

The isolates were purified and characterized, preserved in YEPG plus glycerol 40% and maintained at the Laboratory of Environmental and Industrial Microbiology of the Department of Biology- UFLA.

All strains of bacteria, yeasts and filamentous fungi were subjected to analysis of protein profile by MALDI-TOF Mass Spectrometry (MS). For this analysis, the bacteria were cultured in NA and the yeasts and filamentous fungi grew in YEPG during 24 hours at 28 ° C. Small portions of cells were transferred to microtubes, added 6 µL of ethanol (33.3%): acetonitrila (33.3%): trifluoracético acid (33.3%) for bacteria and formic acid 70% for yeasts and filamentous fungi (MIGUEL *et al.*, 2017). The tubes were agitated on a vortex mixer for one minute and subsequently sonicated for five minutes.

An aliquot of 0,7µL of each cell suspension was transferred to the MALDI-TOF plate and added 1 µL of the solution matrix of alpha acid - Cyan - 4 - hydroxy cinnamic (HCCA) on each sample being mixed gently. All plates of reading were dried at ambient temperature. Each sample was performed in triplicate.

A strain of *Escherichia coli* was obtained from the collection of culture of public portuguese Micoteca from the University of Minho (MUM, [www.micoteca.deb.uminho.pt](http://www.micoteca.deb.uminho.pt)), being used as a standard for calibration of the appliance. The cells of *E. coli* BST were cultured on agar Luria-Bertani (LB; %w/v: bactotripton 1.0, 0.5, 1.0 extract bacto yeast NaCl) at 37°C for 20 hours. After growth, it was added to the plate and treated as described for bacteria.

The specters were acquired using a mass spectrometer Microflex (Bruker Daltonics). Each spectrum was generated by the sum of 240 laser pulses accumulated by profile. The list of resulting peaks was exported to the Maldi Biotyper software package 3.0 (version 3.0; Bruker Daltonics GmbH). Peaks of individual samples were compared with reference specters, with scores above 1.7.

### **Molecular characterization of microorganisms**

The genomic DNA was extracted from pure cultures, using Instagene (Bio-Rad, Deutschland) according to the manufacturer's instructions. The analysis of gene sequence of 16S rRNA region in bacteria and its region of the rRNA in yeast. For the amplification of the region 16S it were used primers 27f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 5'3') and 1512R (ACGGCTACCTTGTTACGACT 5' 3') (Devereux et al., 2004). For ITS region were used primers ITS1F (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') and ITS4R (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') (WHITE et al., 1990).

The reaction happened in a thermocycler, using the following components for each 25µL reaction: 9.5 µL of Milli-Q water; 1 µL of DNA in the sample; 2 µL of primers, 12.5 µL of TopTaq Master Mix kit, which contains Taq polymerase, dNTPs and MgCl<sub>2</sub>, which is a co-factor for the reaction (NIELSEN *et al.*, 2007).

The PCR was performed in 30 cycles of denaturation (95°C), annealing (55°C) and extension (65°C) with a duration of 30 seconds, 1 minute and 8 minutes respectively. In the beginning there is still a phase of

initial denaturation (94°C) for 5 minutes duration and at the end another phase of final extension of 16 minutes (65°C) totaling a process of approximately 1h and 45 minutes (ANDRADE *et al.*, 2006).

The product of PCR was applied on 1.5% agarose gel (1.5% gel agarose, diluted in TAE Buffer 50X), followed by electrophoresis at 70V for 30 minutes, with race TAE Buffer 50X (242 g of Tris; 57.1 mL of glacial acetic acid; 100 mL of EDTA 0.5 M pH 8.0; 1000 mL of water Milli-Q q.S.P.). Each sample was added the dye SYBR Green, who after the race in the electrophoresis gel, allowed the visualization of the bands formed by emission of fluorescence in ultraviolet light.

The PCR products amplified were sent for sequencing. The sequences obtained were compared regarding the similarity with sequences of the same regions. An isolated will be assigned to species with the largest sequence of corresponding identity.

### **Collection and chemical analysis of used cooking oil**

Cooking oil was collected in households of the city of Lavras - MG, Brazil, whose use was made only once.

pH and chemical analysis of the following parameters: Acidity - free fatty acids, index of refraction, saponification, density, iodine and peroxid were supplied by the laboratory of chemistry of G-oil from Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, Brazil.

### **Biomass production using cooking oil as a growing medium**

For biomass production reusing the soybean oil, were used the strains of yeasts: UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144, all belonging to the species *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from an environment of alperujo residue that exhibited lipolytic activity in lipase production médium. The *Candida rugosa* CCMA 00371, isolated from an indigenous tarubá drink of manioc, was used as a control organismo, because it is considered lipolytic. *Bacillus subtilis* CCMA 0085

