

Lovastatin production from *Aspergillus terreus* cultivation on cottonseed and jatropha cake substrates

Aparecido Almeida Conceição (UFMT, aparecido.aac@gmail.com), Félix Gonçalves de Siqueira (Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br), Nadia Parachin (UnB, nadiasp@gmail.com), Simone Mendonça (Embrapa Agroenergia, Simone.mendonca@embrapa.br).

Palavras Chave: Secondary metabolites, biorefinery, biodiesel residue, statins.

1 - Introduction

The biodiesel production chain generates co-products with potential for integration into sustainable agricultural systems (DE CORATO *et al.*, 2015). The vegetal biomass from biodiesel production can be further processed by biological treatment for obtention of high value-added products in a biorefinery model (KOHLI; PRAJAPATI; SHARMA, 2019).

Filamentous fungi are promising sources of various secondary metabolites with different applications in the pharmacological, medicinal and food fields (DÍAZ-GODÍNEZ, 2015). Lovastatin produced by *Aspergillus terreus* for example is a drug marketed with hypocholesterolemic effects and reported as effective against cardiovascular diseases. (SEENIVASAN *et al.*, 2008). Hypocholesterolemic effects have also been described in other fungal species such as *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* due to the presence of glucans (MENESES *et al.*, 2016).

Using residual vegetable biomass for the cultivation of filamentous fungi feels the need of substrates for production of bioactive metabolites while adding value to the residual biomass and the cultivation process, characterizing a process for integration into biorefinery. (VASTRAD; NEELAGUND, 2011).

Residual biomasses generated from oilseed processing are mainly used for animal feed, however, biomasses such as jatropha (*Jatropha curcas*) and cottonseed (*Gossypium* spp.) cakes have high toxicity due to the presence of phorbol esters and gossypol, respectively; thus, they are discarded or limited use for ruminant feeding only. However, biological treatments have been used for biodegradation of these biomasses and allowing its use for animal nutrition (KNUTSEN *et al.*, 2017; MENDES, 2017; CASTRO, 2018; CONCEIÇÃO *et al.*, 2018; GOMES, 2015; ARAÚJO, 2018; NETO, 2019).

Thinking about a biorefinery model, the residual biomass from the biodiesel chain can still be used as raw material to obtain value-added molecules, such as lovastatin. *A. terreus* ATCC 20542 has been used for the production of different secondary metabolites such as terrein, geodin, organic acids and commercial lovastatin (BORUTA; BIZUKOJC, 2016). Thus, the aim of the present work was to analyze lovastatin production by cultivating *A. terreus* on substrate containing the residual biomass from biodiesel production, jatropha and cottonseed cake.

2 - Material and methods

The biomass, jatropha cake (JC) and cottonseed cake (CSC) were grounded for homogenization and the humidity

was adjusted to 65% with type II water. Erlenmeyer flasks of 250 mL were used for cultivation; where 100 g of each wet biomass was autoclaved for 1 hour at 121°C and 1 atm. For inoculation of *A. terreus* ATCC 20542, 1 mL of suspension containing approximately 10^7 spores were added to each flask after cooling. Cultivation was carried out for 15 and 30 days at 28°C, in triplicates.

After cultivations period, the colonized biomass was dried at 50°C for 48 h and powdered. The determination and quantification of lovastatin from the powder samples followed methods of Wang *et al.* (2015). For gossypol and phorbol esters analyses was followed methods of Conceição *et al.* (2018) and Gomes (2015), respectively.

3 - Results and discussion

The strain of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 was able to grow in JC and CSC biomass within 15 days, completely colonizing the substrate, however in order to analyze the best lovastatin production period, cultivation was allowed up to 30 days. The cultivation that presented the best lovastatin production was the JC substrate for 15 days, reaching a production of 3,3 µg/mg of lovastatin. After 30 days, in the same biomass, there was a significant reduction in the molecule production. For CSC substrate, lovastatin production showed significantly lower levels compared to that found in JC substrates (Figure 1).

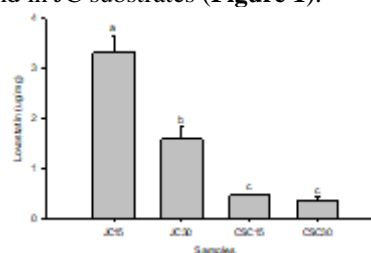


Figure 1. Lovastatin production by solid culture of *Aspergillus terreus* on cottonseed and jatropha cake. JC = Jatropha cake after 15/30 days cultivation; CSC = Cottonseed cake after 15/30 days cultivation.

