

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

OTIMIZAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ÓLEO MICROBIANO PELA
LEVEDURA *Candida zeylanoides* QU 33

Priscila Dallé da Rosa
Farmacêutica com ênfase em Análises Clínicas/UFRGS

PORTO ALEGRE
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

OTIMIZAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ÓLEO MICROBIANO PELA
LEVEDURA *Candida zeylanoides* QU 33

Dissertação de mestrado apresentada
como um dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof. Dra. Patricia Valente.

PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.
JULHO, 2014

Pensamento:

*"O que a mente do homem pode
conceber e acreditar,
pode ser alcançada"*

(Napoleon Hill).

AGRADECIMENTOS

À Professora doutora Patricia Valente por ter me dado a oportunidade e ter me aceitado orientar nesse projeto como aluna de mestrado. E que sempre se mostrou disponível para atender minhas dúvidas, sendo sempre excelente professora, demonstrando sua capacidade intelectual de maneira doce, tendo grande empatia e carinho pelos alunos.

À Professora doutora Maria Lúcia por alegrar, reunir, organizar, disponibilizar espaço, equipamento, amizade, enfim alegrar meus dias no laboratório.

Aos colegas de laboratório por sempre estarem disponíveis, oferecendo sua amizade, seus conselhos, suas experiências nos trabalhos, enriquecendo na minha produção científica e pessoal. Todos foram importantes.

Aos meus pais e namorado que sempre estiveram presente no meu desenvolvimento pessoal quanto profissional, me estimulando, aconselhando, zelando e embarcando comigo nas minhas escolhas.

Enfim, agradeço ao órgão que me concedeu a bolsa CAPES-REUNI.

OTIMIZAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ÓLEO MICROBIANO PELA LEVEDURA *Candida zeylanoides* QU 33¹

Autor: Priscila Dallé da Rosa

Orientadora: Patricia Valente

RESUMO

Atualmente o óleo microbiano está sendo intensivamente estudado com a intenção de suprir o mercado que o consome, principalmente tendo um grande interesse no emprego como uma fonte alternativa de biocombustível, sendo limpa e renovável. Com o objetivo de otimizar a produção do óleo microbiano, o presente trabalho avaliou a produção de biomassa, lipídeos e composição de ácidos graxos da levedura *Candida zeylanoides* QU 33 quando cultivada em diferentes fontes de carbono (lactose, glicose, glicerol e xilose), nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de amônio, peptona e extrato de levedura), assim como diferentes condições de cultivo (temperatura, agitação, pH e razão carbono/nitrogênio). Este trabalho também apresenta uma técnica de triagem de acumulo de lipídeo intracelular, com a metodologia do Vermelho de Nilo, na qual as células boas acumuladoras de lipídeo emitiram fluorescência amarelo-ouro. A composição de ácidos graxos do óleo produzido pela *C. zeylanoides* QU33 quando cultivada em glicose com diferentes fontes de nitrogênio apresentou potencial na utilização como matéria prima tanto para o biodiesel quanto para indústria de alimentos. O uso combinado de glicose com sulfato de amônio pela *C. zeylanoides* QU33 resultou na produção de óleo com elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados. Feita a triagem dos fatores que mais interferiram na produção do óleo microbiano, foi delineado um modelo experimental usando a metodologia de superfície de resposta a fim de otimizar a produção de lipídeo intracelular por esta levedura.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia Industrial: Microbiologia de Matérias Primas e Bioprocessos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (118p.) Julho, 2014.

OPTIMIZATION OF MICROBIAL OIL BIOSYNTHESIS BY THE YEAST *Candida zeylanoides* QU 33²

Author: Priscila Dallé da Rosa

Advisor: Patricia Valente

ABSTRACT

Currently, microbial oil is being intensively studied aiming to supply the consumer market, especially with a great interest in its use as an alternative source of biofuel, clean and renewable. Aiming the optimization of the production of microbial oil, in the present work it was evaluated the production of biomass, lipids and the fatty acid composition of the yeast *Candida zeylanoides* QU 33 when cultivated with different carbon sources (lactose, glucose, glycerol and xylose), nitrogen (ammonium sulfate, ammonium nitrate, peptone and yeast extract), as well as different culture conditions (temperature, shaking speed, pH and carbon/nitrogen ratio). A new screening methodology for the evaluation of intracellular lipid accumulation is also presented, using Nile Red, in which the cells that are good lipid producers present a golden-yellow fluorescence. The fatty acid composition of the oil produced by *C. zeylanoides* QU33 cultivated in glucose and different nitrogen sources presented potential for use as raw material for biodiesel production or at the food industry. The combined use of glucose and ammonium sulfate by *C. zeylanoides* QU33 resulted in the production of oil with elevated levels of polyunsaturated fatty acids. After the evaluation of the factors that mainly interfered in the production of microbial oil, an experimental model was designed using the response surface methodology for optimization of the production of intracellular lipids by this yeast.

²Master dissertation in Environmental and Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (118p.) July, 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIÇÕES	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Utilização de óleos como alimento funcional.....	5
2.2 Rotas alternativas para síntese de biodiesel: matéria-prima oleaginosa.	8
2.3 Atividade antimicrobiana de óleos naturais	16
2.4 Perfil lipídico dos óleos microbianos.....	19
2.5 Parâmetros que afetam a produção do óleo microbiano.....	23
2.6 Emprego da metodologia de superfície de resposta na otimização da produção de óleo microbiano.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS GERAL	29
3.1 Microrganismo.....	29
3.2 Pré-inóculo.....	29
3.3 Condições de Cultura	30
3.4 Determinações da biomassa.....	30
3.5 Extração de lipídeo	31
3.6 Determinação da fluorescência por Vermelho de Nilo	31
3.7 Identificação molecular da levedura	32
3.8 Fluxograma da organização dos experimentos.....	33
4 ARTIGOS	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL	89
6. CONCLUSÕES.....	106
7. BIBLIOGRAFIA	108

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da transesterificação de um triacilglicerídeo genérico com metanol (Suarez et al., 2007).....13
- Figura 2:** Mecanismo de uma transesterificação alcalina de triglicerídeo, onde B é uma base de Bronsted (Suarez et al., 2007).....13
- Figura 3:** Mecanismo de transesterificação em meio ácido (Suarez et al., 2007).....14
- Figura 4:** Equações da reação de transesterificação de um triacilglicerídeo com metanol catalisada por hidróxido de potássio (Geris et al., 2007).....14
- Figura 5:** Crescimento celular da *Candida zeylanoides* QU33 sob as condições de cultivo de 25°C, 150 rpm, por 7 dias91
- Figura 6:** *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano em pH de 2, 3, 4, 6 e 8 na figura da direita e da esquerda com luz branca. Segundo as condições de cultivo de 25°C, 150 rpm, por 72 h.....92
- Figura 7:** *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano nas temperaturas de 20°C, 25°C, 35°C e 40°C na imagem da esquerda e na da direita leveduras sob a luz branca. Segundo as condições de cultivo 150 rpm, por 72 h.....95
- Figura 8:** *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano concentrações de glicose, como 5%, 8%, 12%, 14% e 20%. Segundo as condições de cultivo 25°C, 150 rpm, por 72 h.....96
- Figura 9:** *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano nas velocidades de agitação de 150, 200 e 300 rpm. Segundo as condições de cultivo 25°C, 150 rpm, por 72 h...97

Figura 10: *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano em diferentes fontes de nitrogênio. S: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, N: NH_4NO_3 , P: Peptona, YE: Extrato de levedura. Condições de cultivo 25°C, 150 rpm, por 72 h.....99

Figura 11: *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano nas diferentes razões C/N com a fonte de carbono sendo glicose e a fonte de nitrogênio sendo peptona. Condições de cultivo 25°C, 150 rpm, por 72 h. Razões C/N de 10:1, 20:1, 100:1, 200:1 e 400:1.101

Figura 12: Composição dos principais ácidos graxos da *C. zeylanoides*. Condições de cultura da Fig. 10.....102

Figura 13: *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano a partir da otimização com sulfato de amônio. Condições 150 rpm, por 120 h, pH 7, 14% de glicose. A figura da direita a 20 °C e a figura da esquerda a 28°C.....104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil lipídico das leveduras oleaginosas.....	17
Tabela 2: Ensaio preliminar da faixa de crescimento da levedura QU33 em diferentes pH.....	74
Tabela 3: Ensaio preliminar para avaliar o crescimento da levedura QU33 em diferentes temperaturas.....	75

LISTA DE ABREVIÇÕES

AMP	Adenosina 5'-monofosfato
ANP	Agência Nacional de Petróleo
B5	5% de biodiesel misturado ao diese
C	Carbono
C/N	Carbono/Nitrogênio
CG	Cromatografia gasosa
CoA	Coenzima
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis.
GC-FID	Cromatógrafo gasoso com detector de ionizador de
chamas	
L/B	Razão de lípideo em biomassa seca
MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
QU	Levedura da coleção do queijo
YE	Yeast extract (extrato de levedura)

1. INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo do tempo, o homem conseguiu cultivar microrganismos, bem como isolar e identificar quimicamente os seus produtos naturais microbianos. E um grupo muito especial, os fungos, forma um reino de seres vivos de grande interesse industrial, em virtude da sua aplicação na economia mundial com substâncias de alto valor agregado, como na indústria da farmoquímica, com enzimas, solventes, antibióticos entre outros e também na indústria de alimentos com cervejas, vinhos, queijos, vitaminas, etc (Tai & Stephanopoulos, 2013). Foi com a descoberta da penicilina pelo médico escocês Alexander Fleming (1881-1955), produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, que se tornou marco do uso medicinal de produtos microbianos, revolucionando a medicina e o tratamento das infecções bacterianas, como consequência o aumento da expectativa de vida do homem no planeta.

Algumas espécies de leveduras, como *Lipomyces starkeyi* acumulam até aproximadamente 70% do peso seco em lipídeos (Angerbauer *et al.*, 2008). Também já foram relatadas outras espécies de leveduras boas acumuladoras de lipídeo em suas células como *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Cryptococcus curvatus* e *Yarrowia lipolytica* (Ageitos *et al.*, 2011) podendo ser então uma fonte promissora de óleo microbiano (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Diversas aplicações biotecnológicas são possíveis para o óleo produzido por leveduras, tanto a partir dos ácidos graxos livres quanto de seus

derivados. De qualquer forma, os lipídeos e óleos representam uma enorme oportunidade para exploração biotecnológica (Hou, 2008) e a pesquisa de novas fontes de óleo e de suas aplicações é necessária.

O alto teor de lipídeos produzidos, aliado à grande produtividade em biomassa, torna as leveduras excelentes candidatas à produção de óleo microbiano para diversas finalidades, podendo ser usadas como surfactantes naturais, nutracêuticos, biocombustíveis, na indústria de alimentos e de cosméticos de modo geral. Dessa forma estudos estão atualmente focados na maximização da produção de óleo por esses microrganismos, tendo como vantagem ser uma fonte de energia limpa e renovável, não contribuindo para a poluição do planeta, como os combustíveis fósseis, e também não ocupando hectares de terra e nem dependendo das condições climáticas como as leguminosas oleaginosas. Além disso os custos de produção do óleo podem ser reduzidos usando resíduos industriais como fonte de carbono ou aplicando a biomassa residual do processo de cultivo do microrganismo em outros processos biotecnológicos. Nos microrganismos os lipídeos são sintetizados durante a fase de crescimento, suas vias metabólicas de síntese de lipídeo, quando não necessitam gastar energia momentânea, a armazenam na forma de lipídeos neutros, os triglicerídeos, composto formado por uma molécula de glicerol e de três cadeias de ácidos graxos. A composição de lipídeo varia de espécie para espécie, com as condições de cultivo, com a disponibilidade de nutrientes e com estágio de crescimento. Outros fatores que podem influencia o meio de cultura são a temperatura de incubação e o pH, já relatados como

fatores importantes(Hall & Ratledge, 1977)(Gill *et al.*, 1977)(Jang *et al.*, 2005)(Zhu *et al.*, 2008)(Fei *et al.*, 2011) em trabalhos anteriores, sendo um dos objetivos desse presente trabalho avaliar esses parâmetros.

O objetivo deste estudo se concentra em identificar e avaliar o potencial biotecnológico da levedura acumuladora de lipídeo *Candida zeylanoides* QU33, isolada de queijo artesanal do Rio Grande do Sul. Os objetivos específicos foram divididos em tópicos, como segue.

- Identificar o microrganismo através do sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA.
- Avaliar a produção de biomassa, lipídeos e composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa da levedura QU33 testando as diferentes fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de amônio, extrato de levedura e peptona).
- Avaliar a produção de biomassa e lipídeos quando cultivada em diferentes fontes de carbono (lactose, glicose, glicerol e xilose), diferentes razões C/N, assim como diferentes condições de cultivo (agitação, diferentes pH, temperatura de incubação e concentração de glicose).
- Selecionados os fatores acima que influenciam a síntese do óleo microbiano aplicar a metodologia de superfície de resposta a fim de otimizar a produção desse óleo.

Em resumo este trabalho teve como objetivo produzir óleo microbiano a partir de uma linhagem de levedura potencialmente acumuladora de óleo utilizando diversas fontes de carbono e nitrogênio, como substrato. Uma triagem dos parâmetros ideais para acúmulo de lipídeo pela levedura QU 33 foram realizadas. Depois de selecionados esses parâmetros, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta para otimizar a síntese de óleo microbiano. Esta dissertação foi elaborada com base nos artigos produzidos durante a realização do presente trabalho e será organizada por meio da apresentação dos Artigos I, II e III.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Utilização de óleos como alimento funcional

Os alimentos funcionais devem apresentar propriedades benéficas além das nutricionais básicas, sendo apresentados na forma de alimentos comuns. São consumidos em dietas convencionais, que demonstram capacidade de regular as funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias (Souza *et al.*, 2003).

A FDA (*Food and Drug Administration*) regula os alimentos funcionais, com base no uso que se pretende dar ao produto, na descrição presente nos rótulos ou nos ingredientes do produto. A partir destes critérios, a FDA classificou os alimentos funcionais em cinco categorias: alimento, suplementos alimentares, alimento para usos dietéticos especiais, alimento-medicamento ou droga. E a portaria nº 398, de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil diz que "*é alimento funcional todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos, fisiológicos ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica*" (ANVISA, 1999).

O termo nutracêutico define uma ampla variedade de alimentos e componentes alimentícios com apelos de saúde. Sua ação varia do suprimento de minerais e vitaminas essenciais até a proteção contra várias doenças

infecciosas (Valenzuela, 2011). Tais produtos podem abranger nutrientes isolados, suplementos dietéticos e dietas para alimentos geneticamente planejados, alimentos funcionais, produtos herbais e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas (Fornazzari *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado que o consumo de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poliinsaturados (PUFAs) traz benefícios à saúde humana. O principal problema é que os alimentos que ingerimos, na maioria das vezes, não fornecem a quantidade necessária destes ácidos graxos insaturados. A deficiência dessas “gorduras boas” na dieta, atualmente, é alarmante e está ligada a diversos problemas de saúde. Atualmente as principais fontes desse tipo de gordura para produção de nutracêuticos são vegetais como a oliva, a soja, a canola, o milho, o girassol, a linhaça e o abacate, além da gordura animal de alguns peixes, por exemplo, o salmão. Este último possui o inconveniente do gosto residual mínimo que fica retido nas papilas gustativas dos consumidores, mesmo sendo administrado na forma de cápsulas gelatinosas. Atualmente existem pesquisas com o objetivo de obter fontes alternativas destes ácidos graxos, assim como sua suplementação em alimentos, objetivando ampliar a variedade de produtos ricos em MUFAs e PUFAs que estejam mais acessíveis ao consumidor. Como fontes alternativas para a obtenção de MUFAs e PUFAs encontram-se os microrganismos. Entre os microrganismos, os mais estudados para produção de óleo são as microalgas (Li *et al.*, 2008) e fungos oleaginosos (Zhu *et al.*, 2008), e também as leveduras, pois são capazes de acumular lipídeos, podendo produzi-los em

escalas compatíveis com o uso industrial. Entre as vantagens do uso de leveduras para obtenção de óleo microbiano está o fato de que elas são facilmente cultivadas em biorreatores e de serem microrganismos geralmente reconhecidos como seguros para fins alimentícios. As leveduras produzem um alto teor de triglicerídeos monoinsaturados (MUFAs), cuja ingestão é de extrema importância para a saúde humana.

O efeito benéfico dos PUFAs e dos MUFAs na diminuição do risco de doenças cardiovasculares tem sido alvo de estudos. Uma dieta rica em MUFAs (ácido oléico) conduz a uma redução da glicose e pressão arterial e aumenta os níveis do colesterol HDL (Fornazzari *et al.*, 2007). Existem evidências relacionando o baixo índice de doenças cardíacas e de desenvolvimento de tumores com o elevado consumo de azeite de oliva, principal fonte do ácido oléico (MUFA) pela população do Mediterrâneo (Assy *et al.*, 2009). Estudos mostraram que o elevado consumo de sal, baixo consumo de PUFAs, e elevado consumo de ácidos graxos *trans* são os riscos alimentares associados à maior mortalidade na população dos Estados Unidos (Danaei *et al.*, 2009). As doenças do aparelho circulatório - associadas à má alimentação, consumo excessivo de álcool, tabagismo e falta de atividade física – lideram o *ranking* e são as que mais matam homens e mulheres no Brasil. Como nos outros países, no Brasil, as doenças crônicas não transmissíveis também se constituem como o problema de saúde de maior magnitude. São responsáveis por 72% das causas de mortes, com destaque para doenças do aparelho circulatório (31,3%), câncer (16,3%), diabetes (5,2%) e doença

respiratória crônica (5,8%), e atingem indivíduos de todas as camadas socioeconômicas e, de forma mais intensa, aqueles pertencentes a grupos vulneráveis, como os idosos, os de baixa escolaridade e renda (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cartilha_dcnt_completa_portugues.pdf).