previously isolated from the cerrado fruit Marolo, for presenting emulsifiers characteristics was inoculated in consortium with both strains. For fermentation was prepared medium containing (% m/v): 0.075 g glucose and 0.375 g(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> in 75 mL of water and 75 mL of used soybean oil. The production of biomass was performed in duplicate for each treatment, in flasks of 250 mL containing 150 mL of the means of production. For the first treatment the *Rhodotorula mucilaginosa*, UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144, were inoculated separately in consortium with *Bacillus subtilis* CCMA 0085. For incubation, this was grown in NA medium for 24 h until a population of 10<sup>8</sup> CFU / mL standardized on McFarland 1 scale with final population of (3x10<sup>8</sup> CFU / mL) was obtained, its cells washed, centrifuged and inoculated in the medium for the production of biomass. The isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* were grown in YEPG medium for 24h, where cells were counted in Neubauer's chamber until a population of 1x10<sup>9</sup> CFU / ml were obtained, these cells were washed, centrifuged and inoculated after 24h of incubation of *Bacillus subtilis* CCMA 0085. The second treatment occurred with the inoculation of *Candida rugosa* CCMA 00371 in consortium with *Bacillus subtilis* CCMA 0085, the preparation of the inoculum being the same described for the first treatment. For incubation *Bacillus* was standardized on the McFarland 1 scale (3x10<sup>8</sup> CFU / ml), *Candida rugosa* CCMA 00371 was inoculated 1x10<sup>9</sup> CFU / ml after 24h incubation of *Bacillus subtilis* CCMA 0085. The assays were incubated in shaker with shaking at 160 rpm to 30 ° C for 7 days in the absence of light as described by GATTO et al .; (2006), with modifications. Samples were removed every 24 hours for evaluation of yeast cell growth by counting in the Neubauer chamber. At the end of the fermentation, for biomass determination, the tests were centrifuged (5000 × g and 4 ° C for 10 minutes) and the cell mass was quantified after oven drying at 65 ° C until constant mass.

As a control, tests were performed in duplicate using the medium of cultivation YEPG, according to methodology cited above.

### **Anti-nutritional analysis of microbial biomass produced**

The microbial DNA and RNA were extracted with the InstaGene™ Kit according to the manufacturer's specifications and quantified by spectrometry at 230 nm using Nanodrop ND 1000. The obtained absorbances were converted to a percentage of the final biomass content (SILVA et al, 2011).

### **Analysis of soybean oil**

At the end of the experiment, the fermented soybean oil was sent for chemical analysis of the following parameters: of acidity - free fatty acids, index of refraction, saponification, density, iodine and peroxid. All analyzes were performed in the laboratory of chemistry of G-oil from Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, Brazil.

## **RESULTS**

### **Physico-chemical analysis of alperujo**

In general, it can be observed that the values of pH and protein in the two samples were very similar. The major difference was in the composition of volatile compounds. In the year 2015, the sample presented a greater variety of compounds when compared to those identified in the solid residue sample of 2016.

**TABLE 1.** Physical-chemical characteristics of alperujo samples collected in the years 2015 and 2016.

	Alperujo 2015	Alperujo 2016
<b>Parameters</b>		
pH	4.94	5.02
Protein (%)	15.33	16.01
1,2-Benzenedicarboxylic acid	P	P
Acetic acid	P	-
Benzoic acid	-	P
Butanedioic acid	P	-
Butanoic acid	P	-
Heptanoic acid	P	P
Palmitoleic acid	P	P
Propanoic acid	P	-
Oleic acid	P	P
1-Butanol	P	-
6-Heptenoic acid	P	-
Benzeneacetic acid	P	-
Decanoic acid	P	P
Ethyl 9-hexadecenoate	P	-
Hexadecane	-	P
Isopentyl hexanoate	P	P
Benzyl alcohol	P	P
Phenylethyl Alcohol	P	P
Phenol	P	P
4-ethyl phenol	P	P

\*P – Composed this

### **Isolation, purification and characterization of microorganisms of Alperujo**

Were counted a total of 1.845 colonies of bacteria, filamentous fungi and yeasts of amotras year 2015 and year 2016 of alperujo. Of these 560 were colonies of yeasts, characterized in 30 morphotypes, represented by 116 isolates purified. The bacteria totaled 1.102 colonies, characterized in 27 different morphotypes that corresponded to 84 isolates purified. From the isolation of filamentous fungi were obtained from 183 colonies, totalizing 13 morphotypes of caraterizadas for 68 isolates purified. Totaling 268 isolated microorganisms.

Of the culture media used for isolation, total population was 8.26 log CFU mL<sup>-1</sup> in YEPG medium, 8.42 log CFU mL<sup>-1</sup> in AN medium, 3.90 log CFU mL<sup>-1</sup> in AN medium with nystatin, 5.73 log UFC mL<sup>-1</sup> in DRBC medium, 8.37 log CFU mL<sup>-1</sup> in BDA medium, 3.65 log CFU mL<sup>-1</sup> in medium for lipase producing microorganisms and 4.64 log CFU mL<sup>-1</sup> in CMC medium.

### **Identification of isolated**

All 268 purified isolates were submitted to the identification by MALDI-TOF and sequencing of the rDNA being 76.4.4% identified at least until the genre. It was not possible to identify 23.6% of the isolates.

From the MALDI-TOF analysis it was obtained 17 different species (Table 2) being 11 bacteria, 4 yeasts and filamentous fungi 1. For all isolates was considering the score on the MALDI-TOF analysis greater than or equal to 1.7, which reflects the similarity between the sample and the reference spectrum (Table 2).

With analysis of the rDNA sequencing identified a total of 4 different species (Table 2), being 2 bacteria and 2 yeasts.

The mean total microbial population identified in the 2015 and 2016 samples was around 18.50 log CFU mL<sup>-1</sup>. The yeasts were the dominant group, 9.20 log CFU mL<sup>-1</sup>, followed by the filamentous fungus 7.51 log CFU mL<sup>-1</sup> and finally by bacteria 6.29 log CFU mL<sup>-1</sup>.

**TABLE 2.** Microorganisms isolated from the solid residue from the system of two presses of the processing of olive oil - Alperujo. Score obtained for the isolates in the evaluation of MALDI-TOF and sequencing of the rDNA.