Jatropha cake has been shown to be an interesting substrate for lovastatin production, showing higher values compared to other studies in the literature with residual biomass such as rice straw (0.26 µg/mg), palm leaf (0.07 µg/mg), corncob (0.128 µg/mg), potato peel (0.144 µg/mg), semolina (0.200 µg/mg); and sweet sorghum pulp (1.5 µg/mg) (JAHROMI *et al.*, 2012; KAMATH; DWARAKNATH; JANAKIRAMAN, 2016; SZAKÁCS; MOROVJÁN; TENDERDY, 1998).

In addition to the production of lovastatin, *A. terreus* was able to biodegrade jatropha and cottonseed cakes by significantly decreasing the concentration of phorbol esters and gossypol present in the biomasses. The Jatropha and

cottonseed cakes after autoclaving showed phorbol ester and gossypol concentrations of 0.85 µg/mg and 56 µg/mg, respectively. The concentration of toxic phorbol ester molecules and gossypol significantly reduced to approximately 0.30 and 0.35 µg/mg after JC cultivation and 3.20 and 2.90 µg/mg in CSC after 15 and 30 days of cultivation, respectively (Figure 2). The reduction of phorbol esters and gossypol levels in the biomasses after cultivation process allows these biomasses to be used for animal nutrition (GOMES, 2015; KNUTSEN *et al.*, 2017).

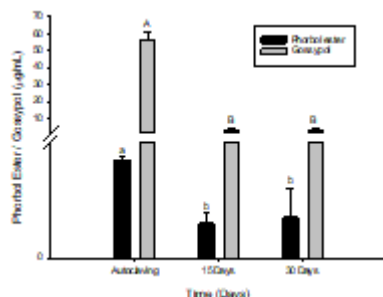


Figure 2. Phorbol ester and gossypol from jatropha and cottonseed cakes biodegradation by *A. terreus* cultivation during 15 and 30 days.

This work demonstrated the possibility of adding value in residual biomass from the biodiesel chain by obtaining high value-added bioactive molecules and obtaining biot detoxified biomasses with potential for use in animal nutrition. Thus, biological treatments prove to be a potential system for the integration of productive chains such as agricultural and pharmaceutical, for example, entering the model of biorefinery and circular economy (ALONSO *et al.*, 2011; CHERUBINI, 2010).

4 – Conclusions

The cultivation of *A. terreus* ATCC 20542 in oilseed biomass cakes resulted in the production of lovastatin (3.3 µg / mg) when grown in JC and presented the significant reduction of toxic factors present in JC and CSC, allowing the use of these cultivated substrate for animal feed. Thus, the biological treatment model has enabled the integration of different production areas for sustainable development.

5 – Acknowledgment

FAP-DF for funding (0193.001720/2017), Capes for grant and FAPESB.

6 - Bibliography

ARAÚJO, Ana Paula Fernandes. *Tratamento da torta de semente de algodão por autoclavagem e macrofungos para degradação de gossipol*. Dissertação, 2018.

ALONSO, J. L. *et al.* Biorefinery processes for the integral valorization of agroindustrial and forestal wastes. *CYTA - Journal of Food*, v. 9, n. 4, p. 282–289, 2011.

BORUTA, Tomasz; BIZUKOJC, Marcin. Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 7, p. 3009–3022, 2016.

CASTRO, Cibelli Paula. *Caracterização e digestibilidade ileal de torta de Caroço de algodão pré-tratada pelo macrobasidiomiceto *Fistulina hepatica* cc102 em dietas para suínos*. Dissertação, 2018.

CHERUBINI, Francesco. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.

CONCEIÇÃO, Aparecido Almeida *et al.* Development of an RP-UHPLC-PDA method for quantification of free gossypol in cottonseed cake and fungal-treated cottonseed cake. *PLoS ONE*, v. 13, n. 5, p. 1–17, 2018.

DE CORATO, Ugo *et al.* Co-products from a biofuel production chain in crop disease management: A review. *Crop Protection*, v. 68, p. 12–26, 2015.

DÍAZ-GODÍNEZ, Gerardo. Fungal bioactive compounds: An overview. In: GUPTA, VIAJAI *et al.* (Org.). *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*. 1. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2015. v. 9781118733. p. 195–223.

GOMES, Taísa Godoy. *Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso por basidiomicetos e seu potencial como substrato para produção de enzimas de interesse industrial*. 2015. 127 f. Universidade Federal do Tocantins, 2015.