2.2 Rotas alternativas para síntese de biodiesel: matéria-prima oleaginosa

A crise energética mundial tem levado à busca de alternativas para o uso de combustíveis fósseis, com o objetivo de controlar as alterações climáticas em escala global, sendo a principal alternativa o uso de biocombustíveis. O biodiesel apresenta desafios visando o aumento de sua competitividade econômica com os combustíveis fósseis e a diminuição/ausência de competição com cultivos vegetais com finalidades alimentícias (Chisti, 2008). Dados do Fundo Monetário Internacional demonstram que os biocombustíveis foram responsáveis por quase metade do aumento no consumo de cultivos comestíveis nos anos de 2006/2007, exemplificando de forma incontestável essa competição combustível versus alimento. Sendo as leveduras microrganismos facilmente cultiváveis em escalas industriais, seu isolamento e exploração biotecnológica é um procedimento não destrutivo e sem interferência com os cultivos vegetais utilizados para alimentação humana e animal.

Biodiesel é um combustível que pode ser gerado por craqueamento, esterificação ou transesterificação. Neste processo, são utilizados óleo (vegetal, animal ou de outras fontes) e solvente orgânico (normalmente metanol ou etanol), juntamente com um catalisador (químico ou enzimático), produzindo ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol (Chisti, 2007). O Brasil possuía em janeiro de 2010 uma capacidade instalada e autorizada pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) para produção de 4,7 bilhões de litros de biodiesel, porém a produção em 2009 foi de apenas 1,6 bilhões de litros (www.anp.gov.br). O principal problema apontado como causa da pouca produção é a baixa oferta de óleos vegetais a preços acessíveis para a produção de biodiesel. O crescimento esperado da demanda de biodiesel no mercado nacional com a introdução do B5 torna os estudos na área de óleos que possam ser utilizados para produção do biocombustível uma questão de suma importância para o país, principalmente em vista das críticas mundiais referentes ao uso de plantações que deveriam estar destinadas ao consumo humano e/ou terra que deveria estar sendo utilizada para o mesmo fim (Vasudevan & Briggs, 2008).

Os custos da produção de biodiesel dependem significativamente da matéria-prima utilizada (óleo de soja, dendê, mamona, algodão, girassol) e da região do país onde ocorre a produção do biocombustível (Vasudevan & Briggs, 2008). Portanto, a fonte de triglicerídeos utilizados atualmente na produção de biodiesel é um dos fatores de preocupação quanto à viabilidade da produção do biocombustível. Devido à grande biodiversidade, diversidade climática e condições do solo, o Brasil possui grandes fontes de óleo vegetal

como óleo de soja, de algodão, de palma, coco, canola, dendê, mamona, pinhão manso e outros. Indubitavelmente, pelo fato do Brasil ser, atualmente, o segundo maior produtor mundial de soja e ter uma indústria de processamento dessa oleaginosa muito bem desenvolvida, esta fonte de óleo ocupou uma posição proeminente no desenvolvimento do Biodiesel (Rinaldi *et al.*, 2007). Porém, as principais desvantagens no uso de plantas oleaginosas como fontes de óleo são: utilização de plantas obtidas apenas por extrativismo; sazonalidade de algumas culturas; óleo obtido de apenas parte da planta, normalmente a semente, diminuindo o rendimento; utilização de grandes áreas agrícolas para cultivo de plantas visando extração de óleo; competição com atividades do setor de alimentos, resultando em diminuição da área plantada para alimentação e conseqüente aumento do custo dos alimentos; pressão internacional para redução do uso de vegetais na produção de biocombustíveis.

Pesquisas com o objetivo de aprimorar as culturas vegetais para produção de óleo estão sendo incentivadas (Meka *et al.*, 2006), porém também é interessante avaliar outras fontes de óleo além das plantas, já que o biodiesel pode ser produzido a partir de qualquer fonte de triglicerídeos. Entre as fontes alternativas de óleo está a gordura animal (cujo uso não é totalmente aceito), óleo de frituras (cuja disponibilidade não é adequada para sustentar uma usina de biodiesel) e microrganismos. Entre os microrganismos, existem relatos da produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas (Chisti, 2007)(Li *et al.*, 2008) e de fungos oleaginosos (Zhu *et al.*, 2008). Porém estes dois grupos microbianos produzem óleos ricos em PUFAs. Esse tipo de ácido graxo é

susceptível à oxidação durante a estocagem, sendo que o óleo utilizado para biodiesel deve conter pouca quantidade desses ácidos graxos para aumentar a estabilidade à oxidação e, portanto, aumentar a estabilidade na estocagem (Gema *et al.*, 2002) (Jang *et al.*, 2005) (Papanikolaou *et al.*, 2004).

Outros microrganismos também são capazes de acumular lipídeos, podendo produzi-los em escalas compatíveis com o uso industrial. Como dito anteriormente, apesar de todos os seres vivos serem capazes de sintetizar lipídeos, apenas poucas espécies de microrganismos são capazes de acumular mais de 20% da massa celular na forma de lipídeos usados como reserva energética. As bactérias, por exemplo, produzem outros materiais de reserva como o poli-hidroxi-butilato ou alcenoato (Tortora, 2000). Portanto, o acúmulo de triglicerídeos fica restrito às leveduras, a fungos filamentosos e algumas algas (Ratledge, 2004). A maior parte dos lipídeos produzidos pelas leveduras é constituída por triglicerídeos saturados e MUFAs, ideais para a produção de biodiesel.

Uma forma de transformar triglicerídeos em combustível é a transesterificação, como já foi citado, onde ocorre a reação de mono-álcoois de cadeias curtas em presença de um catalisador, dando origem a monoésteres de ácidos graxos (Figura 1). Sendo composta de três reações consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diglicerídeos e monoglicerídeos como intermediários (Suarez *et al.*, 2007). Apesar da estequiometria geral da equação requerer três mols do mono-álcool para cada mol de triglicerídeo, para isso acontecer é necessário um excesso de álcool no meio reacional para assim aumentar o rendimento do éster, bem como permitir a sua separação do

glicerol formado, já que há reversibilidade das reações. Sendo importante a presença de água para o equilíbrio entre os diferentes ésteres e seus respectivos ácidos graxos e álcoois (glicerol e/ou mono-álcoois). Entre os vários tipos de catalisadores estudados para a reação de transesterificação, os mais tradicionais são as bases e ácidos de Bronsted, sendo os principais exemplos os hidróxidos e alcóxidos de metais alcalinos, e os ácidos sulfúrico, fosfórico, clorídrico e organossulfônico. O mecanismo de ação genérico está demonstrado nas Figuras 2 e 3, onde a carbonila do triglicerídeo sofre um ataque nucleofílico do alcóxido, conforme a reação (ii), formando o éster de monoálcool e o ânion, o qual, após a desprotonação do ácido conjugado da base formado na reação, regenera a base de partida e produz, neste caso, um diglicerídeo. Reações similares irão ocorrer com os diglicerídeos formados, produzindo monoglicerídeos, os quais, em processos similares, formarão finalmente a glicerina (Figura 1 e 4). E quando ocorre uma transesterificação com um catalisador ácido, a carbonila do triglicerídeo, sofre um ataque eletrofílico do H^+ , conforme a reação (i), formando um carbocátion. A seguir, este carbocátion sofre um ataque nucleofílico de uma molécula do mono-álcool, formando um intermediário tetraédrico, conforme a reação (ii). Então, ocorre a eliminação de, neste caso, um diglicerídeo e um éster graxo do mono-álcool, juntamente com a regeneração da espécie H^+ . Por processos semelhantes serão formados os monoglicerídeos e a glicerina (Figura 1).

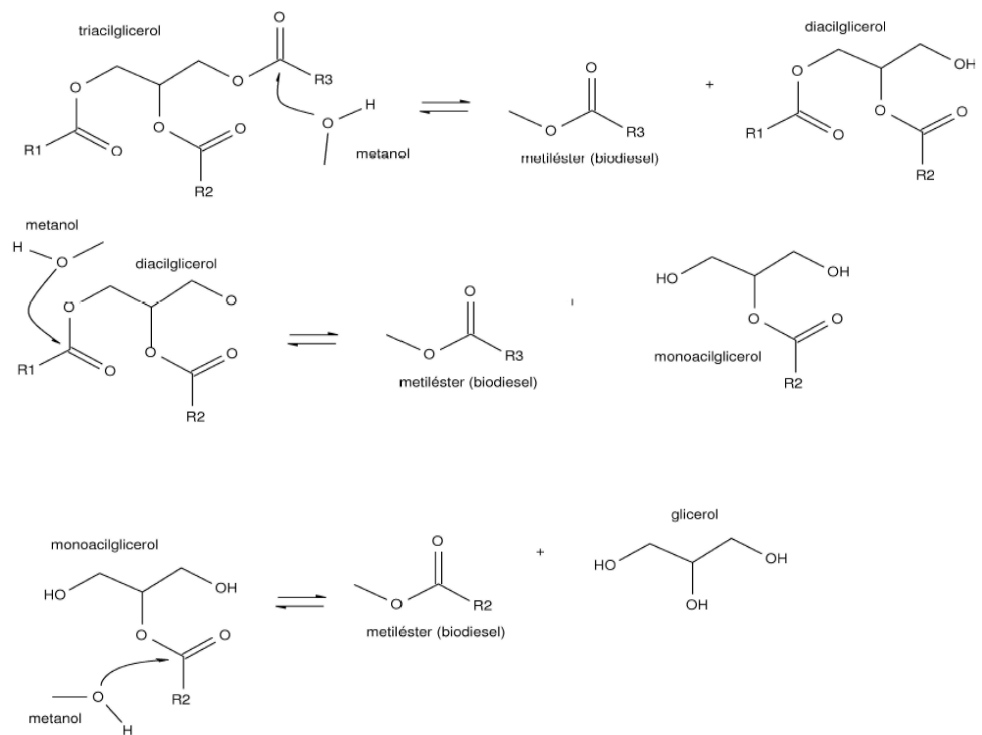


Figura 1: Esquema da transesterificação de um triacilglicerídeo genérico com metanol (Suarez *et al.*, 2007).

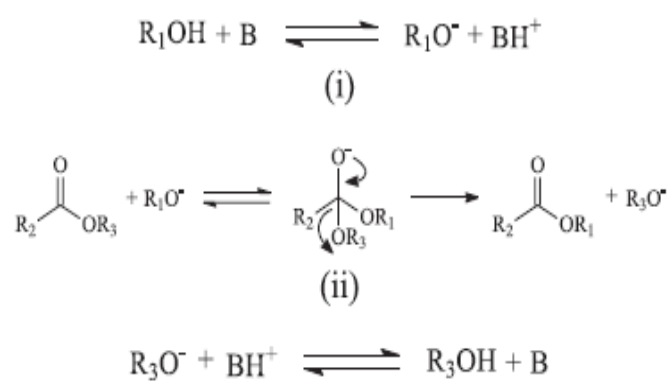


Figura 2: Mecanismo de uma transesterificação alcalina de triglicerídeo, onde B é uma base de Bronsted (Suarez *et al.*, 2007).

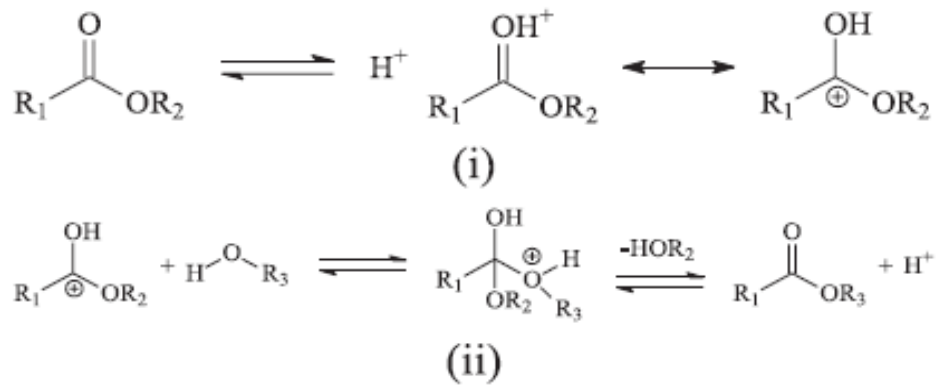


Figura 3: Mecanismo de transesterificação em meio ácido (Suarez *et al.*, 2007).

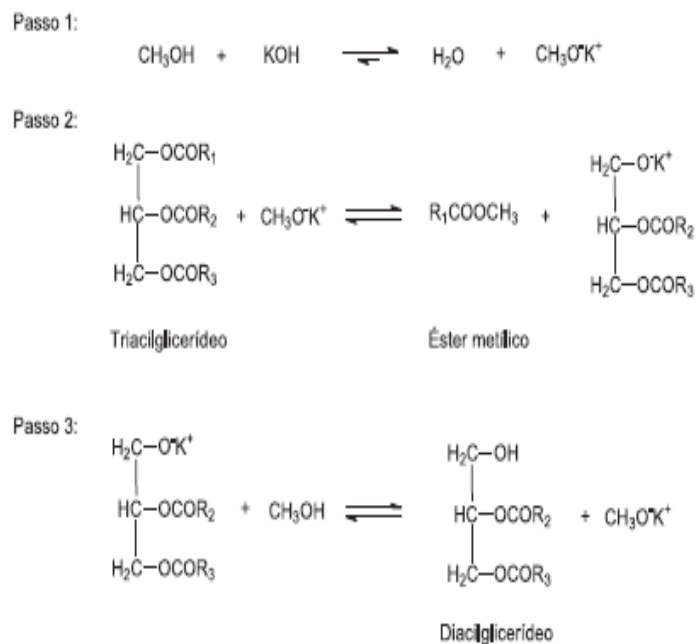


Figura 4: Equações da reação de transesterificação de um triacilglicerídeo com metanol catalisada por hidróxido de potássio (Geris *et al.*, 2007).

O primeiro passo é a reação da base com metanol, produzindo alcóxido (base conjugada) e água (ácido conjugado). O alcóxido, agindo como nucleófilo, ataca o átomo de carbono deficiente em elétrons do grupo carbonila do triacilglicerídeo; a ruptura da ligação entre carbono e oxigênio do glicerídeo no intermediário tetraédrico conduz ao produto carbonilado (éster metílico) e ao diacilglicerídeo, este último formado após a remoção do átomo de hidrogênio do metanol, obtendo o ânion metóxido, permitindo a continuidade do processo reacional (Geris *et al*, 2007).

Com relação ao agente transesterificante, o processo reacional ocorre preferencialmente com álcoois de baixa massa molecular, como por exemplo, metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico. Metanol é o mais utilizado devido ao seu baixo custo na maioria dos países e às suas vantagens físicas e químicas (polaridade, álcool de cadeia mais curta, reage rapidamente com o triacilglicerídeo e dissolve facilmente o catalisador básico). Além disso, permite a separação simultânea do glicerol. A mesma reação usando etanol é mais complicada, pois requer um álcool anidro, bem como um óleo com baixo teor de água para levar à separação do glicerol. Os catalisadores básicos mais comuns são KOH e NaOH onde foram observados maior rendimento e seletividade (Francielle *et al.*, 2009).

2.3 Atividade antimicrobiana de óleos naturais

Aplicações farmacológicas dos ácidos graxos e seus derivados podem incluir: formulações tópicas para o tratamento de infecções bacterianas, antimicrobianos em curativos para ferimentos, conservantes em produtos para a pele e cabelo, produtos para higiene oral, etc (Zhang *et al.*, 2014). O emprego dos óleos na formulação de nanocápsulas capazes de liberar os fármacos de forma controlada é um avanço extremamente importante da nanotecnologia aplicada à área farmacêutica. Além disso, podem ser utilizados como conservantes em alimentos, onde o uso de outros agentes antimicrobianos não é desejável (Santos *et al.*, 2014). Outra aplicação é na suplementação de ração animal, já tendo sido demonstrado que rações suplementadas com ácido butírico, ácidos graxos de cadeia média e/ou óleos essenciais são capazes de diminuir a incidência de doenças em aves (Timbermont *et al.*, 2010). O ácido docosahexaenóico (DHA) é um importante ácido graxo poliinsaturado (ômega-3) produzido por microrganismos e que vem sendo utilizado em medicamentos terapêuticos contra doenças cardiovasculares, câncer e Alzheimer, assim como outros ômega-3 (Fornazzari *et al.*, 2007).

Existem relatos na literatura do potencial antimicrobiano de ácidos graxos, produzidos como uma defesa natural contra microrganismos patogênicos (Smith *et al.*, 2010). O espectro de ação e a potência são influenciados pelo grau de insaturação, tamanho da cadeia de carbono e orientação das ligações duplas (*cis* ou *trans*). Entre os ácidos graxos livres saturados, o ácido cáprico (C10:0) e o ácido láurico (C12:0) são os mais ativos,

enquanto entre os MUFAs, os mais ativos são o ácido miristoléico (C14:1) e ácido palmitoléico (C16:1). Muitos PUFAs com 18 e 20 carbonos possuem atividade antimicrobiana bastante potente, e geralmente os ácidos graxos *cis* são mais ativos do que os *trans*. O principal alvo da ação dos ácidos graxos em bactérias é a membrana celular, onde causam a ruptura da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa. Eles também podem inibir atividades enzimáticas, impedir a entrada de nutrientes na célula, gerar produtos de degradação que causam peroxidação e causar a lise celular direta (Smith *et al.*, 2010).