	Isolates number	Score MALDI-TOF	Sequencing	
			% ID	Access number
<b>Bacteria</b>				
<i>Acetobacter syzygii</i>	6	-	99%	HM218259.1; HM218019.1
<i>Acetobacter tropicalis</i>	7	-	100%	CP022699.1
<i>Bacillus altitudinis</i>	1	> 1.7		
<i>Bacillus cereus</i>	3	>2.1	100%	KY476295.1; HE995766.1
<i>Bacillus megaterium</i>	4	>2.0		
<i>Bacillus mycoides</i>	2	>1.7		
<i>Bacillus subtilis</i>	1	>2.0		
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1	>1.9		
<i>Curtobacterium sp</i>	2	>1.7		
<i>Kocuria kristinae</i>	2	>2.1		
<i>Lactobacillus paracasei</i>	6	> 2.1		
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	> 1.9		
<i>Lactococcus lactis</i>	5	> 2.1		
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	3	> 1.7		
<b>Yeasts</b>				
<i>Candida krusei</i>	30	> 2.0		
<i>Pichia manshurica</i>	46	> 2.0	100%	KP895600.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4	> 1.8		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9	> 2.0		
<b>Filamentous fungi</b>				
<i>Geotrichum silvicola</i>	39	> 2.0		



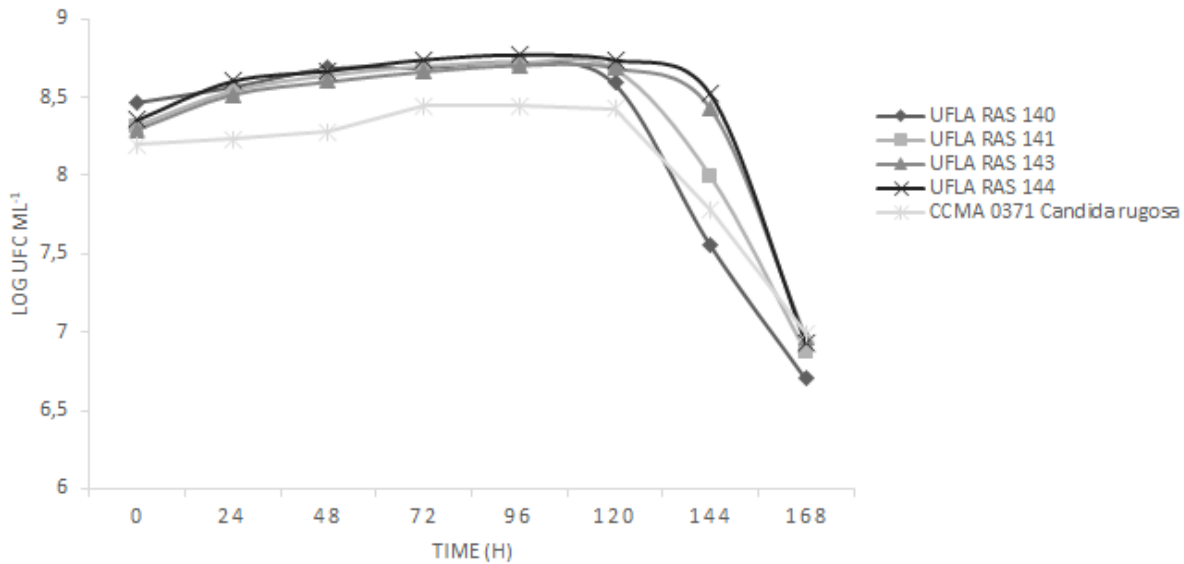
Bacteria were the microorganisms that presented the greatest diversity of species, being *Bacillus* the predominant group. The yeasts are second group of microorganisms that presented a greater diversity of species, followed by the filamentous fungus with only one species identified.

### **Production of biomass using re-used soybean oil**

The fermentation was carried out with the inoculation of different strains of yeasts in a consortium with *Bacillus subtilis* CCMA 0085, in culture medium containing soybean oil and 0.25% glucose as carbon source,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  as source of nitrogen and phosphate.

The isolates of *Rhodotorula mucilaginosa*, UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 showed very similar growth kinetics. In the first 48 hours after inoculation, there was an increase in the number of cells reaching  $8.7 \cdot 10^8 \text{ CFU}^{-1}$  (Figure 2). The stationary phase of growth can be observed between 72 and 96 h and soon thereafter there is the phase of death. That is, in the cultivation with oil the growth period, under the conditions evaluated, was very short (48h), which can be a problem when the objective is the production of microbial biomass (Figure 2).

In the cultivation with *Candida rugosa* CCMA 00371, a lower cell count was observed in comparison to the counts of the isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144. The lag phase of this isolate was extended until 48 h after inoculation and cell growth was only noticed at 72 h (Figure 2). After this period there was a decline in the growth curve. That is, the *Candida rugosa* CCMA 00371 presented minor adaptation to culture medium containing soybean oil.



**FIGURE 2.** Population growth of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 and *Candida rugosa* CCMA 00371 in consortium with *Bacillus subtilis* CCMA 0085 in fermentation for 168h in culture medium containing used soybean oil.

In the control fermentation using the YEPG synthetic culture medium (Figure 3), a minor adaptation period was observed both for the isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144, and for *Candida rugosa* CCMA 00371, when these were compared to the culture medium using soybean oil as the carbon source. Cell growth was noted within the first 24 hours after inoculation of all isolates. The stationary period could be observed in the first 48 hours and it lasts until the first 96 hours, where cell death was observed, with a decrease in viable cell count.