JAHROMI, Mohammad Faseleh *et al.* Lovastatin production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, p. 1–11, 2012.

KAMATH, Praveen Vadakke; DWARAKNATH, Bhargavi Santebennur; JANAKIRAMAN, Savitha. Optimization of Culture Conditions for Maximal Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* (KM017963) under Solid State Fermentation. *HAYATI Journal of Biosciences*, v. 22, n. 4, p. 174–180, 2016.

KNUTSEN, Helle Katrine *et al.* Presence of free gossypol in whole cottonseed. *EFSA Journal*, v. 15, n. 7, 2017.

KOHLI, Kirtika; PRAJAPATI, Ravindra; SHARMA, Brajendra K. Bio-based chemicals from renewable biomass for integrated biorefineries. *Energies*, v. 12, n. 2, 2019.

MENDES, Melissa Fabíola dos Santos. *Utilização de substrato pós cultivo de cogumelos comestíveis na alimentação de suínos*. Dissertação, 2017.

MENESES, María E. *et al.* Hypocholesterolemic properties and prebiotic effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 mice. *PLoS ONE*, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2016.

NETO, Clemente Batista Soares. *Degradação de gossipol livre por macrofungos e análise do Secretoma de panus lecomtei durante crescimento em caroço de algodão*. Tese, 2019.

SEENIVASAN, A *et al.* Microbial production and biomedical applications of lovastatin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 70, n. 6, p. 701, 2008.

SZAKÁCS, György; MOROVJÁN, György; TENGEDY, Robert P. *Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus**. *Biotechnology Letters*. [S.l.: s.n.], 1998

VASTRAD, B M; NEELAGUND, S E. Optimization and production of neomycin from different agro industrial wastes in solid state fermentation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, v. 3, n. 2, p. 104–111, 2011.

WANG, Jiang *et al.* Liquid chromatography – tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of simvastatin, lovastatin, atorvastatin, and their major metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 983–984, p. 18–25, 2015.

Simulação computacional da produção de Solketal em uma coluna de destilação reativa utilizando glicerina de plantas de biodiesel.

Fábio Eiji Nishiyama^{a*}, Tiffani Mayumi Miura^a, Henry Yudi Matsumoto^a, Donato Alexandre Gomes Aranda^b, Patricia Hissae Yassue Cordeiro^a, Guilherme Duenhas Machado^a.

^aUniversidade Tecnológica Federal do Paraná, ^bUniversidade Federal do Rio de Janeiro, * *fabionishiyama45@gmail.com*

Palavras Chave: Solketal; Biodiesel, Cetalização, Glicerina, Coluna de destilação reativa; Simulação Computacional.

1 - Introdução

A dependência de combustíveis fósseis provocou grandes impactos ambientais e com o intuito de minimizar o aquecimento global, os biocombustíveis tornaram-se o alvo de pesquisas em todo o mundo. Com a implementação do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), o biodiesel começou a ser misturado com o diesel fóssil em 2004, com caráter experimental. Hoje, é comercializado o diesel B11, ou seja, com 11% de biodiesel em sua composição.

A produção de biodiesel, no Brasil, aumenta anualmente. Consequentemente, a produção de glicerol tem experimentado uma elevada taxa de crescimento. Para cada litro de biodiesel produzido, são obtidos 100 mL de glicerina bruta, ou seja 10% (Mota et al., 2017). Estima-se que o excedente gerado de glicerina continuará em crescimento pois a expectativa é que no ano de 2021 seja implementado o B15, impactando na oferta de glicerina no mercado.

Dos processos de transformação do glicerol a intermediários químicos viáveis a cetalização do glicerol para a produção de solketal tem obtido destaque.

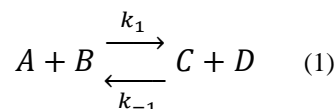
Como aplicação, o solketal pode ser utilizado como aditivo para aumentar a octanagem e propriedades fluidodinâmicas do combustível. A adição de até 5% em volume de solketal à gasolina levou a uma diminuição significativa na formação de goma (Mota et al., 2010).

A destilação reativa (RD) é um processo que envolve uma reação química seguida de destilação, ocorrendo simultaneamente em um único equipamento. Uma gama de reações incluindo catalisadores homogêneos, heterogêneos e até mesmo reações sem catalisadores podem ser realizadas por RD, com os benefícios da separação contínua dos componentes logo após a reação, redução dos custos do processo devido a utilização de uma única unidade de reação/separação, e a possibilidade de integração energética e utilização adequada das utilidades (Machado et al., 2016).