Recentemente, investigações acerca do potencial antimicrobiano *in vitro* de ácidos graxos livres e seus ésteres de etila e/ou metila contra patógenos bucais tem demonstrado a viabilidade do uso desses ácidos como agentes terapêuticos capazes de incrementar a saúde bucal. Aparentemente, a especificidade de ação do ácido graxo está relacionada à espécie de microrganismo alvo, sendo os ácidos fórmico, cáprico e láurico amplamente inibitórios para bactérias Gram positivas (Huang *et al.*, 2011). MUFAs e PUFAs, além de seus ésteres, também têm demonstrado forte capacidade antimicrobiana (Huang *et al.*, 2010). Também foram demonstrado que *Helicobacter pylori* é rapidamente inibido por ácidos graxos de cadeia média (C10:0 a C14:0) e exibe uma menor frequência de desenvolvimento de resistência espontânea a ácidos graxos do que a metronidazol e tetraciclina Petschow *at al.*, (1996). Apesar de a maior ação ser, aparentemente, contra bactérias Gram positivas, (Wille & Kydonieus, 2003) relataram que ácido

palmitoléico em combinação com etanol possui um efeito sinérgico contra bactérias Gram negativas. A maior resistência das bactérias Gram negativas é relacionada à presença de lipopolissacarídeos na membrana externa, que funcionam como uma barreira e impedem o acúmulo de ácidos graxos no interior da célula. Tratamento com substâncias que removem a camada de lipopolissacarídeos, como etilenodiaminotetraacetato, torna esses microrganismos sensíveis aos ácidos graxos (Sheu & Freese, 1973). A susceptibilidade de várias bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Escherichia coli*, aos ácidos graxos e seus derivados já foi amplamente demonstrada na literatura (Levison, 1973)(Marounek *et al.*, 2003)(Miller *et al.*, 1977) (Nobmann *et al.*, 2009)(Skrivanová *et al.*, 2005), incluindo a inibição da formação de biofilmes.

De forma geral, existem menos relatos acerca da inibição de fungos por ácidos graxos. Liu *et al.* (2008) avaliaram a utilização desses ácidos no controle de fungos fitopatogênicos, tanto *in vitro* como *in situ*. Os ácidos graxos saturados demonstraram capacidade inibitória *in vitro* mais potente do que os insaturados, sendo capazes de inibir o crescimento do micélio fúngico e a germinação de esporos. Em experimentos a campo, uma mistura de ácidos palmítico e oléico no solo foi capaz de melhorar o crescimento de plântulas de tomate e pepino. Clément *et al.* (2008) conseguiram inibir *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* utilizando ácidos graxos livres provenientes da saponificação de lipídeos do leite. O composto mais potente foi o ácido gama-linoléico, porém ácido cáprico, ácido lauroléico, ácido metildodecanóico e ácido

miristoléico também tiveram atividade antifúngica. Apesar de *Candida albicans* de cavidade bucal ser menos sensível à ação dos ácidos graxos e derivados que as bactérias bucais (Huang *et al.*, 2011), ainda é inibida (Huang *et al.*, 2010).

2.4 Perfil lipídico dos óleos microbianos

Os lipídeos microbianos são considerados fontes alternativas de óleos e principalmente de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poliinsaturados (PUFAs) e podem vir a contribuir para a produção de óleos, visto que em geral sua estrutura é similar aos óleos vegetais comuns. Os principais ácidos graxos dos lipídeos produzidos por microrganismos oleaginosos são o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), de ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), e ácido linolênico (C18:3), que são os principais compostos do Biodiesel (Fei *et al.*, 2011).

O conteúdo em lipídeos e o perfil de ácidos graxos variam de acordo com a espécie (Beopoulos *et al.*, 2009) e de acordo com a fonte de carbono (Easterling *et al.*, 2009) conforme pode ser visto na Tabela 1. Papanikolaou *et al.*, (2001) produziram biomassa de *Yarrowia lipolytica* com lipídeos de composição similar à manteiga de cacau utilizando como substrato gorduras industriais. Utilizando glicerol como fonte de carbono, Papanikolaou & Aggelis (2002) produziram biomassa com 43% de lipídeos (base seca), contendo 47% de ácido oléico e 21% de ácido linoléico. A composição de metil ésteres de

ácidos graxos (FAME) da linhagem *Yarrowia lipolytica* QU21 analisado por cromatografia gasosa (GC) foi ácido mirístico (C14:0), ácido miristoleico (C14:1), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido heptadecanóico (C17:1), ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1) com a fonte de carbono sendo glicose e a fonte de nitrogênio sendo sulfato de amônio (Rosa, Priscila Dallé, 2011).

Zhu *et al.* (2008) estudaram os efeitos dos componentes do meio e das condições de cultivo na produção de biomassa e lipídeos por *Trichosporon fermentans*. Ao otimizar as condições de pH em 6,5 e 25°C obtiveram 28,1 g/L de biomassa e 62,4% de lipídeos em sete dias de cultivo em melação. Similar aos óleos vegetais o perfil de lipídeos obtidos foi na maioria ácido palmítico, esteárico, oléico e linoléico, sendo em torno de 64% de ácidos graxos insaturados.

A demanda por óleos e gorduras vem aumentando tanto para a indústria de alimentos quanto para propósitos não comestíveis. O interesse em micro-organismos produtores de lipídeos como substituintes para a gordura de origem animal e vegetal resulta em numerosas investigações, uma vez que lipídeos de microrganismos têm importantes características. Estes microrganismos podem crescer razoavelmente bem em substratos de baixo custo como subprodutos da indústria de alimentos e agroindústria.

O fungo *Mortierella isabellina* apresenta a mesma composição de ácidos graxos para as duas fontes de carbono testadas, tanto para glicose quanto para o glicerol (16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:3, 20:4). No experimento

com *M. isabellina* também foram testadas diferentes razões de C/N, utilizando no mínimo de 150:1, e no máximo de 340:1, o que não demonstrou diferença significativa na razão lipídeo/biomassa. No entanto mostrou vantagem no crescimento celular o aumento da razão C/N (Papanikolaou *et al.*, 2004).

Tabela 1: Perfil lipídico de leveduras oleaginosas

Cepa	Fonte de C	Composição de ácidos Graxos	Referência
<i>Candida(107)</i>	Glicose	12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:2	Hall & Ratledge, 1977
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Glicose	16:0, 18:0, 18:2	Iassonova <i>et al.</i> , 2008
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Glicose	16:0, 18:0	Li <i>et al.</i> , 2008
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Lodo de Esgoto	14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 20:1, 22:0	Augerbauer <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Glicose	C16:0, C18:1	Li <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glicose	C16:0, C18:1, C18:2	Li <i>et al.</i> , 2008
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Estearina e Glicerol	12:0, 14:0, 16:0	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2002
<i>Y. lipolytica</i>	Glicose	C16:0, C18:1, C18:2	Beopoulos <i>et al.</i> , 2009
<i>Trichosporon fermentans</i>	Glicose	14:0, 16:0, 18:1, 18:2	Zhu, 2008

A alga heterotrófica *Chlorella* (Xiong *et al.*, 2008) tem como perfil lipídico o C14:0 (ác. mirístico), C16:0 (ác. palmítico), C18:1 (ác. oléico), C18:0 (ác.

esteárico), e também outros menos comum como: C16:1 (ác. palmitoléico), C17:1 (ác. heptadecanóico), C14:1 (ác. miristoléico) semelhante às leveduras.

Como existem grandes preocupações com resíduos industriais por causa da saúde humana e do meio ambiente (solo, água, ar e paisagens). Em prol disso, diversas pesquisas para aplicabilidade desses resíduos têm sido realizadas, e entre essas foram testada a partir lodo de esgoto como fonte de carbono a cepa *Lipomyces starkeyi* DSM 70295 podendo aproveitar esse nutriente para acumular ácidos graxos para fins industriais. Ela foi capaz de acumular os seguintes ácidos graxos: ácido mirístico C14:0, ácido linolênico C18:3, ácido palmítico C16:0, ácido araquídico C20:0, ácido palmitoléico C16:1, ácido gadoléico C20:1, ácido esteárico C18:0, ácido behênico C22:0, ácido oléico C18:1, ácido linoléico C18:2 (Angerbauer *et. al.*,2008).

Quando utilizado estearina como fonte de carbono em *Yarrowia lipolytica* observou-se que os ácidos graxos de C12:0, C14:0 e C16:0 foram mais rapidamente incorporados intracelularmente e, principalmente, usados para as necessidades de crescimento, enquanto C18:0 foi incorporado com taxas reduzidas e foi acumulada principalmente como material de armazenamento. Quando foi utilizado o glicerol industrial como co-substrato, juntamente com estearina, a concentração de ácido graxo insaturado na reserva lipídica aumentou (Papanikolaou *et al.*, 2002). Isso demonstra a grande especificidade que cada microrganismo apresenta no seu metabolismo, deixando perspectivas para futuros estudos.

2.5 Parâmetros que afetam a produção do óleo microbiano

O principal fator que determina o acúmulo de lipídeos em microrganismos é a razão carbono/nitrogênio (C/N), sendo que o excesso de carbono e as condições limitantes de nitrogênio favorecem o processo de acúmulo de lipídeo. O microrganismo esgota rapidamente a fonte de nitrogênio, mas continua a assimilar a fonte de carbono, levando ao acúmulo de triglicerídeos. Para que haja síntese de lipídeos, é necessário um grande suprimento intracelular de acetil-CoA e de NADPH. As espécies de microrganismos oleaginosos possuem uma enzima, ATP citrato liase, que não é encontrada nas não-oleaginosas. Esta enzima catalisa a reação entre o citrato e coenzima A (CoA), formando acetil-CoA e oxaloacetato. A limitação de nitrogênio no meio de cultura induz uma cascata de acontecimentos que resulta no acúmulo de lipídeos. Inicialmente, há um aumento na atividade de AMP desaminase, diminuindo o conteúdo de AMP na célula. Essa diminuição na quantidade de AMP resulta na inibição da enzima isocitrato desidrogenase, que é dependente de AMP nos microrganismos oleaginosos. Portanto, o isocitrato não é metabolizado e é equilibrado com citrato via ação da aconitase, havendo acúmulo de citrato na mitocôndria. O citrato é exportado da mitocôndria por meio de um sistema de efluxo, entrando no citossol e sendo utilizado pela ATP citrato liase na formação de oxaloacetato e acetil CoA, que é utilizada na síntese de ácidos graxos. O oxaloacetato é convertido em malato no citossol e é utilizado no sistema de efluxo para saída do citrato da mitocôndria. O outro componente essencial é o NADPH, que é produzido nos microrganismos oleaginosos via enzima málica. Esta enzima catalisa a reação entre o malato e

NADP⁺, formando piruvato e NADPH (Wynn *et al.*, 1999). Enzimas alternativas geradoras de NADPH também podem estar presentes (Ratledge, 2004).

Além da razão C/N, os tipos de fonte de carbono e de nitrogênio também podem influenciar a produção de lipídeos. A fonte de carbono mais utilizada nos meios sintéticos é a glicose, porém vários trabalhos têm sido dedicados à utilização de outras fontes presentes em material vegetal (amido e xilose) e resíduos agro-industriais. Um dos resíduos mais promissores é o glicerol, subproduto da síntese de biodiesel (Hou, 2008) (Papanikolaou *et al.*, 2002; 2003). Com o aumento da produção de biodiesel, estima-se um aumento da síntese de glicerol que não será absorvido pela demanda atual da indústria farmacêutica. Uma das grandes preocupações atuais é o destino a ser dado a esse excesso de glicerol. A sua utilização como fonte de carbono para o cultivo de microrganismos oleaginosos seria a solução ideal.

Outro fator que também pode influenciar é a suplementação do meio de cultura com óleos vegetais. Neste caso, há a alteração da composição de ácidos graxos formados, podendo haver a produção de lipídeos com determinada composição de interesse (maior ou menor teor de ácidos graxos insaturados e de grau de insaturação) dependendo da manipulação da composição do meio de cultura (Jang *et al.*, 2005).

Diferentes cepas de leveduras podem utilizar diferentes fontes de carbono e até mesmo substrato lipídico fornecidos nos meios de cultura, como substratos para a produção de lipídeos e crescimento de biomassa celular (Ageitos *et al.*, 2011). As fontes de carbono podem ser de glicose, xilose, glicerol, amido, hidrolisados de celulose, e de resíduos orgânicos industriais.

Na maioria dos casos, o aumento do acúmulo de lipídeos ocorre sob a condição de limitação causada por um nutriente diferente de carbono, especialmente de nitrogênio e de fósforo, como já foi relatado que a limitação de fósforo em levedura, tais como *Rhodosporidium toruloides* tem influência sobre a acumulação de lipídeos e que o teor de nitrogênio como substrato não tem nenhuma influência (Wu *et al.*, 2011). Há uma desvantagem inerente deste tipo de estratégia devido ao fato de que o nutriente em excesso ou o estresse fisiológico, que são necessários para aumentar o teor em lipídeos no interior das células estão associados com a divisão reduzida de células, como consequência a produção inferior de biomassa (Ratledge, 2004).

Geralmente o acúmulo de lipídeo e conteúdo de ácidos graxos dependem da fonte de nitrogênio do meio de cultura (Ratledge, 2004). No trabalho com *Cryptococcus albidus* com diferentes fontes de nitrogênio a concentração máxima de lipídeos foi com NH₄Cl (Fei *et al.*, 2011), fonte de nitrogênio inorgânica. No entanto, noutro trabalho com a levedura *Yarrowia sp.*, a fonte de nitrogênio preferida foi a orgânica usando a glicose como fonte de carbono em relação às testadas. As fontes de nitrogênio orgânicas também foram preferidas pela levedura *Trichosporon fermentans* para a produção de lipídeos, porém fontes inorgânicas também são amplamente utilizadas (Zhu *et al.*, 2008).

No trabalho de Papanikolaou *et al.*, 2006 foi demonstrado com a *Yarrowia lipolytica* sob as condições de cultura com uma alta razão da fonte de carbono, glicose, em relação a de fonte de limitantes de nitrogênio, sulfato de amônio (ou seja, C/N elevada proporção no meio) favoreceu a lipogênese.

Outro exemplo é a *Corynebacterium fascians* CF 15, usando sacarose e extrato de levedura, como fonte de carbono e de nitrogênio, respectivamente, fez com que sua concentração de biomassa aumentasse 600% (Amézcuca *et. al.*, 2007) e para *Candida ingens* também se mostrou importante usando esses mesmos substratos. Dessa forma a preferência pela fonte de carbono e de nitrogênio para o crescimento e acúmulo de lipídeo depende de cada microrganismo.

De acordo com a literatura (Morita *et al.*, 2000), microrganismos oleaginosos podem ser divididos em dois grupos em termos de temperaturas ideais para acumulação de lipídeos, de baixo (25-30°C) e de alta (35-40°C) temperatura. *Cryptococcus albidus* utilizado por Morita *et al.* (2000), foi classificado como pertencente à classe de temperatura baixa e também foi visto que o cultivo em temperatura ambiente também foi favorável para o acúmulo de lipídeo.

2.6 Emprego da metodologia de superfície de resposta na otimização da produção de óleo microbiano

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é uma ferramenta estatística eficaz usada para encontrar as condições ideais para diferentes processos complexos. Ela permite otimizar múltiplas variáveis com um número mínimo de experimentos, sendo considerada menos trabalhoso e mais rápida do que outras técnicas de otimização (Stroescu *et al.*, 2013).

É de notar que a maior parte dos estudos relatados acima não implementaram os métodos matemáticos e estatísticos para a otimização do processo e, portanto, envolvem apenas uma otimização separada de cada um dos parâmetros considerados importantes com todos os outros sendo mantidos inalterados. Tal abordagem necessita de vários procedimentos, corridas experimentais, e, portanto, é demorada, ignora os efeitos de interação entre os parâmetros de funcionamento e conduz a uma baixa eficiência de otimização. Essas limitações podem ser evitadas através da aplicação da metodologia de superfície de resposta, que envolve planejamento estatístico de experimentos em que todos os fatores são variados juntos ao longo de um conjunto de ensaios experimentais. Na verdade, a Metodologia de Superfície de Resposta é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas úteis para o desenvolvimento, melhoria e otimização de processos, e pode ser utilizado para avaliar a importância relativa dos diversos fatores que afetam um processo, mesmo na presença de interações complexas (Arbia *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas, os métodos estatísticos foram aplicados a fim de otimizar a composição do meio de cultura para fins industriais. Projetos de estatística são usados principalmente porque fornecem as ferramentas para avaliar simultaneamente uma grande quantidade de variáveis consideradas na formulação de meios de cultura (Batista *et al.*, 2013). Como exemplo, a MSR foi utilizada com *Cryptococcus curvatus* para o planejamento experimental dos parâmetros temperatura ótima, o pH, a concentração de glicerol a fim de obter o melhor crescimento da levedura e a melhor produção de lipídeos. Essa

levedura foi capaz de crescer em glicerol bruto, derivado da produção de biodiesel (Cui *et al.*, 2012).

3.MATERIAL E MÉTODOS GERAL

3.1 Microrganismo

A cultura da levedura *Candida zeylanoides* QU33 utilizada no presente trabalho foi isolada de queijo colonial da região litorânea do estado do Rio Grande do Sul (Landell *et al.*, 2006) e encontra-se depositada na Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) ICB - Bloco P3 com o código UFMG-CM-Y331. Essa levedura foi escolhida por acumular grande quantidade de lipídeo no interior da sua célula.