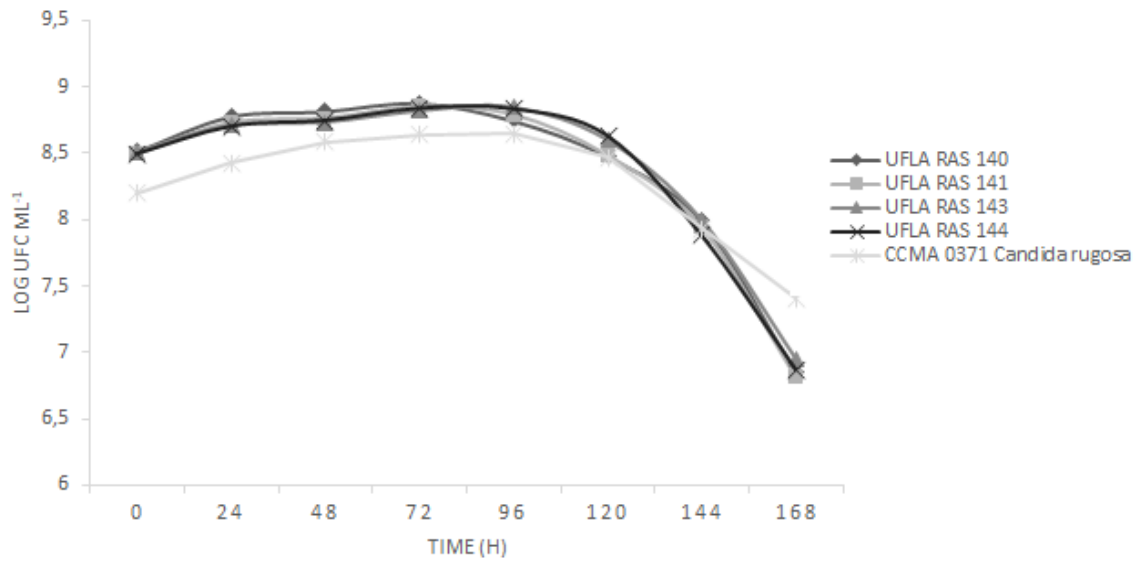
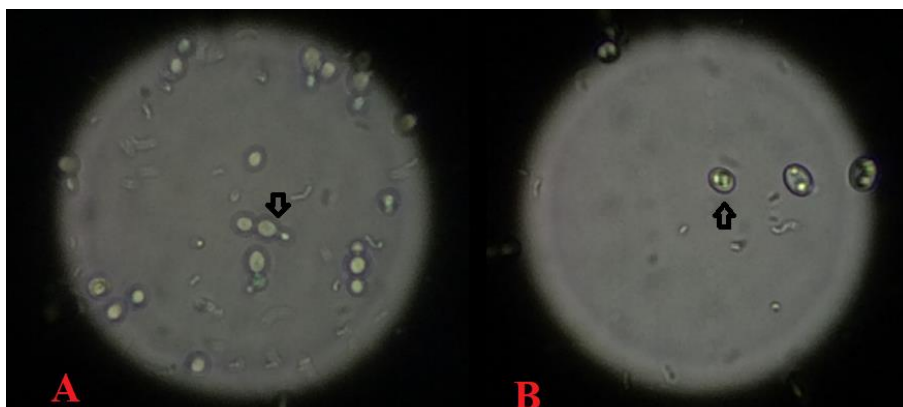


FIGURE 3. Population growth of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 and *Candida rugosa* CCMA 00371 in consortium with *Bacillus subtilis* CCMA 0085 in fermentation for 168h in YEPG culture medium.

During cell growth, it can be observed that the isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 were multiplied by asexual reproduction, while *Candida rugosa* CCMA 00371 performed sexual reproduction. (Figure 4).



**FIGURE 4.** Illustrative image of the asexual reproduction performed by the *Rhodotorula mucilaginosa* strain UFLA RAS 140 (A) and asexual reproduction performed strain CCMA 00371 *Candida rugosa* (B).

#### **BIOMASS**

At the end of 168h of fermentation the different treatments were centrifuged to obtain the microbial biomass, they were dried in greenhouses until they presented constant mass.

After drying, the following biomass values were obtained: 82.25mg, 89.85mg, 90.05mg, 78.55mg respectively for the isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 and 187.9 mg for *Candida rugosa* strain CCMA 00371 inoculated in a consortium with *Bacillus subtilis* CCMA 0085 in medium containing soybean oil. The values of biomass in synthetic medium YEPG was 287mg for *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, 255mg for *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 141, 283mg for *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 143, 273.2mg for *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 144 and 265mg for *Candida rugosa* CCMA 00371 cultivated in consortium with *Bacillus subtilis* CCMA 0085.