Portanto, o objetivo desse trabalho é simular computacionalmente a operação de uma coluna de destilação reativa para a produção de solketal a partir de glicerina, proveniente do processo de produção de biodiesel, com acetona com emprego de catálise heterogênea, com elevada conversão de reagentes e separação dos componentes da reação.

2 - Material e Métodos

A metodologia aplicada considera a reação de cetalização do glicerol (A) pela acetona (B), formando Solketal (C) e água (D). A reação é considerada reversível e elementar, sendo descrita pela Equação 1:



Um modelo pseudo-homogêneo foi utilizado para descrever a cinética da reação através de um sistema de equações diferenciais de concentração por tempo, em diferentes temperaturas, no qual as constantes cinéticas da reação direta e inversa são representadas, respectivamente, por k_1 e k_{-1} , enquanto as concentrações molares das espécies envolvidas são dadas por C_A , C_B , C_C e C_D .

$$\frac{dC_A}{dt} = -k_1 C_A C_B + k_{-1} C_C C_D \quad (2)$$

$$\frac{dC_B}{dt} = -k_1 C_A C_B + k_{-1} C_C C_D \quad (3)$$

$$\frac{dC_C}{dt} = k_1 C_A C_B - k_{-1} C_C C_D \quad (4)$$

$$\frac{dC_D}{dt} = k_1 C_A C_B - k_{-1} C_C C_D \quad (5)$$

A resolução do sistema de equações diferenciais e o ajuste dos dados cinéticos, k_1 e k_{-1} e posterior obtenção dos parâmetros da equação de Arrhenius foram realizados por um algoritmo desenvolvido em linguagem Python. Os dados experimentais utilizados para o ajuste foram retirados do estudo de Rossa et al, 2016.

Os parâmetros cinéticos avaliados foram posteriormente utilizados para prever a ocorrência da reação de formação de solketal em uma coluna de destilação reativa, pelo software Aspen Plus no modelo de destilação rigorosa RADFRAC.

3 - Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta as concentrações obtidas pelo tempo de acordo com os parâmetros ajustados.

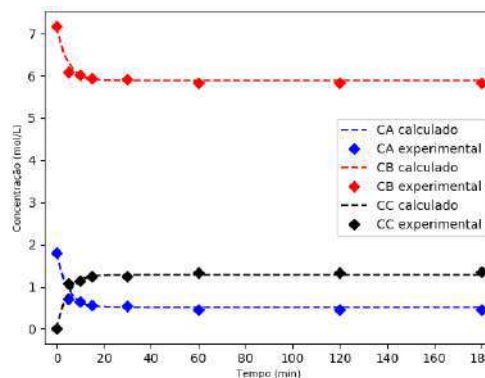


Figura 1 – Concentrações experimentais e calculadas pelo algoritmo em linguagem Python para a temperatura de 80 °C.

Analisando a Figura 1, nota-se que as curvas geradas com o uso dos parâmetros estimados, representaram os dados experimentais de forma eficiente.

O sistema considerado neste estudo, contando com a coluna de destilação reativa (RADFRAC) e os processos de separação são mostrados na Figura 2.

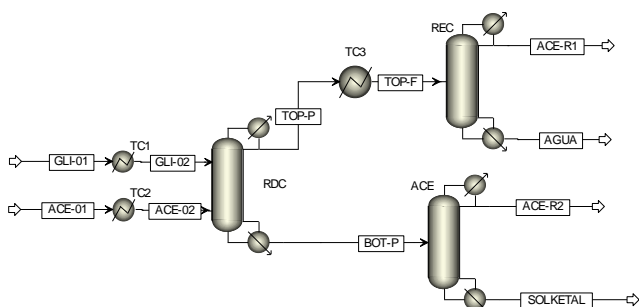


Figura 2 – Fluxograma do processo global de produção de solketal aplicado neste estudo (Aspen Plus).

Através dos parâmetros cinéticos estimados, a reação de cetalização do glicerol para a produção de Solketal foi descrita no software Aspen Plus e a simulação do processo foi realizada, fixando a pressão no interior da coluna em 10 atm. A alimentação da coluna de 13 estágios, RDC, é realizada pelas correntes GLI-02 e ACE-02, que são resultantes do aquecimento das correntes GLI-01 e ACE-01 até 95 °C e 55 °C, por TC1 e TC2, respectivamente.