3.2 Pré-inóculo

O crescimento da levedura foi realizado no meio Agar GYP inclinado (0,5% Extrato de levedura, 1% Peptona, 2% Glicose, 2% Agar), com incubação por 24h na estufa a 25 °C. A partir deste foi coletado com auxílio de uma alça calibrada de 1µL, as células e inoculadas no meio A (10% Glicose, 0,1% (NH₄)₂SO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% de MgCl₂.6H₂O), estes foram submetidos a uma estufa incubadora à temperatura de 25°C e rotação de 150 rpm por 40h em Erlenmeyer de 125 mL, com 50mL de meio A. O crescimento do pré-inóculo é avaliado com espectrofotômetro (Biospectro SP-220) no comprimento de onda de 600nm apresentando uma absorbância de 1.

3.3 Condições de Cultura

O experimento foi conduzido em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de meio. As composições dos meios estão descritas nos artigos. Os experimentos da triagem e do artigo de número I foram submetidos com as seguintes condições de cultivo: a razão C/N de 100:1, com 1% do pré-inóculo, incubados em agitador horizontal (IKA, KS 4000) a 150 rpm durante 72 horas. E nos experimentos da otimização no artigo II e III foram usadas as seguintes condições de cultivo: a razão C/N 200:1, com 10% do pré-inóculo e incubados em agitador horizontal (IKA, KS 4000) a 150 rpm. Com o tempo de incubação do artigo de número II de 120 horas e do artigo de número III de 72 horas.

3.4 Determinações da biomassa

Para a análise gravimétrica, 100 mL de culturas foi transferida para um tubo cônico com capacidade de 50 mL, centrifugado a 6.000 rpm durante 5 minutos para remover o sobrenadante, em seguida foi realizada a lavagem com 15 mL de água estéril, repetindo o processo por duas vezes. As amostras de biomassa foram armazenadas durante 24 h a - 30 °C no freezer Indrel ® CLC300DAF, e liofilizadas no Liotop L 1001 - 48 ° C durante 24 h. Os sedimentos de células liofilizadas foram usados para análise gravimétrica.

3.5 Extração de lipídeo

Os lipídeos foram extraídos com clorofórmio/metanol (2:1, v/v) de acordo com Bligh & Dyer (1959) a partir da biomassa liofilizada, com auxílio do equipamento T 18 BASE DE ULTRA- TURRAX ® / IKA durante 3 min, com resfriamento a cada minuto para evitar a oxidação dos lipídeos. A mistura dos solventes com lipídeo foi filtrada através de um papel filtro (MN - 615 , Macherey - Nagel), e os solventes foram removidos utilizando um Rotaevaporador (Laborota 4000eco, Heidolph) a 60 °C. O lipídeo também foi pesado gravimetricamente.

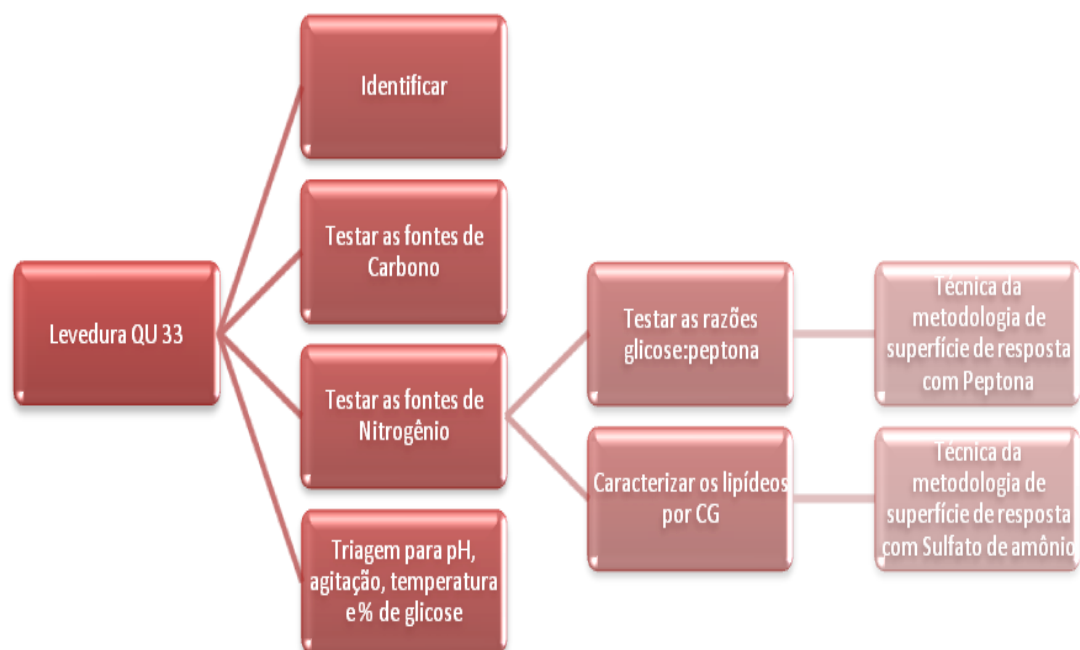
3.6 Determinação da fluorescência por Vermelho de Nilo

Foram feitas suspensões 10 µL de células em lâmina de vidro e coradas com 10 µL vermelho de Nilo 0,1%, a fluorescência foi medida em microscópio de fluorescência (Olympus BX41), usando lentes com comprimentos de onda que variam entre 450-500nm, visível em 40x. Os lipídeos foram observados, como gotícula de coloração amarelo-ouro (dourado) no interior das células leveduriformes.

3.7 Identificação molecular da levedura

A estirpe QU33 foi cultivada aerobicamente em caldo GYP (2% de glicose, 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura), a 25°C. DNA genômico total foi extraído e purificado a partir de culturas de 5 mL, tal como descrito por Osorio-Cadauid et al.(2009). O sequenciamento do domínio D1/D2 da maior subunidade (26S) do DNA ribossômico foi realizada de acordo com Kurtzman & Robnett (1998), utilizando os primers NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 min, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C durante 1 min, e extensão final a 72 °C durante 10 min. O Produto de PCR foi purificado com o método de precipitação com polietilenoglicol (Lis 1980) e sequenciado na empresa empresa Ludwig, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Cbiot/UFRGS), Brasil. A sequência montada foi comparada com as sequências relatadas no GenBank usando a ferramenta BLAST.

3.8 Fluxograma da organização dos experimentos



4. ARTIGOS

I. Rosa, P. D., Mattanna, P., Carboni, D., Amorim, L., Richards, N., & Valente, P. (2014). *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia Microbiologica*. doi:10.1007/s12223-014-0325-3

II. Rosa, P. D., Mattanna, P., Leite, B., & Valente, P. (2014). Influência do sulfato de amônio na síntese de lipídeo pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33 usando a metodologia de superfície de resposta.

III. ROSA, Priscila Dallé; Mattanna, Paula; FLORES, Simone; VALENTE, Patricia. (2014). Optimization for the production of microbial oil by *Candida zeylanoides*: Use of response surface methodology.

I. *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation.

Rosa, P. D., Mattanna, P., Carboni, D., Amorim, L., Richards, N., & Valente, P. (2014). *Folia Microbiologica*. doi:10.1007/s12223-014-0325-3

Candida zeylanoides as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation

Priscila Dallé da Rosa · Paula Mattanna ·
Diógenes Carboni · Lucio Amorim · Nella Richards ·
Patricia Valente

Received: 30 August 2013 / Accepted: 20 May 2014

© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2014

Abstract Lipid homeostasis is well-known in oleaginous yeasts, but there are few non-oleaginous yeast models apart from *Saccharomyces cerevisiae*. We are proposing the non-oleaginous yeast *Candida zeylanoides* QU 33 as model. The aim of this study was to investigate the influence of the carbon/nitrogen ratio and the type of nitrogen source upon oil accumulation by this yeast grown on shake flask cultures. The maximum biomass was obtained in yeast extract (2.39 ± 0.19 g/l), followed by peptone (2.24 ± 0.05 g/l), while the highest content of microbial oil (0.35 ± 0.01 g/l) and the

maximum lipid yield (15.63 %) were achieved with peptone. Oleic acid was the predominant cellular fatty acid in all culture media (>32.23 %), followed by linoleic (>15.79 %) and palmitic acids (>13.47 %). The highest lipid yield using glucose and peptone was obtained at the C/N ratio of 200:1.

Introduction

Interest in lipid metabolism raised in the past years mainly due to the increased awareness of its importance for health problems, since lipid associated disorders, such as obesity and type 2 diabetes, have reached epidemic dimensions in the modern world (Hebert et al. 2013). The fuel industry is also interested in the use of neutral lipids for synthesis of biodiesel (Subramaniam and Dufreche 2010), while the food industry seeks the beneficial effects of a diet rich in polyunsaturated (PUFAs) and monounsaturated fatty acids (MUFAs) (Livingstone et al. 2012).

Lipid homeostasis involves the traffic of extracellular lipids into the cells, and the de novo synthesis and degradation (lipolysis) of the cellular lipid pools, which are present in the form of lipid droplets. Understanding the lipid droplet biology may provide new therapeutic targets, not only for the metabolic disorders, but for some intracellular pathogen infections, such as hepatitis C virus and *Chlamydia* (Walther and Farese 2009), besides new approaches for enhancing total lipid and/or specific lipid yields for biotechnological purposes (Tai and Stephanopoulos 2013). Enzymes involved in lipolysis are structurally different among living beings, although they seem to maintain a high level of functional conservation (Kurat et al. 2006). Lipid de novo synthesis and storage, on the other hand, are highly conserved, favoring the use of model organisms. Microbial models are interesting due to their low generation times, high biomass yields, feasibility for genetic manipulations, and fewer ethical concerns.

P. D. da Rosa · P. Valente
Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente (PPGMAA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

P. D. da Rosa
e-mail: pri_de_rosa@hotmail.com

P. Mattanna · N. Richards
Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, UFSM, Porto Alegre, RS, Brazil

P. Mattanna
e-mail: pmattannapaula@hotmail.com

N. Richards
e-mail: neilarichards@uol.com.br

D. Carboni · L. Amorim
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

D. Carboni
e-mail: dsc_horse@hotmail.com

L. Amorim
e-mail: darthlucio@gmail.com

P. Valente (✉)
Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Sarmento Leite, 500, Office 154, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: patricia.valente@ufrgs.br

Most yeast models for lipid metabolism studies belong to a group known as oleaginous yeasts. Of more than 600 known yeast species, only 5 % have been reported to accumulate more than 25 % of their dry biomass as lipids (Dey and Maiti 2013), and are thus considered oleaginous. The metabolism of oleaginous and non-oleaginous yeasts differs mainly due to the action of the enzymes ATP-citrate lyase and malic enzyme (Papanikolaou and Aggelis 2011a). These enzymes function as a key for triggering oil accumulation in conditions of nutritional imbalance. The most extensively studied yeast for lipid production is the "nonconventional" oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*, which is able to accumulate large amounts of lipids, in some cases, more than 50 % of its dry mass (Beopoulos et al. 2009). The non-oleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* is another attractive yeast model for studying the process of neutral lipid (triacylglycerol and steryl ester) synthesis, storage and turnover (Daum et al. 2007), due to its status as a model eukaryote. Knowledge concerning lipid metabolism in *S. cerevisiae* is much advanced, and the main steps in lipid homeostasis are well elucidated for this microorganism (Rajakumari and Grillitsch 2008). Genetic manipulations were even capable of transforming this non-oleaginous yeast into an oleaginous one (Kamisaka et al. 2013). Apart from few other examples of oleaginous yeasts, such as *Rhodospiridium toruloides* (Zhu et al. 2012) and *Rhodotorula glutalis* (Amaretti et al. 2010), there is a scarcity of studies focusing on lipid metabolism in yeasts, especially the non-oleaginous ones.

In an effort to add information concerning the use of yeasts as models for lipid metabolism studies, we are proposing the non-oleaginous yeast *Candida zeylanoides*, a common contaminant of food and beverages that is also occasionally reported as an opportunistic pathogen (Crozier 1993; Khosravi et al. 2013; Lachance et al. 2011; Levenson et al. 1991), as a model. This species belongs to the *Kurtzmaniella* clade (Lachance et al. 2011), and is phylogenetically distant from *S. cerevisiae*, therefore it could be a good non-oleaginous yeast model for comparison with the latter. It is already known that the medium composition and the culture conditions seem to play a major role in lipid accumulation (Braunwald et al. 2013), with fermentation configurations and substrates amenable to manipulation in order to promote the synthesis of specific lipids (Papanikolaou and Aggelis 2010). In the present study we evaluated the influence of the carbon/nitrogen (C/N) imbalance caused by nitrogen deprivation, and the type of nitrogen source upon oil accumulation by this newly proposed model yeast.

Methods

Microorganism and culture media

C. zeylanoides QU 33 was isolated from homemade cheese in Brazil (Landell and Hartfelder 2006). The strain is deposited

at the Collection of Microorganisms, DNA and Cells of Universidade Federal de Minas Gerais (CM-UFMG) under access number UFMG-CM-Y331. The strain was maintained by a monthly subculture on YEPD agar slants containing (g/l) agar (Bacto™ Agar; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 20, glucose (Casa da Química Ind. E Com. Ltda, Diadema, Brazil) 20, yeast extract (Himedia®, Mumbai, India) 5, peptone (Himedia®) 10. Flask culture experiments were performed using a standard medium (pH 6.0) containing the following (g/l): glucose (Casa da Química Ind. E Com. Ltda) 100, (NH₄)₂SO₄ (Cromoline® Química fina Ltda, Diadema, Brazil) 1, KH₂PO₄ (Vetec Química fina Ltda, Rio de Janeiro, Brazil) 1, MgCl₂·6H₂O (Casa da Química Ind. E Com. Ltda) 0.5. Two experiments were performed, one testing different sources of nitrogen and the other with different C/N ratios. In the first experiment, the different nitrogen sources were (NH₄)₂SO₄ [S] (Cromoline® Química fina Ltda), NH₄NO₃ [N] (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, Brazil), peptone [P] (Himedia®), and yeast extract [YE] (Himedia®), all used as the sole nitrogen source with a concentration of 1 g/l. In the second experiment, peptone (Himedia®) was chosen as the sole nitrogen source, and different concentrations were evaluated (10.0, 5.0, 1.0, 0.5, and 0.25 g/l), keeping the C/N ratios 10:1, 20:1, 100:1, 200:1, and 400:1, respectively.

Culture conditions

Flask culture experiments were performed in triplicate in 250-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml broth. All cultures were incubated in a rotary shaker (IKA, KS 4000, IKA®Works Inc., Rio de Janeiro, Brazil) at 150 rpm and 25 °C for 72 h. The pre-inoculum was grown in 125-ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of the standard medium for 40 h. Cell growth was determined by measuring the absorbance at 600 nm (UV-vis spectrophotometer SP2000 UV; Spectrum, Shanghai, China), and confirmed with a Neubauer chamber. The seed culture had a cell concentration of approximately 3.07×10^7 cells/ml, and was inoculated in the different culture media at a 1 % (v/v) ratio.

Measurement of yeast growth and residual glucose over a 3-day cultivation period

The final cell concentration of *C. zeylanoides* QU 33 cells was measured by the A_{600} , and the residual glucose concentration was measured using the Labtest Glucose-GOD kit (Glucose PAP liquiform; Labtest, Lagoa Santa, Brazil) at A_{505} with a spectrophotometer (UV-vis spectrophotometer SP2000 UV; Spectrum, Shanghai, China). Results were calculated as mg glucose per 100 ml of culture medium, according to kit instructions.

Gravimetric determination of biomass

For gravimetric analysis of biomass, 50 ml of the cultures was transferred to 50-ml conical tubes, and centrifuged at 6,000 rpm for 10 min to remove the supernatant. This process was repeated in order to collect the biomass corresponding to 100 ml cultures, followed by washing twice with 15 ml sterile water. Cell pellets were stored overnight at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Indrel[®] CLC300DAF Freeze System, Londrina, Brazil), and freeze-dried (Liotop L 1001; Liobras Indústria Comércio e Serviço de Liofilizadores Ltda, São Carlos, Brazil) at 0.027 mbar, $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. The mass of freeze-dried cell pellets was measured at an analytical balance (Shimadzu AY220; Shimadzu, São Paulo, Brazil), and the dry cells were used for lipid extraction. All experiments were performed in triplicate.

Gravimetric determination of lipid content

Lipids were extracted from the yeast biomass produced under different culture conditions according to Bligh and Dyer (1959). Dry biomass was suspended in chloroform/methanol (2:1, v/v), and cell lysis occurred using a T 18 BASIC ULTRA-TURRAX[®]/IKA homogenizer (IKA[®] do Brasil, São Paulo, Brazil) for 3 min, with ice cooling at each minute to avoid lipid heating. Lysis was followed by filtration through filter paper (MN-615, Macherey-Nagel, Carvalhos Produtos para Laboratório Ltda., Alvorada, Brazil), and the solvents were removed using a rotary evaporator (Laborota 4000eco; Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany) at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Samples were dried at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h to a constant mass, which was measured at an analytical balance (Shimadzu AY220).

Fatty acid analysis

The total lipids were transesterified according to Hartman and Lago (1973), and the fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed using a Gas Chromatography Agilent Technologies,

series 6890 N (Agilent Technologies Brasil Ltda, Tamboré Barueri, Brazil) equipped with a fused-silica capillary column (100 m length and $0.2\text{ }\mu\text{m}$ film thickness) (Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, USA). The column was heated to $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min, with a gradual increase of $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, where it was held for 2 min, followed by a further increase of $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until reaching $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, where it stayed for 2 min, and again increased $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, for 21 min. Total duration of the run was 73.5 min. Nitrogen was used as carrier gas at $0.9\text{ ml}/\text{min}$. The volume of sample injected (split mode, 1:100) was $1\text{ }\mu\text{l}$. The temperature used for the flame ionization detector (FID) was $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fatty acids were quantified and identified by comparison with peak areas and retention times of reference standards (Supelco 37 FAME Mix; Sigma, Bellefonte, PA, USA).