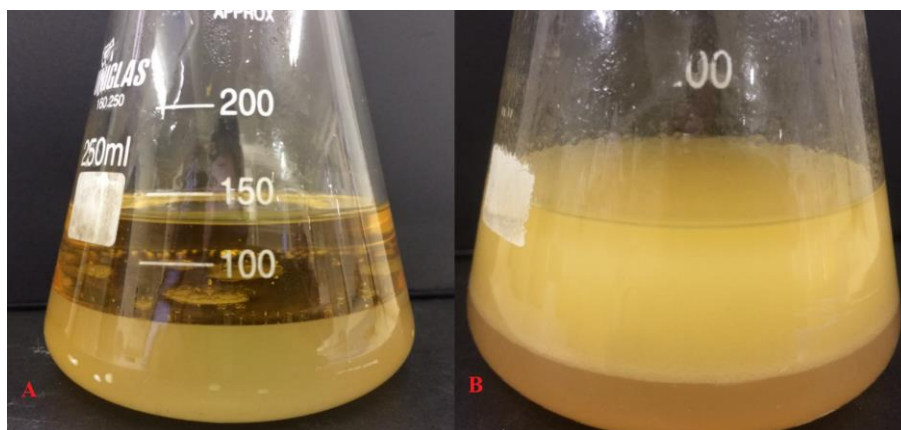
Biomass production was consistent with that found for the cell count, ie, in the synthetic medium there was higher biomass production, which was expected. However, the biomass production in domestic oil used

represented an average of 32% for the isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143, 144 and 71% for *Candida rugosa* CCMA 00371 in relation to the synthetic medium. Different from cell counts, cultivation with *Candida rugosa* CCMA 00371 showed higher biomass production in soybean oil. The lowest biomass production in soybean oil medium was observed by isolate *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 144 with a value of 0.07855g.

#### **Analysis of biomass produced**

Biomass nutritional analysis showed 2.5% of nucleic acid for biomass of the isolate *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA 140, 2.8% for the biomass of the isolate *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 141, 3.0% nucleic acid for the biomass of the isolate *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA 143, 2.6% for the biomass of the isolate *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 144 and 3.2% for the biomass of the isolate *Candida rugosa* CCMA 00371.

#### **Analysis of domestic soybean oil**



**FIGURE. 5.** Illustrative picture of the Erlenmeyer containing the *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA isolate RAS 144 in consortium with *Bacillus subtilis* culture medium composed of (% m / v: 0.075 glucose and

0.375 (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> in 75 mL water and 75 mL used soybean. At time 0h (A) and time 168h (B).

It was noted, a visual difference between the means of cultivation in time 0h and in the end time with 168 h, with greater homogeneity and with different viscosity.

The chemical analysis was performed the merit of comparison in domestic soybean oil before you go through the fermentation process and after going through the process of fermentation. Analyzes were performed in all treatments using the strains of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 and treatment using the *Candida rugosa* CCMA 00371 (Table 3).

**TABLE 3.** Chemical parameters analyzed in different treatments with soybean oil using the strains of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 and *Candida rugosa* CCMA 00371 in consortium with *Bacillus subtilis* 0085 CCMA and soybean oil without going through the fermentation process.

Parameters	Microorganisms					
	Soy oil	UFLA RAS 140	UFLA RAS 141	UFLA RAS 143	UFLA RAS 144	CCMA 00371 <i>Candida Rugosa</i>
Refractive index (°C)	21	22.7	22.45	22.6	21.8	21.95
Saponification (mg base/g oil)	91.27071381	227.8312175	227.8955351	227.8554135	273.6685473	90.99246088
Density (g/ml)	0.91611	0.8894	0.8769	0.89235	0.908416667	0.89062
Iodine Index (mL)	97.94231	94.05155901	94.90715269	94.83902096	90.92917266	107.5479274
Peroxide index (mg)	26.20272858	34.21619066	30.35516406	35.86037977	37.8087356	27.64558647
Acidity - Free Fatty Acids (%) (mg de NaOH/g de oil)	0.429569892	0.491903202	0.568183881	0.529122638	0.498432742	0.426704199

The mean values for the chemical parameters analyzed were similar in most treatments. The saponification index presented the highest values 227.8312175; 227.8955351; 227.8554135; 273.6685473 respectively between the treatments with the isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 compared to soybean oil does not fermenting. The index showed saponification value close to pure oil in *Candida Rugosa* treatment CMA 00371 (Table 3). Soybean oil cultivated with *Candida Rugosa* CMA 00371 had a higher iodine content of 107.5479274, in relation to the other treatments. The peroxide level was also altered by the isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144, showing an increase in values in relation to pure oil (Table 3).

The result of the chemical analysis between the different treatments shows a change in the properties of soybean oil after inoculation of the different microorganisms.

## **DISCUSSION**

The low microbial diversity (17 different species, in total) found in samples of alperujo may be due to the presence of phenolic compounds, organic material such as lipids, as well as esters which may have antimicrobial effect (FEDERICI *et al.* 2011); especially related to the phenolic compounds as well as the acid pH. The influence of these factors has been observed on the microbiota present in the residual water from the processing of olive oil and the alperujo being directly related to variation in the composition and concentration. NTOUGIAS *et al.*, 2013, observed a difference in diversity and population of microorganisms in accordance with variations in pH. Yeasts and filamentous fungi of the genera *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida* *Penicillium* and *Geotrichum*, were found in greater quantity in samples with acid pH, while bacteria of the genera *Bacillus* and *Corynebacterium* were found in a greater diversity in samples with pH close



to neutrality. Consistent with the microorganisms that have been isolated and identified in samples of alperujo the year of 2015 and 2016.

The predominance of yeasts *Pichia*, *Candida* and *Saccharomyces* is justified, since these yeasts are able to metabolize phenolic compounds and sugars present in the waste generated during the processing of olive oil (NTOUGIAS *et al.*, 2013). In other studies were cited as prevalent *Penicillium*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* and *Candida* demonstrating that these microorganisms may be part of the natural microflora of these residues (FEDERICI *et al.* 2011; NTOUGIAS *et al.*, 2013)

In relation to the bacteria, there was a greater diversity of species of the genus *Bacillus*, which features the ability of esporular in adverse conditions. In other studies, the presence of *Bacillus* is related to pH values closest to the alkaline (NTOUGIAS *et al.*, 2006). NTOUGIAS *et al.*, (2013) reported that to neutralize the acid pH of alperujo, some industries add  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  the residue, which provides an increase in population of neutrófilas bacteria of the genera *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Novosphingobium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* and *Serratia*.