A corrente ACE-01 é composta somente por acetona, enquanto GLI-01 por 80% de glicerol e 20% de água em massa, desconsiderando outros componentes como metanol ou sais dissolvidos normalmente presentes na glicerina oriunda de processos de produção de biodiesel (Mota et al., 2009). Os produtos da destilação reativa são caracterizados pelas correntes TOP-P e BOT-P, que correspondem, respectivamente, às correntes compostas pelas substâncias mais voláteis e menos voláteis do processo.

A Tabela 1 apresenta as especificações do processo após análise de sensibilidade, visando obter uma coluna com condições ótimas de operação. A Figura 2 exibe o perfil de composição na fase líquida função do número do estágio na coluna.

Tabela 1- Especificações da coluna RADFRAC otimizada.

Número de estagios	13
Condensador	Total
Refervedor	Tipo Kettle
Razão de refluxo molar	0,69
Calor do refervedor/condensador	55.000 / -43.723 cal/s
Pressão	10 bar
Alimentação de glicerina	3º estágio
Alimentação de acetona	11º estágio
Condições de alimentação	95 e 55°C e 10 bar
Glicerol na alimentação	2,500 kmol/h
Água na alimentação	0,625 kmol/h
Acetona na alimentação	15,000 kmol/h
Estágios de cetalização	3 a 11

A conversão obtida para as condições operacionais definidas para a simulação foi de 98,2% em glicerol, indicando a reação ocorreu de forma eficiente no interior da coluna.

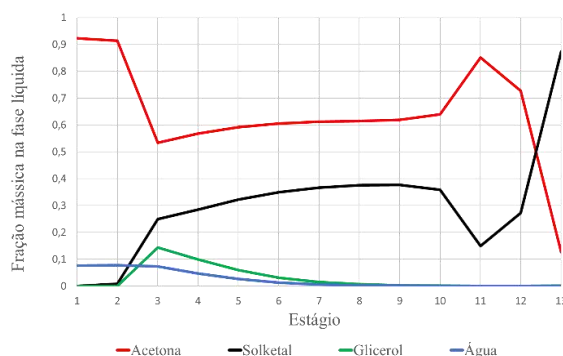


Figura 3 – Composição da fase líquida ao longo da coluna RADFRAC.

A utilização da coluna de destilação reativa em conjunto com os processos de separação aplicados neste trabalho proporcionam produtos de pureza considerável. A corrente SOLKETAL possui 99,53% de solketal e a corrente AGUA constitui 99,82% em água, em base mássica.

4 – Conclusões

Neste estudo um processo de produção de solketal em uma coluna de destilação altamente integrada foi simulado computacionalmente. A reação de cetalização obteve ótimos resultados e nas correntes de saída, processos de separação foram eficientes na purificação dos produtos.

O processo simulado considera a utilização de glicerina com elevada quantidade de umidade, o que não foi um empecilho ao processo. Por outro lado, o emprego de uma coluna de destilação reativa altamente integrada pode otimizar os gastos energéticos e operacionais numa planta de produção de solketal.

Os resultados das simulações mostram que a metodologia empregada é tecnicamente consistente, propondo o solketal como químico intermediário pela transformação da glicerina, sendo este processo atrativo no aspecto técnico e promissor economicamente.

5 - Bibliografia

- MACHADO, G. D.; de SOUZA, T. L.; ARANDA, D. A. G.; PESSOA, F. L. P.; CASTIER, M.; CABRAL, V. F.; CARDOZO-FILHO, L. Computer simulation of biodiesel production by hydro-esterification. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v.103, 37-45, 2016.
- MOTA, C. J. A.; PINTO, B. P. Transformações Catalíticas do Glicerol para Inovação na Indústria Química. *Revista Virtual de Química*, v. 9, p. 135-149, 2017.
- MOTA, C.J.A.; SILVA, C. X. X.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Quím. Nova*, v. 32, p. 639-648, 2009.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; ROSENBAH JR, N.; COSTA, J.; SILVA, F. Glycerin Derivatives as Fuel Additives: The Addition of Glycerol/Acetone Ketal (Solketal) in Gasolines. *Energy Fuels*, v. 24, p. 2733-2736, 2010.
- ROSSA, V.; PESSANHA, Y. S. P.; DIAZ, G. C.; CAMARA, L. D. T.; PERGHER, S. B. C.; ARANDA, D. A. G. Reaction Kinetic Study of solketal Production from Glycerol Ketalization with Acetone. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 56, p. 479-488, 2016.