Statistical analysis

In order to evaluate the influence of the culture media (nitrogen sources and C/N ratio), on the lipid accumulation by *C. zeylanoides* QU 33 in flask cultures, an ANOVA analysis was performed and the means of the significantly different main effects were compared at $p < 0.05$ using the Tukey test (GraphPad Prism 5; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results and discussion

The nature and concentration of the nitrogen source in the culture medium are essential factors for the regulation of lipogenesis (Taha et al. 2010). Ikeda et al. (2011) showed that the type of nitrogen source modulated lipogenesis in yeasts, with soy peptides resulting in decreased levels of mRNAs corresponding to neutral lipid synthesis-related genes and repression of the formation of lipid bodies, compared to other nitrogen sources. Nitrogen limitation is considered the most efficient condition for inducing lipogenesis (Amaretti et al.

Table 1 Biomass and lipid production by *Candida zeylanoides* QU 33 using different nitrogen sources at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 150 rpm, cultured for 72 h

N source (0.1 %)	X (g/l)	L (g/l)	L/X % (g/g)	YX/Glc (g/g)	YL/Glc (g/g)
S	1.69 ± 0.19^b	0.09 ± 0.00^b	5.33	0.017 ± 0.009^b	0.0009 ± 0.0000^c
N	1.67 ± 0.19^b	0.17 ± 0.00^b	10.18	0.017 ± 0.008^b	0.0017 ± 0.0005^c
P	2.24 ± 0.05^a	0.35 ± 0.01^a	15.63	0.022 ± 0.001^a	0.0035 ± 0.0010^b
YE	2.39 ± 0.19^a	0.14 ± 0.08^b	5.86	0.023 ± 0.001^a	0.0042 ± 0.0055^c

S (NH_4)₂SO₄, N NH₄NO₃, P peptone, YE yeast extract

X denotes biomass (g/l), L is lipid concentration (g/l), L/X is lipid yield (%), YX is biomass yield on total sugar (X/Glc), YL is lipid yield on total sugar (L/Glc). All values are mean \pm standard deviation of three independent measurements. Means within a column that have no common superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

2010), and it is known that nitrogen limitation can heighten lipid accumulation by oleaginous yeasts when carbohydrates are used as the culture carbon sources (Braunwald et al. 2013; Sarris et al. 2011). Therefore, in the present study, the kind of nitrogen source and C/N ratios due to nitrogen limitation were evaluated as parameters for the induction of lipid accumulation by the non-oleaginous yeast *C. zeylanoides* QU 33.

Cultivation of *C. zeylanoides* QU 33 using different nitrogen sources

C. zeylanoides QU 33 biomass was similar after growth in the nitrogen sources peptone and yeast extract but was higher than the biomass obtained using ammonium nitrate and ammonium sulfate (Table 1, Fig. 1a). The maximum biomass was obtained in yeast extract (2.39 ± 0.19 g/l), followed by peptone (2.24 ± 0.05 g/l), while the higher content of microbial oil (0.35 ± 0.01 g/l) was achieved with peptone as the nitrogen source (Table 1, Fig. 1b). Ammonium nitrate and ammonium sulfate gave both poor biomass and lipid content (Fig. 1b). The best nitrogen sources for biomass and lipid production vary with the microorganism. Zhu et al. (2008), studying the yeast *Trichosporon fermentans* CICC 1368, noted its preference for organic nitrogen sources (peptone and urea) for both biomass and lipid accumulation, while *Lipomyces starkeyi* grown on potato starch wastewater preferred ammonium sulfate (Liu et al. 2013). A mixture of ammonium sulfate and yeast extract was the best nitrogen source for *Y. lipolytica* Z31, a transformant able to use inulin-containing materials for lipid production (Zhao et al. 2010). It is worthwhile to keep in mind that the exact chemical composition of organic sources of nitrogen, such as peptone and yeast extract, is usually unknown, as in our case, so inferences concerning these substrates, including the C/N ratios, should be considered with care.

Residual glucose concentration in the culture media after yeast growth and lipid accumulation was measured in order to evaluate the intracellular availability of the carbon source for lipid production, as it is known that after the depletion of the nitrogen source, excess carbon is diverted to lipid biosynthesis in many oleaginous microorganisms (Papanikolaou and Aggelis 2011a). Figure 1c shows that glucose uptake was not impaired due to the nutritional imbalance of the medium, since residual glucose was less than 0.14 g/l in all media (initial glucose concentration was 100 g/l), indicating that glucose was available for biomass production and oil accumulation. However, the efficiency of carbon source utilization in terms of lipid production was low, since only 0.0035 ± 0.0010 and 0.0042 ± 0.0055 g of lipid were formed per g of glucose with P and YE, respectively (Table 1). The efficiency in terms of biomass yield was also low (0.022 ± 0.001 and 0.023 ± 0.001 g per g of glucose in P and YE, Table 1), suggesting that glucose was not being used for biomass or lipid production, but other primary metabolic products could

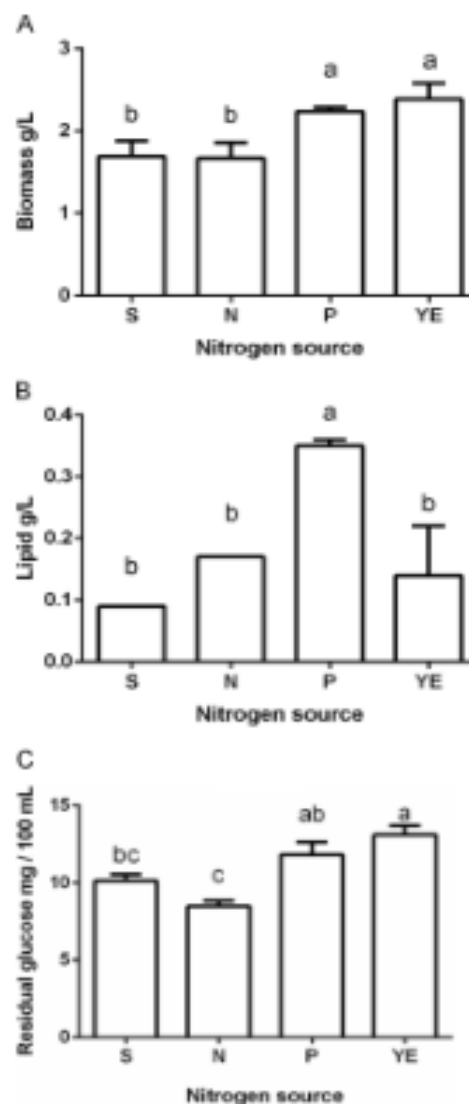


Fig. 1 Cell growth and lipid production by *Candida zeylanoides* QU 33 using four different nitrogen sources. The seed culture contained 100 g/l glucose as carbon source, with C/N ratio 100:1. Cultivation conditions: 25 °C, 150 rpm, cultured for 72 h. S ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), N (NH_4NO_3), P peptone, YE yeast extract. a Biomass concentration (g/l); b lipid concentration (g/l); c residual glucose (mg/100 ml). The values are mean of triplicate experiments with significance set at $p < 0.05$

be being produced. In fact, succinic acid synthesis by *C. zeylanoides* grown in a medium containing ethanol has already been demonstrated (Kamzolova et al. 2009), reinforcing that this species is able to synthesize metabolic products other than triacylglycerol. Yeasts may also accumulate excess carbon as glycogen or trehalose (Nwaka and Holzer 1998; Wilson et al. 2010), which were not measured in our experiments.

Table 2 Fatty acid composition of the total lipid produced by *Candida zeylanoides* QU 33 in different nitrogen sources at 25 °C, 150 rpm, cultured for 72 h. Relative fatty acid content (% wt/wt)

C/N (100:1)	S	N	P	YE
Myristic [14:0]	ND	0.65±0.05 ^a	0.66±0.29 ^a	0.65±0.15 ^a
Pentadecylic [15:0]	ND	0.33±0.09 ^a	ND	ND
Palmitic [16:0]	13.47±0.17 ^a	17.01±1.32 ^b	16.88±2.64 ^a	16.71±0.02 ^a
Palmitoleic [16:1(<i>n</i> -7)]	1.68±0.03 ^{ab}	1.66±0.18 ^{ab}	2.36±0.01 ^a	1.38±0.19 ^b
Margaric [17:0]	0.51±0.07 ^a	0.44±0.14 ^a	0.27±0.38 ^a	0.24±0.02 ^a
Stearic [18:0]	3.92±0.09 ^b	10.21±0.48 ^b	7.66±2.06 ^{ab}	10.00±1.19 ^a
Oleic [18:1(<i>n</i> -9)]	47.44±0.50 ^a	33.01±3.11 ^b	32.23±1.05 ^b	34.11±2.68 ^b
Linoleic [18:2(<i>n</i> -9,12)]	23.85±0.68 ^a	15.79±1.60 ^b	16.25±0.89 ^b	16.95±1.18 ^b
α -linolenic acid [18:3(<i>n</i> -9,12,15)]	2.96±0.18 ^a	2.10±0.19 ^a	2.16±0.32 ^a	2.91±0.30 ^a
Σ Saturated	17.92±0.33 ^b	28.64±2.08 ^b	25.47±4.62 ^a	27.64±0.99 ^a
Σ Monounsaturated	49.94±0.07 ^a	35.73±4.57 ^b	35.66±1.51 ^b	35.66±3.33 ^b
Σ Polyunsaturated	26.81±0.86 ^a	17.89±1.79 ^b	18.40±1.22 ^b	19.86±1.47 ^b

The concentrations of fatty acids are expressed as mean \pm standard deviation of three independent measurements. Values in the same row that have no common superscript letters are significantly different at 5 % levels according to Tukey's multiple range tests. The basal medium was 10.0 % glucose as carbon source and 0.1 % of the nitrogen source at initial pH 6.0, and incubated at 25 °C for 3 days

ND not detected, S (NH₄)₂SO₄, N NH₄NO₃, P peptone, YE yeast extract

The fatty acid composition of the total lipids produced by *C. zeylanoides* QU 33 using different nitrogen sources can be seen in Table 2. Oleic acid [18:1(*n*-9)] was the predominant cellular fatty acid in all culture media (over 32.23 % w/w), followed by linoleic [18:2(*n*-9,12)] and palmitic acids [16:0]. The α -linolenic acid [18:3(*n*-9,12,15)] was found in all culture media at similar concentrations (2.10±0.19 to 2.96±0.18 % wt/wt). Middle chain saturated fatty acids myristic [14:0] and pentadecylic [15:0] acids were detected in low amounts in some media (N, P and YE), but were not detected in medium S. The fatty acid composition in medium S was very different from the composition obtained in the other culture media, with a significantly higher proportion of MUFAs and PUFAs (76.75 % of unsaturated acids opposed to about 50.00 % in the other media) and a lower proportion of saturated fatty acids in relation to the total fatty acids (Table 2). The high

yields of unsaturated fatty acids in medium S are mainly due to a higher proportion of oleic and linoleic acids (47.44 % and 23.85 %, respectively) than in the other media. Although oleic and linoleic acids are the most common unsaturated fatty acids produced by yeasts, these high values are interesting from a biotechnological point of view. For comparison, the fatty acid methyl esters profiles of five marine strains of *Y. lipolytica* grown on glucose and yeast extract were evaluated, with the highest values found for strain NCIM 3589 (38.60 % and 14.60 % of oleic and linoleic acids, respectively), and with no detection of either compound in the oil obtained from most strains (Katre et al. 2012). The oil produced by strain NCIM 3589 was proposed as a potential feedstock for biodiesel production. *Cryptococcus curvatus* produced 42.00 % oleic acid and 18.00 % linoleic acid with glucose and ammonium sulfate as carbon and nitrogen sources, respectively

Table 3 Biomass and lipid production by *Candida zeylanoides* QU 33 using glucose and peptone at different C/N ratios

Ratio C/N	Peptone (g/l)	<i>X</i> (g/l)	<i>L</i> (g/l)	<i>LX</i> % (g/g)	<i>YX</i> /Glc (g/g)	<i>YL</i> /G (g/g)
10:1	10.00	2.59±0.16 ^a	0.20±0.03 ^a	7.72	0.026±0.002 ^a	0.0020±0.0003 ^a
20:1	5.00	2.59±0.07 ^a	0.15±0.00 ^{ab}	5.79	0.026±0.001 ^a	0.0015±0.0000 ^{ab}
100:1	1.00	2.11±0.25 ^{ab}	0.18±0.00 ^{ab}	8.53	0.023±0.001 ^{ab}	0.0018±0.0000 ^{ab}
200:1	0.50	1.90±0.09 ^{bc}	0.21±0.02 ^a	11.05	0.019±0.001 ^{bc}	0.0021±0.0002 ^a
400:1	0.25	1.64±0.03 ^c	0.10±0.00 ^b	6.10	0.016±0.000 ^c	0.0010±0.0000 ^b

Cultures were grown in shake-flask at 25 °C, 150 rpm, for 72 h

All values are mean \pm standard deviation of three independent measurements. Means within a column that have no common superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

X denotes biomass (g/l), *L* is lipid concentration (g/l), *LX* is lipid yield (%), *YX* is biomass yield on total sugar (*X*/Glc), *YL* is lipid yield on total sugar (*L*/Glc)

(Christophe et al. 2012). Using industrial/agricultural wastes, Zhou et al. (2013) found up to 49.90 % of oleic acid and 13.60 % of linoleic acid in the oil produced by *Rh. toruloides* Y2 grown in ethanol wastewater, while *Rhodotorula graminis* produced 42.12 % of oleic acid and 17.15 % of linoleic acid on lignocellulosic hydrolysates (Galafassi et al. 2012). Therefore, the lipid composition of *C. zeylanoides* QU 33 in medium S is biotechnologically relevant, but, unfortunately, biomass and lipid yields were not very promising (Table 1), thus the composition of medium S should be optimized if it is to be used for obtaining unsaturated fatty acids by *C. zeylanoides* QU 33.

Lipid composition may help to infer the best use for the oil produced by a microorganism; for instance, oil suitable for biodiesel purposes should ideally have a high proportion of saturated and monounsaturated fatty acids, while MUFAs and PUFAs are desirable as functional food ingredients (Livingstone et al. 2012; Sitepu et al. 2013; Subramaniam and Dufreche 2010). The oil produced by *C. zeylanoides* QU 33 is suitable for both applications, depending on the culture medium used (Table 2).

Although the lipid yield obtained with *C. zeylanoides* QU 33 is similar to the non-oleaginous model yeast *S. cerevisiae*, the latter primarily produces saturated and monounsaturated fatty acids of 16- and 18-carbon compounds, because it contains only one fatty acid desaturase (Sarris et al. 2013; Uemura 2012). The production of linoleic and α -linolenic acids by *C. zeylanoides* QU 33 suggests it contains more than one desaturase, and makes this yeast suitable as an alternative model for the study of lipogenesis in non-oleaginous organisms, especially in view of the fact that α -linolenic acid is considered an essential fatty acid which is not produced by mammals (Uemura 2012).

Cultivation of *C. zeylanoides* QU 33 at various nitrogen levels in the media

To determine whether nitrogen level had a major impact on lipid accumulation by *C. zeylanoides* QU 33, cells were cultivated in a defined medium supplemented with various amounts of the nitrogen source (0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 g/l). Nitrogen is among the quantitatively important factors in growth medium, and is a limiting nutrient (Papanikolaou and Aggelis 2011b). Despite the lipid composition in medium S was interesting, biomass and lipid yields were very low (Table 1), so peptone was selected for testing the influence of nitrogen limitation using a fixed concentration of glucose (100 g/l). C/N ratios are only tentative due to the unknown chemical composition of the organic nitrogen source, but the same brand of peptone was used in all experiments. This substrate was the best for lipid production by *C. zeylanoides* QU 33 (Fig. 1, Table 1).

Overall, yeast total biomass was high up to the C/N ratio of 100:1, and decreased at higher C/N ratios (Table 3, Fig. 2a, b). Biomass production was found to be the highest (2.59 ± 0.07 g/l) in media with C/N ratio of 10–20:1, but decreased to 1.64 ± 0.03 g/l at the C/N ratio of 400:1 (0.25 g/l peptone). Probably the low amount of peptone acted as a limiting factor for yeast growth at the highest C/N ratios. Decrease of biomass production in media containing higher C/N ratios was also found for a *Candida tropicalis* isolate used for enhanced lipid production (Dey and Maiti 2013). The percentage of lipid accumulated in the dry biomass of strain QU 33 showed

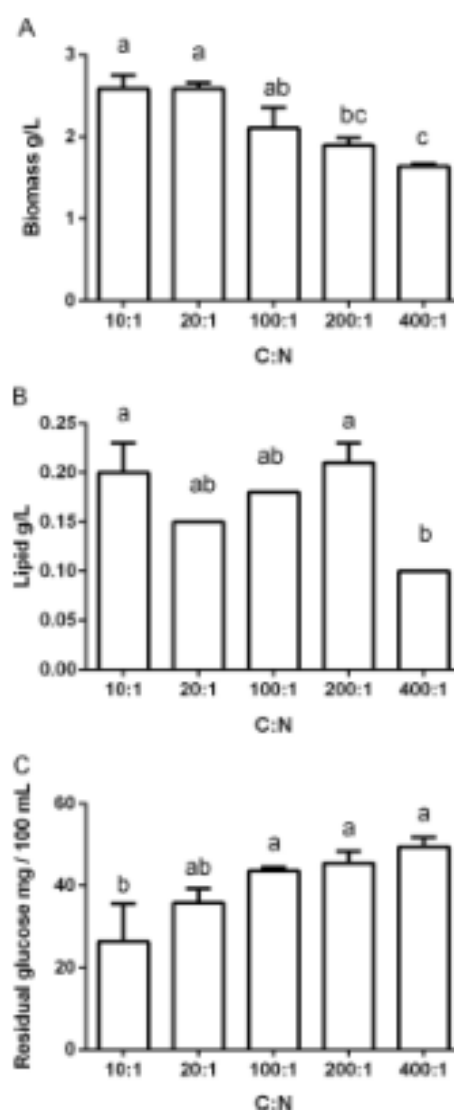


Fig. 2 The effect of C/N (glucose/peptone) ratio on **a** biomass concentration (g/l), **b** lipid concentration (g/l), and **c** residual glucose (mg/100 ml). Cultivation conditions: 25 °C, 150 rpm, 72 h. The values are expressed as mean \pm standard deviation measurements with significance set at $p < 0.05$

slight changes within the whole range of nitrogen concentrations tested (5.79–8.53 %), except at the 200:1 ratio, whose yield was 11.05 % (Table 3, Fig. 2b). Similarly, the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans* had an increase in the lipid content with the increment in the C/N molar ratio up to 140:1, but a further increase in C/N molar ratio to 248:1 resulted in a decrease in the lipid content (Zhu et al. 2008).