In a study by NTOUGIAS *et al.* (2013), a favorable effect was observed on the growth of bacteria of the genera *Kocuria* *Actinobacteria*, *Microbacterium*, *Micrococcus* and *Rhodococcus* on substrates containing alperujo and olive pomace. These are specialized in the decomposition of organic matter, in particular of phenolic compounds, tannins and lipids.

The fermentation bacteria of the genera *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *wilt* and *Acetobacter* are commonly found on alperujo. These genera can change the lipids of the membrane allowing greater tolerance the conditions of low water activity (*aw*) low acidity and higher concentrations of phenolic compounds (S. NTOUGIAS *et al.* 2012; KRASTANOV *et al.* 2013).

For biomass production, intercropping between yeasts and *Bacillus subtilis* CCMA 0085 may have helped the oil to be used more efficiently since *Bacillus* species are already known as producers of emulsifiers. The

*Bacillus* has as characteristic the ability to accelerate the microbial degradation of various oils, because it causes an increase in the interfacial interaction of water and oil (LEE, J. H. *et al.*, 2012). Thus, the *Bacillus* strain probably promoted emulsification, making soybean oil available or accessible to be used as substrate by the isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* and *Candida rugosa* CCMA 00371 used for cell synthesis.

The biomass production in soybean oil treatments showed little production, being an indication of the need for an optimization process using soybean oil as carbon source. The highest biomass production was observed in *Candida Rugosa* CCMA 00371, which is the isolate that presented the lowest viable cell count, suggesting that *Candida Rugosa* has a higher cell weight than *Rhodotorula mucilaginosa*.

During the whole fermentation process *Candida Rugosa* CCMA 00371 presented sexed reproduction possibly due to unfavorable environmental conditions or with nutrient restriction (MADIGAN *et al.*, 2010).

To be used as an animal supplement the produced microbial biomass must meet certain nutritional prerequisites, which includes low levels of anti-nutritional compounds, such as nucleic acids (SILVA *et al.*, 2011). The content of nucleic acids for all the soybean oil tests presented the recommended value for use in animal protein supplementation, which should be 10% below dry weight (PIRES *et al.*, 2016).

### **Chemical analysis of soybean oil**

The physico-chemical analysis of soybean oil allowed us to infer if the soybean oil used was used as a carbon source by the microorganisms. In relation to acidity index, free fatty acids, there was little difference between the samples. However, although this change was small, the acidity index of the treatments with microorganisms was higher than in pure oil, especially for the isolates *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 141 and UFLA RAS 143, which presented a higher average value of biomass. This increase in the

acidity index may be indicative of the consumption of this oil by the inoculated microorganisms, since this index represents the degree of oxidation of the oil (MENDONÇA *et al.*, 2008). Acidity reveals the state of conservation of oils and fats, since a higher concentration of free fatty acids represents a higher hydrolysis index of the oil, representing a higher concentration of free fatty acids (MORETTO E FETT, 1989).

A high oxidation rate of fatty acids is related to a high concentration of peroxide, since peroxides are products formed by the oxidation of oils and fats with formation of free radicals and consequently radicals of peroxides (SOUZA *et al.*, 2003). In a study of factors that alter peroxide concentration in the oil, BARROS *et al.* (2007) observed a higher concentration of polyunsaturated fatty acids, when these oils were submitted to high temperatures, presence of water, absence of oxidants and presence of microorganisms, thus inducing a higher concentration of peroxide. The analysis of the results showed an increase in the peroxide index with the isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 in comparison to unfermented soybean oil. In other words, a higher value of peroxide is related to a high oxidation rate of fatty acids, so we can infer that this is an indication of the consumption of soybean oil by *Rhodotorula mucilaginosa* isolates UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144 in consortium with *Bacillus subtilis* CCMA 0085.

The saponification index presented values much higher than the pure oil when cultivated the isolates of *Rhodotorula mucilaginosa* UFLA RAS 140, UFLA RAS 141, UFLA RAS 143 and UFLA RAS 144, an indication of the hydrolysis, producing glycerol and salts of fatty acids, (AZEVEDO *et al.*, 2009). In other words, a higher saponification index is related to a higher hydrolysis of soybean oil, and may be an indicator of the potential use of this oil by the microorganism as a carbon source.

Another change in the chemical characteristics of soybean oil that demonstrate its potential for its use as a carbon source is observed in the

change in iodine content. MORETTO *et al.* (2002) observed that the increase in fatty acid unsaturations increases the iodine content. In the cultivation with *Candida rugosa* CCMA 00371, it presented a higher iodine content, being indicative of oxidation of fatty acids in soybean oil, being thus the high index obtained in the treatment of *Candida Rugosa* CCMA 00371 in consortium with *Bacillus subtilis* CCMA 0085.

The refractive index is related to the degree of saturated bonds in relation to the content of free fatty acids, thus, the higher the fatty acid index the higher the refractive index (MALACRIDA *et al.*, 2006). The average refractive values varied slightly between the treatments, and these presented little difference when compared to the pure soybean oil, so the fermentative process using the oil did not cause significant changes in the saturated bonds, consequently did not cause an increase in the refractive index. That is, the little change in the average free fatty acids between the treatments with fermented soybean oil and pure oil, shows little change in this index even when it was used as a carbon source in the fermentation process.

## **CONCLUSION**

Yeasts were the predominant group of microorganisms, in the alperujo followed by filamentous fungus and bacteria. The smaller species diversity was found for filamentous fungi and greater diversity of species was observed by the bacteria, mainly of the *Bacillus* group.

Being that from the isolation of the microorganisms of the possible alperujo the selection of microorganisms capable of growing in oily culture medium. The yeast *Rhodotorula mucilaginosa* was the microorganism selected for biomass production using soybean oil as a carbon source because of its lipolytic activity, in consortium with *Bacillus subtilis*, which is a microorganism whose characteristic is the ability to accelerate the microbial degradation of several oils, because it causes an increase in the interfacial interaction of water and oil.

Soybean oil is a poor medium to be used as a source of carbon for the growth of microorganisms, but even then, it was possible to obtain biomass that can be used for animal feed. However, to this end, it will be necessary to perform an optimization process to obtain a larger volume of biomass at the end of the experiment. In addition, it was possible to observe an indication that the oil was modified after cultivation with the microorganisms, which could facilitate its disposal, but it will also be necessary to optimize this process to obtain better results. The results obtained with the experiment are preliminary data of extreme importance as a starting point for such applications.

## **BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES**

ALBUQUERQUE, J; GONZALVÉS, J; GARCÍA, D; CEGARRA, J. “Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction”. **Bioresource Technology**, 91:195–200, 2004.

ALTIERI, G.; GENOVESE, F.; TAURIELLO, A.; RENZO, G. C. Innovative plant for the separation of high quality virgin olive oil (VOO) at industrial scale. **Journal of Food Engineering**, n. 166, p. 325-334, 2015.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410. 1990.

AMARAL, CARLA; LUCAS, MARCO S; COUTINHO, JOÃO; CRESPI, ANTONIO L; DO ROSÁRIO A. M; PAIS, CÉLIA. "Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal", **Bioresource Technology** 99, 15: 7215 - 7223. 2008.

ANDRADE, M. J. et al. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 48-58, 2006.

ANUPAMA; RAVINDRA P. Value-added food: single-cell protein. **Biotechnology Advances**, v.18, n.6, p.459-479, 2000.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 19th Edition, 1999.

ARJONA R, GARCÍA A, OLLERO P. “The drying of alpeorujo, a waste product of the olive oil mill industry”. **Journal of Food Engineering**, 41, 229-234, 1 999.

AWAD, A; SALMAN, H; HUNG, Y. “Olive Oil Waste Treatment”. **Taylor & Francis Group**, LLC. 2006.

AZBAR N, BAYRAM A, FILIBELI A, MEUZZINOGLU A, SENGUL F, OZER A. “A review of waste management options in olive oil production”. **Science and Technology**, 34, 209-247. 2004

BEN SASSI, A., BOULARBAH, A., JAOUAD, A., WALKER, G., BOUSSAID, A. A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. **Process Biochem.** 41, 74–78. 2006.

BEN SASSI, A., OUZZANI, N., WALKER, G.M., IBNSOUDA, S., EL MZIBRI, M., BOUSSAID, A. Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast isolates. **Biodegradation** 19, 337–346. 2008.

BOCCHESI CAC, MARTINELLI JA, MATSUMURA ATS, FEDERIZZI LC, PRESTES AM. Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados de *Pyrenophora chaetomioides*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. **Fitopatologia Brasileira** 28:11-16. 2003

BORJA, R; RINCÓN, B; RAPOSO, F; ALBA, J; MARTÍN. A. “A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature” **Process Biochemistry**, 38:733/742, 2002.

CASA R, D’ANNIBALE A, PIERUCCETI F, STAZI SR, GIOVANNOZZI SERMANNI G, CASCIO BL. “Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability”. **Chemosphere**, 50, 959-966, 2003.

CELLA, R.C.F.; D’ARCE, M.A.B.R.; SPOTO, M.H.F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.2, p.111-116, maio/ago 2002.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de Biocombustível Alternativo ao Óleo Diesel Através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras. In: **Revista química nova**, n.23, ano 4, p.516, 2000.

COVAS, M. I. Olive oil and the cardiovascular system. **Pharmacol. Res.** 55: 175–86, 2007.

ERTUGRUL, S.; DONMEZ, G.; TAKAÇ, S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, n. 149, p. 720-724, 2007.

FEDERICI, E.; PEPI, M.; ESPOSITO, A.; SCARGETTA, S.; FIDATI, L.; GASPERINI, S.; CENCI, G.; ALTIERI, R. Two-phase olive mill waste composting: Community dynamics and functional role of the resident microbiota. **Bioresource Technology**, n. 102, p. 10965-10972, 2011.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja: taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, 28(1), p. 19-23, 2005.

FITO, M., DE LA TORRE, R. AND COVAS, M. I. Olive oil and oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1215–24. 2007.

GARCIA, G. M. Evolución temporal del alperujo procedente de almazara. **Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes**. p. 22-74, 2004.

GÓMEZ, A; ZUBIZARRETA, J; RODRIGUES, M; DOPAZO, C; FUEYO, N. “An estimation of the energy potential of agro-industrial residues in Spain”. **Resources, Conservation and Recycling**, 54:972–984, 2010

KRASTANOV, Z. ALEXIEVA, AND H. YEMENDZHIEV, “Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives,” *Engineering in Life Sciences*, vol. 13, no. 1, pp. 76–87, 2013.