It is noteworthy that the highest lipid content of *C. zeylanoides* QU 33 was observed in media with a C/N ratio of 200:1, where biomass production was low. The ideal cultivation condition should induce high lipid content and biomass production at the same time, increasing overall lipid accumulation. In the literature, it is suggested that lipid yields at least higher than 20 % wt/wt are considered as prerequisites for the industrial feasibility of the single cell oil fermentation process (Ageitos et al. 2011). *C. zeylanoides* QU 33 did not achieve this threshold value in the shake flask conditions presently tested, but further optimization of the culture conditions, and scale-up experiments in bioreactors could improve biomass and lipid yields obtained with this yeast.

Although there was a statistically significant increase in the residual glucose with higher C/N ratios (Fig. 2d), we considered it negligible since less than 0.49±2.30 g/l of the initial glucose remained in the medium at the end of the experiments. Therefore, biomass and lipid yields were calculated relative to the initial glucose concentration (100 g/l), and were considered as a measure of the efficiency of biomass and lipid production in terms of carbon source utilization. Both yields were low for all C/N ratios, albeit lower at 400:1 (Table 3). This again may reflect the utilization of the assimilated glucose in metabolic pathways other than biomass and lipid production.

We have not analyzed the lipid composition of the *C. zeylanoides* QU 33 oil obtained from media with different C/N ratios, but Shen et al. (2012) studied the effect of C/N ratios on oil production by the yeast *Rhodospiridium toruloides*, and found that there were no significant differences in lipid composition with changes in the C/N ratios. Although further confirmation would be desirable, we assume the lipid composition of our strain is also not altered with the different C/N ratios.

Conclusion

Although *C. zeylanoides* QU 33 was not able to accumulate lipids in quantities comparable to oleaginous yeasts, it produced significantly higher amounts of lipids with peptone as nitrogen source than in the other media tested. A future comparison of the transcriptional response of the non-oleaginous *C. zeylanoides* QU 33 with that of oleaginous yeasts and other non-oleaginous model yeasts, such as

S. cerevisiae, would be desirable to understand the physiology of fat accumulation in yeasts in order to apply these microorganisms as more efficient models for the study of lipid metabolism.

Acknowledgments The authors are grateful to CAPES and FAPERGS (process 11/2047-0) for the financial support.

References

- Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-crespo P, Villa TG (2011) Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1219–1227. doi:10.1007/s00253-011-3200-z
- Amareti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, Lucia MD, Leonardi A, Rossi M (2010) Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* DBVPG 4785. *Microb Cell Factories* 9:7–12. doi:10.1186/1475-2859-9-73
- Beopoulos A, Chardot T, Nicaud JM (2009) *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie* 91:692–696. doi:10.1016/j.biochi.2009.02.004
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917
- Braunwald T, Schwemmler L, Graeff-bönninger S, French WT, Hernandez R, Holmes WE (2013) Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:6581–6588. doi:10.1007/s00253-013-5005-8
- Christophe G, Deo JL, Kumar V, Nouaille R, Fontanille P, Larroche C (2012) Production of oils from acetic acid by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Appl Biochem Biotechnol* 167:1270–1279. doi:10.1007/s12010-011-9507-5
- Crozier WJ (1993) Two cases of onychomycosis due to *Candida zeylanoides*. *Aust J Dermatol* 34:23–25
- Daum G, Wagner A, Czabany T, Athenstaedt K (2007) Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. *Biochimie* 89:243–248. doi:10.1016/j.biochi.2006.06.018
- Dey P, Maiti MK (2013) Molecular characterization of a novel isolate of *Candida tropicalis* for enhanced lipid production. *J Appl Microbiol* 114:1357–1368. doi:10.1111/jam.12133
- Galafassi S, Cucchetti D, Pizzo F, Franzosi G, Bianchi D, Compagno C (2012) Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol* 111:398–403. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.004
- Harman L, Lago RC (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract* 22:475–476
- Hebert JR, Allison DB, Archer E, Lavie CJ, Blair SN (2013) The obesity pandemic. *Mayo Clin Proc* 88:593–604. doi:10.1016/j.mayocp.2013.04.005
- Ikeda K, Kitagawa S, Tada T (2011) Modification of yeast characteristics by soy peptides: cultivation with soy peptides represses the formation of lipid bodies. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1971–1977. doi:10.1007/s00253-010-3001-9
- Kamisaka Y, Kimura K, Uemura H (2013) Overexpression of the active diacylglycerol acyltransferase variant transforms *Saccharomyces cerevisiae* into an oleaginous yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:7345–7355. doi:10.1007/s00253-013-4915-9
- Kamzolova SV, Yusupova AI, Dedyukhina EG, Chistyakova TI, Kozyreva TM, Morgunov IG (2009) Succinic acid synthesis by ethanol-grown yeasts. *Food Technol Biotechnol* 47:144–152
- Katre G, Joshi C, Khot M, Zinjarde S, Ravikumar A (2012) Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia*

- lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel. *AMB Express* 2:36–50
- Khosravi AR, Shokri H, Nikaein D, Rfanmanesh A, Fatahnia M, Ashrafiflank J (2013) Evaluation of the pathogenicity of *Candida zeylanoides* in BALB/c mice. *Turk J Vet Anim Sci* 37:408–413. doi:10.3906/vet-1105-40
- Kurat CF, Natter K, Petschnigg J, Wolinski H, Scheuringer K, Zimmermann R, Scholz H, Leber R, Zechner R, Kohlwein SD (2006) Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. *J Biol Chem* 281:491–500. doi:10.1074/jbc.M508414200
- Lachance MA, Boekhout T, Scorzetti G, Fell JW, Kurtzman CP (2011) *Candida* Boekhout (1923). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds) *The yeasts, a taxonomic study*, 5th edn. vol. 2, Elsevier, pp 987–1278
- Landell MF, Hartfelder C (2006) Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Acta Sci Vet* 34:49–55
- Levenson D, Pfaller MA, Smith MA, Hollis R, Gerarden T, Tucci CB, Isenberg HD (1991) *Candida zeylanoides*: another opportunistic yeast. *J Clin Microbiol* 29:1689–1692
- Liu JX, Yue QY, Gao BY, Wang Y, Li Q, Zhang PD (2013) Research on microbial lipid production from potato starch wastewater as culture medium by *Lipomyces starkeyi*. *Water Sci Technol* 67:1802–1808. doi:10.2166/wst.2013.059
- Livingstone KM, Lovegrove J, Givens DI (2012) The impact of substituting SFA in dairy products with MUFA or PUFA on CVD risk: evidence from human intervention studies. *Nutr Res Rev* 25:193–206. doi:10.1017/S095442241200011X
- Nwaka S, Holzer H (1998) Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 58:197–237
- Papanikolaou S, Aggelis G (2010) *Yarrowia lipolytica*: a model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 112:639–654. doi:10.1002/ejlt.200900197
- Papanikolaou S, Aggelis G (2011a) Lipids of oleaginous yeasts: part I. Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol* 113:1031–1051. doi:10.1002/ejlt.201100014
- Papanikolaou S, Aggelis G (2011b) Lipids of oleaginous yeasts: part II. Technology and potential applications. *Eur J Lipid Sci Technol* 113:1052–1073. doi:10.1002/ejlt.201100015
- Rajakumari S, Grillitsch K (2008) Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Prog Lipid Res* 47:157–171. doi:10.1016/j.plipres.2008.01.001
- Sarris D, Galiotou-Panayotou M, Koutinas AA, Komaitis M, Papanikolaou S (2011) Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J Chem Technol Biotechnol* 86:1439–1448. doi:10.1002/jctb.2658
- Sarris D, Giannakis M, Philippoussis A, Komaitis M, Koutinas AA, Papanikolaou S (2013) Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses. *J Chem Technol Biotechnol* 88:958–969. doi:10.1002/jctb.3931
- Shen H, Jin G, Hu C, Gong Z, Bai F, Zhao ZK (2012) Effects of dilution rate and carbon-to-nitrogen ratio on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* under chemostat conditions. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 28:56–64
- Sineta IR, Sestic R, Ignatia L, Levin D, German JB, Gillies LA, Almada LAG, Boundy-Mills KL (2013) Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresour Technol* 144:360–369. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.047
- Subramaniam R, Duffeche S (2010) Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:1271–1287. doi:10.1007/s10295-010-0884-5
- Taha EM, Omar O, Molnar W, Yusoff W, Hamid AA (2010) Lipid biosynthesis in *Cunninghamella bairdii* 2A1 in N-limited and N-excess media. *Ann Microbiol* 60:615–622. doi:10.1007/s13213-010-0096-2
- Tai M, Stephanopoulos G (2013) Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab Eng* 15:1–9. doi:10.1016/j.ymben.2012.08.007
- Uemura H (2012) Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 95:1–12. doi:10.1007/s00253-012-4105-1
- Walther TC, Farese R (2009) The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 1791:459–466. doi:10.1016/j.bbali.2008.10.009
- Wilson WA, Roach PJ, Montero M, Baroja-Fernández E, Muñoz J, Eydollin G, Viale AM, Pozueta-Romero J (2010) Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34:952–985. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00220.x
- Zhao C-H, Cui W, Liu X-Y, Chi Z-M, Madzak C (2010) Expression of inulinase gene in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* and single cell oil production from inulin-containing materials. *Metab Eng* 12:510–517. doi:10.1016/j.ymben.2010.09.001
- Zhou W, Wang W, Li Y, Zhang Y (2013) Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y2 in bioethanol wastewater and evaluation of biomass energetic yield. *Bioresour Technol* 127:435–440. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.067
- Zhu LY, Zong MH, Wu H (2008) Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresour Technol* 99:7881–7885. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.033
- Zhu Z, Zhang S, Liu H, Shen H, Lin X, Yang F, Zhou Y, Jin G, Ye M, Zou H, Zhao ZK (2012) A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nat Commun* 3:1111–1112. doi:10.1038/ncomms2112

II. Influência do sulfato de amônio na síntese de lipídeo pela levedura *Candida zeylanoides* QU33 usando a metodologia de superfície de resposta.

Rosa, P. D., Mattanna, P., Leite, B., & Valente, P. (2014). A ser submetido à Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre.

Influência do sulfato de amônio na síntese de lipídeo pela levedura *Candida zeylanoides* QU33 usando a metodologia de superfície de resposta.

Priscila Dallé da Rosa¹; Paula Mattanna²; Belize Leite¹; Patricia Valente^{1*}.

Título resumido: Síntese de lipídeos pela levedura *Candida zeylanoides* QU33

1. PPGMAA - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor para contato: Dr.(a) Patrícia Valente, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite, 500, sala 154, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil, Telefone: +55-51-33084196, Fax: +55-51-33083445, E-mail: patricia.valente@ufrgs.br

RESUMO: Óleo microbiano pode ser considerado uma fonte de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poliinsaturados (PUFAs). Em trabalhos prévios, foi demonstrado que a levedura *Candida zeylanoides* QU 33 produziu uma grande quantidade de MUFAs e PUFAs em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio. O presente trabalho objetivou determinar os melhores parâmetros para o acúmulo de lipídeos pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33, sabendo-se que a razão carbono nitrogênio (C:N) nos meios de cultivo, assim como o pH e a temperatura de incubação são os parâmetros que mais influenciam a produção de lipídios microbianos. Para a otimização, foi aplicada a Metodologia de Superfície de Resposta, aplicando os níveis das variáveis temperatura (20 a 28°C), pH (6,0 a 8,0) e concentração de glicose (8 a 20% p/v). Apesar de nenhuma das variáveis ter tido influência significativa, houve tendência a um maior acúmulo de lipídeos em altas concentrações do açúcar (acima de 16%), temperaturas medianas (23-26°C) e pH neutro.

Palavras-chave: Sulfato de amônio, óleo microbiano, planejamento do composto central.

ABSTRACT: Microbial oil can be considered a source of monounsaturated (MUFAs) and polyunsaturated (PUFAs) fatty acids. Previously, it was demonstrated that the yeast *Candida zeylanoides* QU 33 produced great amounts of MUFAs and PUFAs in culture media containing glucose as carbon source and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as nitrogen source. This study aimed to determine the best parameters for the accumulation of lipids by the yeast *Candida zeylanoides* QU 33, knowing that the carbon nitrogen (C:N) ratio in the culture media, as well as pH and temperature are the parameters that mainly affect the production of microbial lipids. For optimization, the Response Surface Methodology was applied, using the levels of the variables temperature (20-28°C), pH (6.0 to 8.0), and glucose concentration (08-20% p/v). Although any of the variables had a significant influence, there was a tendency of lipid accumulation in high sugar concentrations (over 16%), mild temperatures (23-26°C) and neutral pH.

Key words: ammonium sulfate, microbial oil, central composite design.

INTRODUÇÃO

O efeito benéfico dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs) encontrados no azeite de oliva, óleo de soja, canola, entre outros, é a contribuição para a diminuição do risco de doenças cardiovasculares. Uma dieta rica em MUFAs (ácido oleico, por exemplo) conduz a uma redução da glicose e da pressão arterial e aumenta os níveis do colesterol HDL (Gillingham *et al.*, 2011). Os ácidos graxos ômega-3 (PUFAs) podem proteger contra várias doenças, como cardiovasculares, psiquiátricas, neurológicas, dermatológicas e reumatológicas (Assy *et al.*, 2009). Atualmente, os organismos marinhos (peixes, frutos do mar e algas) são considerados uma importante fonte de PUFAs, mas possuem o inconveniente de poderem conter vários contaminantes ambientais, como metais pesados (mercúrio, especialmente, e cádmio), pesticidas e outras substâncias perigosas a que estão expostas na água do mar (Stroescu *et al.*, 2013).

As leveduras são microrganismos tradicionalmente utilizados em processos fermentativos. Algumas espécies, como *Lipomyces starkeyi*, acumulam até aproximadamente 70% do peso seco em lipídeos (Angerbauer *et al.*, 2008). O alto teor de lipídeos produzidos, aliado à grande produtividade em biomassa, torna as leveduras excelentes candidatas para a produção de óleo microbiano para diversas finalidades (Poli *et al.*, 2013, Mattana, *et al.*, 2014) tais como surfactantes naturais, nutracêuticos, biocombustíveis, insumos na indústria de alimentos e de cosméticos de modo geral (Vasudevan & Briggs,

2008). Dessa forma, estudos estão focados na maximização da produção do óleo por esses microrganismos (Tai & Stephanopoulos, 2013).

De cerca de 600 espécies de leveduras, apenas 5 % foram relatadas como capazes de acumular mais do que 25% da sua biomassa seca como lipídeos (Dey & Maiti, 2013). Entre elas, a mais extensivamente estudada é a levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica*, que é capaz de acumular grandes quantidades de lipídeos (em alguns casos, mais de 50% do seu peso seco) (Beopoulos *et al.*, 2009). A síntese de lipídeos também tem sido estudada em outras leveduras oleaginosas, como *Rhodospiridium toruloides* (Zhu *et al.* 2012) e *Rhodotorula glacialis* (Amaretti *et al.* 2010), além da levedura não oleaginosa *Saccharomyces cerevisiae* (Daum *et al.*, 2007). Porém a expansão do número de espécies estudadas é necessária para que haja um melhor conhecimento do metabolismo associado à síntese de lipídeos em leveduras.

Apesar da espécie *Candida zeylanoides* não ser reportada na literatura como oleaginosa, em trabalhos prévios foi observado que a cepa QU33 produziu uma grande quantidade de ácidos graxos monoinsaturados de 27% e poliinsaturados 50%, em meio de cultura contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono, produzindo principalmente os ácidos Oléico e Linoléico com essa fonte de nitrogênio (Rosa *et al.*, 2014). Podendo ser uma fonte alternativa de obtenção de ácidos graxos essenciais para formulações da Indústria farmacêutica quanto na alimentícia. Entre as vantagens do uso de leveduras para obtenção de óleo microbiano está o fato de que elas são facilmente cultivadas em biorreatores e de serem

microrganismos geralmente reconhecidos como seguros para fins alimentícios. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi otimizar a produção de lipídeo pela levedura *C. zeylanoides* QU33, utilizando glicose como fonte de carbono e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio. Para tanto, foi aplicada a Metodologia de Superfície de Resposta em um planejamento fatorial completo com três variáveis independentes.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A levedura *C. zeylanoides* QU33 (UFMG-CM-Y331), utilizada no presente trabalho, foi isolada de queijo colonial da região litorânea do estado do Rio Grande do Sul (Landell *et al.*, 2006). A cepa foi mantida em tubos com agar GYP (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, agar 2%).

2.2 Pré-inóculo

Para obtenção de biomassa metabolicamente ativa, as leveduras foram cultivadas em placas de agar GYP, com incubação por 24h a 25°C. A partir deste cultivo, as células foram inoculadas em 50 mL de meio A (10% Glicose, 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p/v), em Erlenmeyers de 125 mL. Esse pré-inóculo foi incubado a 25 °C e 150 rpm por 40h e o crescimento celular foi avaliado por meio da absorbância a 600nm.

2.3 *Condições de Cultura*

O experimento foi conduzido em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de meio S (Glicose conforme a tabela 1, 0,05% (NH₄)₂SO₄, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% MgCl₂.6H₂O p/v). Neste meio de cultura foi adicionado 10% do pré-inóculo, que foi incubado em agitador horizontal (IKA, KS 4000) a 25°C e 150 rpm durante 120 horas.

2.4 *Metodologia de Superfície de Resposta*

Para identificar as condições ideais para o acúmulo de lipídeo na levedura QU33 em meio S, foi aplicado o desenho matemático de análise de superfície de resposta com planejamento fatorial 2³. Esta construção foi usada para examinar o relacionamento entre as variáveis de resposta e os parâmetros quantitativos experimentais (variáveis independentes). Os fatores avaliados foram diferentes condições de temperatura (20 a 28°C), pH (6,0 a 8,0) e concentração de glicose (8 a 20% p/v), enquanto as variáveis de resposta foram produção de biomassa (item 2.5) e conteúdo de lipídios (item 2.6). Os experimentos foram projetados usando o Programa STATISTICA Trial version 7.0, sendo que cada variável foi testada em cinco níveis diferentes codificados: - α (1,68), baixo (1), médio (0), e alta (1), + α (1,68) (Tabela 1). Foram realizados 17 experimentos (Tabela 2), com cinco repetições no ponto central. Para predição do ponto ótimo, um modelo de segunda ordem foi ajustado para correlacionar as variáveis independentes e as respostas (Equação 1):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j}^{3-1} \sum_{j>i}^3 \beta_{ij} x_i x_j$$

Onde Y é a resposta predita, β_0 é o intercepto, e β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes linear, quadrático e de interação, respectivamente. x_i e x_j representam as variáveis independentes.

A significância estatística do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher (teste F). A qualidade da equação do modelo gerado foi avaliada estatisticamente pelo coeficiente R^2 . A equação polinomial ajustada foi então expressa na forma de gráficos de contorno tridimensionais, para ilustrar a relação entre as respostas e os níveis experimentais de cada variável independente.

2.5 Determinações da biomassa

Para a análise gravimétrica, 100 ml de culturas foi transferida para um tubo cônico com capacidade de 50 ml, centrifugado a 6.000 rpm durante 5 minutos para remover o sobrenadante, em seguida foi realizada a lavagem com 15 ml de água estéril, repetindo o processo por duas vezes. As amostras de biomassa foram armazenadas durante 24 h a -30°C no freezer Indrel® CLC300DAF, e liofilizadas no Liotop L 1001 - 48°C durante 24 h. Os sedimentos de células liofilizadas foram usados para análise gravimétrica.

2.6 Extração de lipídeo

Os lipídeos foram extraídos a partir da biomassa liofilizada das leveduras de acordo com Bligh & Dyer (1959). A biomassa foi ressuspensa em clorofórmio/metanol (2:1, v/v), e a lise celular foi obtida com auxílio do homogeneizador T 18 BASIC ULTRA- TURRAX® / IKA por 3 min, com intervalos a cada minuto para refrigeração em gelo de forma a evitar o aquecimento dos lipídeos. A lise foi seguida por filtração em papel filtro (MN - 615, Macherey - Nagel) e os solventes foram removidos utilizando um Rotaevaporador (Laborota 4000eco, Heidolph) a 60 ° C. As amostras foram secas a 60°C por 24h até peso constante e pesadas em balança analítica Shimadzu AY220.

2.7 Determinação da fluorescência por Vermelho de Nilo

Foi preparada uma suspensão de 10 µl células em lâmina de microscopia, que foi corada com a mesma quantidade de vermelho de Nilo 0,1%, sendo a fluorescência avaliada em microscópio de fluorescência (Olympus BX41), usando lentes com comprimentos de onda que variam entre 450-500nm (Poli et al., 2013). Os lipídios foram observados como gotículas de coloração amarelo-ouro (douradas) no interior das células leveduriformes.

2.8 Dosagens da glicose residual

A concentração de glicose residual foi medida utilizando o kit Labtest Glicose-GOD em OD505 com um espectrofotômetro (UV-VIS UV SP2000, Spectrum). Foi realizada uma curva de calibração com diferentes quantidades de glicose para avaliar a especificidade do kit.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores com a levedura *C. zeylanoides* QU33, foi observado que havia produção de lipídeos com alto teor de ácidos graxos insaturados em meio contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio (meio S), predominando os ácidos oléico (18:1) e linoléico (18:2) (Rosa et al., 2014). Infelizmente, o rendimento de biomassa e de lipídeos não foi adequado. No presente trabalho, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para otimizar as condições de cultivo (temperatura), composição do meio de cultura (razão C:N, decorrente de alteração na concentração de glicose utilizada) e pH com o objetivo de melhorar o rendimento de biomassa e lipídeos produzidos por esta levedura. Estes parâmetros foram selecionados porque são reportados como bastante influentes para a produção de lipídeos (e.g. Sitepo *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2011).

3.1 Metodologia de Superfície de Resposta

A Tabela 2 apresenta a matriz do desenho experimental com as respostas observadas e previstas para os lipídeos, os valores observados para biomassa, além dos rendimentos de biomassa e de lipídeo em relação ao substrato (glicose) disponibilizado. As produções máximas de biomassa e de lipídeo pela levedura *C. zeylanoides* QU33 obtidas experimentalmente foram 4,02 g/L (experimento 9) e 0,16 g/L (experimento 8), respectivamente. Tivemos uma variação na produção de biomassa de 2,53 g/L a 4,02 g/L, enquanto a quantidade de lipídeo variou de 0,02 g/L a 0,16 g/L entre os experimentos; esses valores equivalem a um incremento de aproximadamente de 60% na produção de biomassa e 700% na produção de lipídeos. As condições do experimento 8 (26,4°C, pH 7,6 e 16,5% de glicose) foram as melhores observadas para acúmulo de lipídeos, apresentando um valor residual de 0,015 g/L de lipídeos em relação ao valor previsto com a metodologia de superfície de resposta. Os pontos centrais, que são uma triplicata, tiveram uma pequena diferença dos seus valores residuais, sendo mínima a diferença do valor experimental em relação ao teórico do planejamento, confirmando que os valores obtidos são confiáveis (Tabela 2).

Neste trabalho tivemos um aumento de aproximadamente 140% no crescimento de biomassa e um aumento de 78 % de lipídeo em relação ao primeiro trabalho com esta levedura *C. zeylanoides* (Rosa *et al.*, 2014) utilizando essas fontes de C e de N. Obtendo maior produção de biomassa em menores temperaturas e com concentrações mais altas de glicose, sendo que

a temperatura ótima para produção de biomassa foi a 20°C, enquanto de lipídeo foi de 26,4°C com uma concentração de glicose de 16,5%.

Os efeitos dos parâmetros testados (temperatura, pH e concentração de glicose) na produção de biomassa e de lipídeos podem ser vistos nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Nestas tabelas estão demonstrados os efeitos lineares, quadráticos e da interação entre os fatores, segundo a equação 1, além da significância estatística de cada efeito. Como nenhum dos efeitos apresentou $p < 0,05$, pode-se concluir que, apesar de termos tido acréscimo na quantidade de biomassa e de lipídeos em alguns dos experimentos, nenhum dos parâmetros avaliados apresentou efeito significativo ao nível de significância de 95%, tanto isoladamente quanto nas interações entre os parâmetros.

Apesar dos efeitos testados não terem sido significativos, foram gerados gráficos de contorno para avaliar as condições de cultivo que pudessem favorecer a produção de lipídeos pela levedura *C. zeylanoides* QU33 (Figuras 1 A, B e C). Quando a interação das variáveis pH e temperatura foi avaliada, houve resposta de produção de lipídeos (g/L) em uma ampla faixa dos parâmetros, indicando que os valores de pH e temperaturas testados foram adequados e que diferentes combinações entre estes parâmetros podem ser utilizadas para o cultivo de *C. zeylanoides* QU33 com a finalidade de obtenção de óleo (Fig. 1A). Quando as interações entre a variável concentração de glicose com o pH (Fig. 1B) e com a temperatura (Fig. 1C) foram avaliadas, houve tendência a um maior acúmulo de lipídeos em altas

concentrações do açúcar (acima de 16%), temperaturas medianas (23-26°C) e pH neutro. Esse resultado está de acordo com a literatura, que relata que um dos fatores mais importantes para produção de lipídeos por leveduras é a razão C:N (Sitepo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011), que é determinada pela concentração das fontes de carbono e de nitrogênio no meio de cultura. Na condição experimental ótima avaliada no presente estudo (experimento 8), por exemplo, a razão C:N foi de 330:1 com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio. Em um estudo anterior usando peptona como fonte de nitrogênio, a razão C:N que resultou no maior acúmulo de lipídeos pela *C. zeylanoides* QU33 foi 200:1 (Rosa *et al.*, 2014), demonstrando que a razão C:N ideal é dependente do tipo de fonte de nitrogênio utilizada.

3.2 Resposta do acúmulo de lipídeo pelo Vermelho de Nilo

Uma suspensão das células da levedura *C. zeylanoides* QU33 cultivada em uma condição indutora de acúmulo de lipídeo foi visualizada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo (Fig. 2 A). Pode-se observar a fluorescência amarelo-ouro, correspondente aos lipídeos neutros, preenchendo a totalidade do interior da célula da levedura. Ao contrário, lâminas preparadas com uma suspensão de células da levedura cultivada em condições não indutoras confirmam a pouca quantidade de lipídeos neutros no interior das células (Fig. 2 B). Diversos autores têm demonstrado a aplicação do corante vermelho de Nilo para a seleção rápida de leveduras oleaginosas, inclusive propondo metodologias ambientalmente

corretas com esta finalidade (Beopoulos *et al.* , 2008; Poli *et al.*, 2013; Poli *et al.*, 2014). No presente trabalho, a coloração com vermelho de Nilo confirmou visualmente que o planejamento experimental realizado foi capaz de evidenciar as condições indutoras e não indutoras para acúmulo de lipídeos.

CONCLUSÕES

A metodologia de superfície de resposta permitiu o desenvolvimento de um modelo polinomial de segunda ordem empírico para a previsão da produção de biomassa e do conteúdo lipídico celular pela levedura *Candida zeylanoides* QU33 cultivada em glicose como fonte de carbono e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio. Foi possível identificar a condição ótima para a obtenção máxima de biomassa e de lipídeos. No experimento com a temperatura, o pH e a concentração de glicose ideais, foi obtido até 0,16 g/L de lipídeo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem CAPES e FAPERGS (processo 11/2047-0) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AMARETTI A., RAIMOND S., SALA, M., RONCAGLIA L., LEONARDI A., & ROSSI, M. 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microb Cell Fact*, 9:73–78.

ANGERBAUER, C., SIEBENHOFER, M., MITTELBACH, M., & GUEBITZ, G. M. 2008. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.*,99: 3051–6.

ASSY, N., NASSAR, F., NASSER, G., & GROSOVSKI, M. 2009. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 15: 1809–1815.

BEOPOULOS, A., CHARDOT, T., & NICAUD, J.M. 2009. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91: 692–6.

BLIGH, E.G. & DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911–917.

DAUM, G., WAGNER, A., CZABANY, T., & ATHENSTAEDT, K. 2007. Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. *Biochimie* 89: 243–248.

DEY, P., & MAITI, M. K. 2013. Molecular characterization of a novel isolate of *Candida tropicalis* for enhanced lipid production. *J. Appl. Microbiol.* 1–12.

LANDELL, M.F., HARTFELDER, C. & VALENTE, P. 2006. Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Acta Sci. Vet.*, 34: 49-55.

GILLINGHAM, L. G., GUSTAFSON, J. A., HAN, S., JASSAL, D. S., & JONES, P. J. H. 2011. High-oleic rapeseed (canola) and flaxseed oils modulate serum lipids and inflammatory biomarkers in hypercholesterolaemic subjects. *British J. Nutrition*, 1: 417–427.

IKEDAK, KITAGAWA S, TADA T (2011) Modification of yeast characteristics by soy peptides: cultivation with soy peptides represses the formation of lipid bodies. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89:1971–1977.

MATANNA P., ROSA, P.D., POLI, J. S., RICHARDS, N. S. P. S., DABOIT, T. C., SCROFERNEKER, M. L., PASTORE, A. P. W., CORCAO, G., BERTOLDI, F. C., DESCHAMPS, F. C., & VALENTE, P. 2014. Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. *R. bras. Bioci.*, 12: 121-126.

POLI, J.S., DALLÉ, P., SENTER, L. MENDES, S. RAMIREZ, M., VAINSTEIN, M.H. & VALENTE, P. 2013. Fatty acid methyl esters produced by

oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *R. bras. Bioci.*, 11: 203–208.

POLI, J.S., LÜTZHOFT, H.H., KARAKASHEV, D.B., VALENTE, P. & ANGELIDAKI, I. 2014. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Bioresour. Technol.*,51: 388–391.

ROSA, P. D., MATTANNA, P., CARBONI, D. S., AMORIM, L., RICHARDS, N., & VALENTE, P. 2014. *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia Microbiol.*, 59. doi:10.1007/s12223-014-0325-3

SITEPU, I.R., SESTRIC, R., IGNATIA, L., LEVIN, D., GERMAN, B., GILLIES, L.A., ALMADA L., & BOUNDY-MILLS K. 2013. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresour. Technol.* 144: 360–369 .

STROESCU, M., STOICA-GUZUN, A., GHERGU, S., CHIRA, N., & JIPA, I. 2013. Optimization of fatty acids extraction from *Portulaca oleracea* seed using response surface methodology. *Ind Crops Prod.*, 43: 405–411.

TAI, M. & STEPHANOPOULOS, G. 2013. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab. Eng.*, 15:1–9.

VASUDEVAN, P. T., & BRIGGS, M. 2008. Biodiesel production--current state of the art and challenges. *J. ind.Microbiol. Biotechnol.*, 35: 421–30.

ZHANG J., FANG X., ZHU X., LI Y., XU H., ZHAO B., CHEN L., & ZHANG X. 2011. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass Bioenerg.* 35: 1906–1911.

ZHU, Z., ZHANG,S., LIU, H., SHEN, H., LIN, X., YANG, F., ZHOU, Y., JIN, G., YE, M., ZOU, H. & ZONGBAO K. ZHAO. 2012. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospordium toruloides*. *Nat Commun.* 3:1112–1122.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

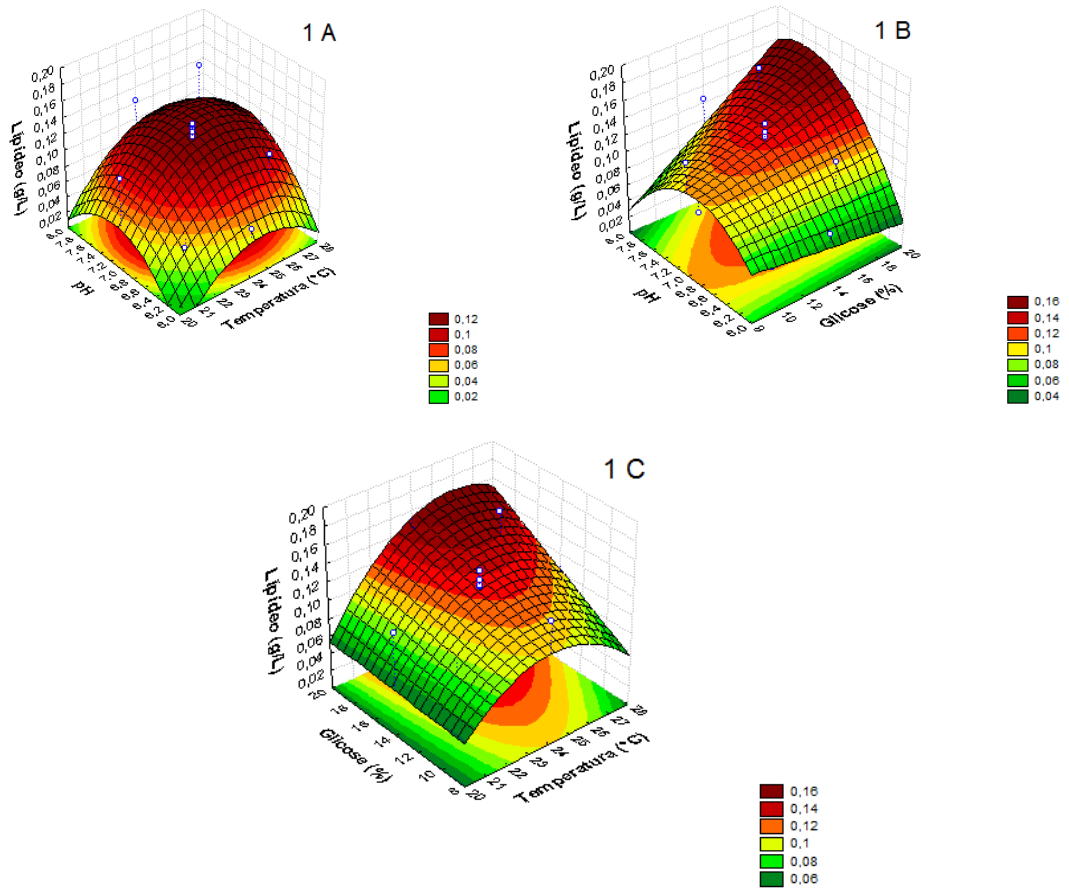


Figura 1: Efeito na produção de óleo microbiano pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33 cultivada em meio S por 120 h e 150rpm: Acúmulo de óleo microbiano com os fatores (A) temperatura x pH, (B) pH x glicose, (C) temperatura x glicose

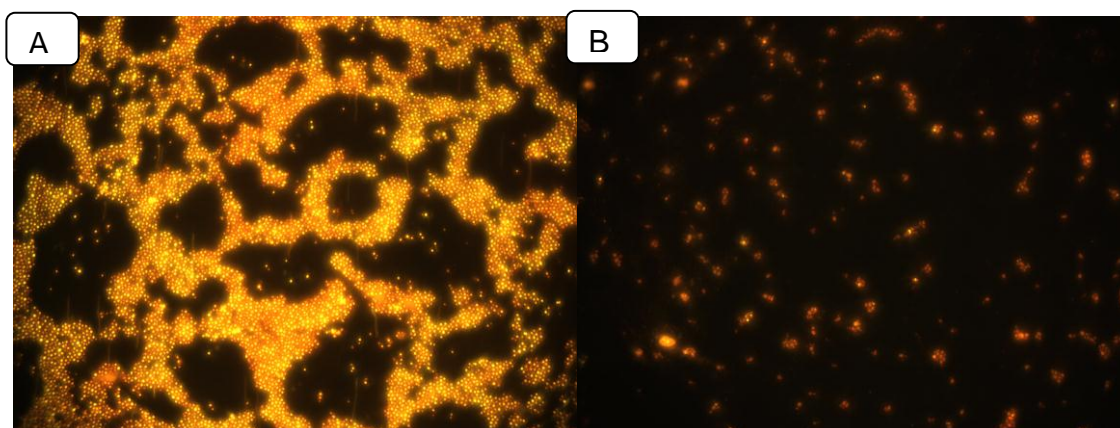


Figura 2: Coloração das células da levedura *Candida zeylanoides* QU 33 com o Fluorocromo Vermelho de Nilo: (A) Experimento realizado com temperatura de 21,6°C, pH 7,6 e 16,5% de glicose, figura da esquerda. (B) Experimento realizado com temperatura de 28 °C, pH 7 e 14 % de glicose, figura da direita.