LEE, J. H. et al. The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells. **Food Chemistry**. v. 131, n.4, p. 1347-1354. 2012.

LITCHFIELD, J. H. Single-cell proteins. **Science**, v.219, p.740-746, 1983.

MADINGAN, M. T.; JOHN, MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V., CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

MALACRIDA CR, JORGE N. Influência da relação superfície/volume e do tempo de fritura. **Ciênc Agrotec**. 2006;

MENDONÇA, M. A.; BORGIO, L. A.; ARAÚJO, W. M. C.; NOVAES, M. R. C. G. Alterações físico-químicas em óleos de soja submetidos ao processo



de fritura em unidades de produção de refeição no Distrito Federal. **Comunicação em Ciências da Saúde, Brasília**, v. 19, n. 2, p. 115-122, 2008.

MIGUEL, M.G. DA C.P., REIS, L.V. DE C., EFRAIM, P., SANTOS, C., LIMA, N., AND SCHWAN, R.F. Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. **LWT - Food Sci. Technol.** 77: 362–369, 2017.

MORETTO, ELIANE; FETT, ROSEANE. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. São Paulo: **Varela Editora e Livraria Ltda**, 1998.

MORETTO, E.; FETT, R. Óleos e Gorduras Vegetais: processamento e análises. São Paulo: **Varela**, 1989. 179p.

MORETTO E, FETT R, GONZAGA LV, KUSKOSKI EM. Introdução à ciência de alimentos. Florianópolis: **Ed. da UFSC**; 2002. 255 p.

MORILLO, J.A., AGUILERA, M., RAMOS-CORMENZANA, A., MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. Production of a metal binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate. **Curr. Microbiol.** 53, 189– 193. 2006.

MORILLO, J.A., AGUILERA, M., ANTÍZAR-LADISLAO, B., FUENTES, S., RAMOS-CORMENZANA, A., RUSSELL, N.J., MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M.,. Molecular microbial and chemical investigation of the bioremediation of two-phase olive mill waste using laboratory-scale bioreactors. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 79, 309–317. 2008.

MORRIS, R.E.; POLLACK, A.K.; JIA, Y. Impact of biodiesel fuels on air quality and human health summary report. **Environ International** Corporation Novato, Califórnia, 2003. 53p.

NIELSEN, D. S. et al..The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-depenent and culture independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 168e186, 2001.

NTOUGIAS S, BOURTZIS K, TSIAMIS G. The microbiology of olive mill wastes. **Biomed Res Int** 2013

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., SOCCOL, V.T., VANDENBERGHE, L.P.S., MOHAN, R. Technological potential of agro-industrial residues. II:cassava bagasse. **Bioresouce Technology**, 74:81-87. 2000.

PARAJÓ, J.C., GARROTE, G., CRUZ., DOMINGUEZ, H. Production of xylooligosaccharides by autohidrolysis of lignocellulosic materials. **Trends in Food Science & Technology**, 15:115-120. 2004.

PIRES, JOSIANE F.; FERREIRA, GUSTAVO M.R.; REIS, KELLY C.; SCHWAN, ROSANE F.; SILVA, CRISTINA F. Mixed yeasts inocula for simultaneous production of SCP and treatment of vinasse to reduce soil and fresh water pollution. **Journal of Environmental Management** <sup>JCR</sup>, v. 182, p. 455-463, 2016.

RÖNNER U.; HUSMARK, U.; HENRIKSSON, A. Adhesion of Bacillus spores in relation to hydrophobicity. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 69, p. 550-556, 1990.

S. NTOUGIAS; N.KAVROULAKIS, Natural Antioxidants from Olive Mill Wastes, **Nova Publishers**, New York, NY, USA, 2010.

S. NTOUGIAS, G. I. ZERVAKIS, C. EHALIOTIS, N. KAVROULAKIS, AND K. K. Papadopoulou, "Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes, **Research in Microbiology**, vol. 157, no. 4, pp. 376–385, 2006.

S. NTOUGIAS, P. BALDRIAN, C. EHALIOTIS et al., "Biodegradation and detoxification of olive mill wastewater by selected strains of the mushroom genera Ganoderma and Pleurotus, **Chemosphere**, vol. 88, no. 5, pp. 620–626, 2012.

SABESP. Programa de Reciclagem de Óleo de Fritura da Sabesp. Disponível em:[http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp\\_doctos/programa\\_reciclagem\\_oleo\\_com\\_pleto.pdf](http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/programa_reciclagem_oleo_com_pleto.pdf). Acesso em 11/06/2016

SANTOS, A. M; et al. Fabricação de sabão ecológico: Uma alternativa para o desenvolvimento sustentável. In: **III Conferencia Internacional de Gestão de Resíduos Sólidos**, p. 1641, 2013.

SILVA, CRISTINA FERREIRA; ARCURI, SILVIO L. ; CAMPOS, CÁSSIA R. ; VILELA, DANIELLE M. ; ALVES, JOSÉ G.L.F. ; SCHWAN, ROSANE F. . Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. **Waste Management** (Elmsford), v. 31, p. 108-114, 2011.

SILVA, M. V.; et. al. Reciclagem de óleos residuais para a produção de sabão no município de Itapetinga-BA. Extensio: **Revista Eletrônica de Extensão**, v. 9, p. 106-120, 2012.

SOUZA, A. V. C. Avaliação da qualidade e valor nutricional de óleos e gorduras. **Poli Nutri**, artigo do mês, ago. 2003.