Tabela 1: Valores reais e codificados das variáveis independentes e seus diferentes níveis utilizados para a otimização da produção de óleo microbiano pela levedura *Candida zeylanoides* QU33.

Variáveis	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	X1	20	21,6	24	26,4	28
pH	X2	6	6,4	7	7,6	8
Glicose (%)	X3	8	11,6	14	16,5	20

Tabela 2: Matriz do desenho experimental com as respostas observadas e previstas para biomassa e lipídeos, rendimento de biomassa e rendimento de lipídeo.

Exp.	T (°C)	pH	Glicose %	X (Obs.)	L (Obs.)	L (predito)	L (Residual)	L/X	Y X/Glc	Y L/Glc
1	-1	-1	-1	2,97	0,02	0,07	-0,05	0,01	0,03	0,0001
2	1	-1	-1	3,05	0,07	0,08	-0,01	0,02	0,03	0,0006
3	-1	1	-1	3,23	0,02	0,07	-0,05	0,01	0,03	0,0002
4	1	1	-1	3,28	0,08	0,10	-0,02	0,02	0,03	0,0007
5	-1	-1	1	3,40	0,04	0,06	-0,01	0,01	0,02	0,0003
6	1	-1	1	3,05	0,11	0,09	0,02	0,04	0,02	0,0007
7	-1	1	1	3,45	0,08	0,10	-0,02	0,02	0,02	0,0005
8	1	1	1	3,68	0,16	0,15	0,02	0,04	0,02	0,0010
9	-1,68	0	0	4,02	0,11	0,05	0,06	0,03	0,03	0,0008
10	1,68	0	0	2,67	0,09	0,10	-0,02	0,03	0,02	0,0006
11	0	-1,68	0	2,53	0,06	0,04	0,02	0,02	0,02	0,0004
12	0	1,68	0	2,99	0,12	0,09	0,03	0,04	0,04	0,0015
13	0	0	-1,68	3,00	0,14	0,14	0,00	0,05	0,02	0,0007
14	0	0	1,68	3,93	0,14	0,14	0,00	0,04	0,03	0,0010
15	0	0	0	3,25	0,14	0,14	0,00	0,04	0,02	0,0010
16	0	0	0	3,05	0,13	0,13	0,00	0,04	0,02	0,0009
17	0	0	0	3,23	0,13	0,13	0,00	0,04	0,02	0,0009

X = Biomassa (g/L), L = Quantidade de lipídeos (g/L), L/X = Lipídeo/Biomassa (g/g), YX = Rendimento de biomassa a partir de glicose (X/Glc), YL = Rendimento de lipídeo a partir de glicose (L/Glc).

Tabela 3: Dados experimentais para a produção de biomassa e valores reais para as variáveis independentes utilizados para o planejamento fatorial completo.

Fator	SS ^a	df ^b	MSS ^c	F	p ^d
X1: Temperatura linear	0,37	1,00	0,37	3,83	0,09
X1: Temperatura quadrática	0,07	1,00	0,07	0,75	0,42
X2: pH linear	0,28	1,00	0,28	2,83	0,14
X2: pH quadrática	0,16	1,00	0,16	1,69	0,23
X3: Glicose linear	0,56	1,00	0,56	5,80	0,05
X3: Glicose quadrática	0,11	1,00	0,11	1,15	0,32
X1xX2	0,04	1,00	0,04	0,38	0,56
X1xX3	0,01	1,00	0,01	0,07	0,79
X2xX3	0,00	1,00	0,00	0,04	0,84
Erro	0,68	7,00	0,10		
Total soma dos quadrados	2,47	16,00			

ANOVA; Var.:Biomassa (g/L); R-sqr=0,724; 17 Runs; MS Residual=0,097

SS^a: Soma dos quadrados

df^b: Graus de liberdade

MSS^c: Média da soma dos quadrados

p^d: < 0,05 são considerados significativo

Tabela 4: Dados experimentais para a produção do óleo microbiano e valores reais para as variáveis independentes utilizados para o planejamento fatorial completo.

Fator	SS ^a	df ^b	MSS ^c	F	p ^d
X1: Temperatura linear	0,003	1,000	0,003	1,706	0,233
X1: Temperatura quadrática	0,003	1,000	0,003	1,656	0,239
X2: pH linear	0,003	1,000	0,003	1,556	0,252
X2: pH quadrática	0,004	1,000	0,004	2,273	0,175
X3: Glicose linear	0,002	1,000	0,002	1,167	0,316
X3: Glicose quadrática	0,000	1,000	0,000	0,000	0,998
X1xX2	0,000	1,000	0,000	0,034	0,859
X1xX3	0,000	1,000	0,000	0,127	0,732
X2xX3	0,001	1,000	0,001	0,401	0,547
Erro	0,014	7,000	0,002		
Total soma dos quadrados	0,030	16,000			

ANOVA; Var.:Var4; R-sqr=0,558; 17 Runs; MS Residual=0,0019329

SS^a: Soma dos quadrados

df^b: Graus de liberdade

MSS^c: Média da soma dos quadrados

p^d: < 0,05 são considerados significativo

**III. Optimization of the production of microbial oil by
Candida zeylanoides: Use of response surface methodology**

ROSA, Priscila Dallé¹; Mattanna, Paula²; FLORES, Simone³; VALENTE, Patricia¹. A ser submetido à Revista Journal of Microbiology.

Optimization of the production of microbial oil by *Candida zeylanoides*:

Use of response surface methodology

ROSA, Priscila Dallé¹; Mattanna, Paula²; FLORES, Simone³; VALENTE, Patricia¹.

¹PPGMAA - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pri_dr_rosa@hotmail.com, patricia.valente@ufrgs.br

²UFSM - Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, mattannapaula@hotmail.com

³ ICTA - Departamento de Ciência dos Alimentos, simone.flores@ufrgs.br

*Corresponding author: Dr. Patrícia Valente, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite, 500, Office 154, Zip Code: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone: +55-51-33084196, Fax: +55-51-33083445, E-mail: patricia.valente@ufrgs.br

Keywords: Yeast oil; *Candida zeylanoides*; Response surface methodology; Central composite design; Nitrogen limitation.

ABSTRACT: Due to the increasing demand for sustainable biofuels, microbial oils as feedstock for biodiesel production have gained scientific and commercial interest. Additionally, microbial oils have a considerable potential market both in the industrial field of pharmaceutical chemistry and as food raw material. The carbon nitrogen (C/N) ratio in the culture media, as well as pH and temperature are the parameters that most affect the production of microbial oil. This study aimed to determine the best parameters for the accumulation of lipids by the yeast *Candida zeylanoides* QU 33. For optimization, response surface methodology was applied, using the levels of the variables temperature (20-35°C), pH (2.0 to 6.0), and glucose concentration (10-40 g/100mL). The results showed that temperatures lower than 28°C, and glucose concentrations greater than 25% are favorable for the accumulation of lipids. The concentrations of glucose lower than 15% were unfavorable. The conditions observed in the experiment at 20°C, pH 4 with 25% glucose were ideal for lipid accumulation, yielding 0.2 g/L.

1.Introduction

During recent years, research on microbial oils or single cell oils has increased considering the daily challenges we are facing: increasing fossil fuel prices, increasing CO₂ concentration in the atmosphere, and decreasing fossil fuel stocks. Production of microbial oils is far more attractive than growing oilseed crops since it does not involve “food vs. fuel” debate, has a shorter life

cycle, needs less labor, cannot be affected by season/climate, and can be scaled up easily (Cui *et al.*, 2012).

The ability of certain microorganisms to accumulate high amounts of lipids has been known for years, but only in the last decades, real efforts have been made to unravel the underlying biochemical pathways (Beopoulos *et al.*, 2009). Some oily yeasts described are able to accumulate lipids to levels greater than 20% of their cellular dry weight, include *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, and *Lipomyces*. Also, the possibility of lipid production on an industrial basis has been previously considered (Ageitos *et al.*, 2011). Recently, we proposed the yeast *Candida zeylanoides* QU33 as a model microorganism for the study of lipid metabolism (Rosa *et al.*, 2014). In this work using *C. zeylanoides* QU33 as a model of non-oleaginous yeast was found that the nitrogen source peptone was excellent for the accumulation of lipid profile with a long chain fatty acids and 25.5% saturated fatty acids suitable for use in biodiesel, thus the methodology of response surface statistical tool proposed a third-order model in order to optimize the production of lipid, with the purpose of knowing the parameters that most influence this answer lipid synthesis.

Response surface methodology (RSM) is an effective statistical technique used to find the optimal conditions for different complex processes. It allows optimizing multiple variables with a minimum number of experiments, being considered less laborious and faster than other optimization techniques (Stroescu *et al.*, 2013). Additionally, to further improve lipid yield on glucose, the

cultivation conditions need to be optimized. Therefore, this study aims to: identify the optimal condition for 1) growth, and 2) lipid accumulation by *C. zeylanoides* through the use of statistical design tools with the culture medium P.

2. Methods

2.1. Microorganism and culture media

C. zeylanoides QU 33 was isolated from homemade cheese in Brazil (Landell et al. 2006). The strain is deposited at the Collection of Microorganisms, DNA and Cells of Universidade Federal de Minas Gerais (CM-UFMG) under the access number UFMG-CM-Y331. The strain was maintained on YEPD agar slants containing (2 % glucose, 1 % peptone, 0.5 % yeast extract) for 24 hours.

2.2. Culture conditions

The pre-culture was performed on an experimental culture medium A containing: 10 % glucose (Dinâmica, Brazil), 0.1 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Cromoline, Brazil), 0.1 % KH_2PO_4 (Vetec, Brazil) and 0.05 % $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Nuclear, Brazil). Cells were grown to an optical density at 600 nm of 1.0 in a rotary shaker (IKA, KS 4000) at 150 rpm and 25 °C for 40 hours. Seed culture (10%) was inoculated into 250 mL flasks containing 100 mL of the experimental culture medium P containing: glucose (Dinâmica, Brazil), 0.05 % peptone (Himedia, Brazil), 0.1 % KH_2PO_4 (Vetec, Brazil) and 0.05 % $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

(Nuclear, Brazil), and cultivation for lipid accumulation was carried out in a rotary shaker (150 rpm) at 25 °C for 72 hours.

2.3. Experimental design

Response surface methodology (RSM) was applied to identify optimum levels of three variables: temperature (20-35 °C), pH (2.0 to 6.0), and glucose concentration (10-40 g/100mL). The coded and encoded variables used in RSM design are listed in Table 1. A central composite design (CCD) with three independent variables was used. The experimental design consists of eight factorial points, six axial points at a distance of ± 1.682 from the centre and 3 replicates of the central points. All variables were taken at a central coded value considered as zero. The result was an experimental design of 17 experimental points, including three central points. All the experiments were carried out in a randomized order. The model proposed for predicting the values of the response variable was a quadratic one and was expressed according to the following equation 1:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq 1}^{3-1} \sum_{j>i}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (\text{Eq.:1})$$

Where Y is the predicted response, β is the coefficient of the equation, and x_i and x_j are the coded levels of variables i and j , respectively. The statistical analysis of the model was performed in the form of analysis of variance (ANOVA), the second-order model equation and significance of

variables were determined by Fisher's F-test. This design consists of replicated center points and the set of points laying at the midpoints of each edge of the multidimensional cube that defines the region of interest. The analysis of the central composite experimental design was carried out using Design Expert Software (Statistica version 12).

2.4. Gravimetric determination of biomass

For gravimetric analysis of biomass, the cultures were transferred to 50 mL conical tubes, and centrifuged at 6000 rpm for 10 min to remove the supernatant. This process was repeated in order to collect the biomass corresponding to 100 mL cultures, followed by washing twice with 15 mL sterile water. Cell pellets were stored overnight at - 30 °C in an Indrel® CLC300DAF Freeze Dry System at 0.027 mbar, and freeze-dried - 47 °C for 24 h in an Liotop 1001 freeze-drier. Freeze-dried cell pellets were weighted at a Shimadzu AY220 analytical balance, and the dry cells were used for lipid extraction.

2.5. Gravimetric determination of lipid content

Lipids were extracted from the yeast biomass produced under different culture conditions according to Bligh and Dyer (1959). Dry biomass was suspended in chloroform/methanol (2:1, v/v), and cell lysis occurred using a T 18 BASIC ULTRA-TURRAX®/IKA homogenizer for 3 min, with ice cooling at each minute to avoid lipid heating. Lysis was followed by filtration through filter paper (MN-615, Macherey-Nagel), and the solvents were removed using a rotary evaporator (Laborota 4000eco, Heidolph) at 60°C. Samples were dried at

60°C for 24h to a constant weight, and weighted at a Shimadzu AY220 analytical balance.

2.6. Nile red fluorescence determination of neutral lipid

Cell suspensions were stained by the Nile red technique (Kimura *et al.* 2004), and observed under fluorescence microscope (Olympus BX41) using lenses with wavelengths ranging between 450-500nm, visible in x40. Lipids were observed as yellow gold or reddish-yellow fluorescence droplets.

3. Results

The experimental values for the biomass and oil at different combinations of the independent variables are summarized in Table 2, along with the predicted response using a second order polynomial model based on equation 1. For all combinations tested, biomass concentration ranged from 0.03g/L to 2.75 g/L, and oil content varied from 0.01 to 0.2 g/L. Interaction terms of the second order polynomial model are shown in Table 3. The significance of each coefficient and their interactions were determined using the t-test. Pareto charts for the effects of temperature, pH, glucose and their interactions on biomass and oil accumulation by *Candida zeylanoides* QU33 (L and Q correspond to the effects at linear and quadratic level, respectively) can be seen in Figure 1.

The values presented in Table 3 demonstrate that the linear temperature term has the largest effect on oil production by *C. zeylanoides* QU33. The cross product terms x_1x_2 , x_1x_3 and x_2x_3 were not statistically

significant ($p > 0.1$). The Pareto chart could also be used to appreciate the degree of influence of each factor on the response. As can be seen in Fig. 1a and Fig. 1b, the linear and the quadratic terms are significant at 10% level. After neglecting of terms which were not statistically significant, the model was rearranged in the following polynomial equations (2) and (3):

$$\text{Equation 2: Biomass (g/L)} = 2.51 - 0.82x_1 - 0.026x_2 - 0.58x_1^2 - 0.327x_2^2 - 0.23x_3^2$$

$$\text{Equation 3: Lipid (g/L)} = 0.158 - 0.05x_1 + 0.026x_2 - 0.024x_1^2 - 0.023x_2^2 - 0.022x_3^2$$

Analysis of variance (ANOVA) is required to test the significance and adequacy of the model. ANOVA for response surface quadratic model for biomass content and lipid productivity is presented in Tables 3 and 4. The regression models accurately described the experimental data, which indicated successful correlation among the three parameters that affected the two responses as discussed above. This was supported by the values of correlation coefficients of R^2 , 0.79 and 0.75 for biomass content and lipid productivity, respectively. These R values suggested a satisfactory representation of the process model and a good correlation between the experimental results and the theoretical values predicted by the model equation. The ANOVA of the quadratic regression model has demonstrated that the model is significant, as it can be observed from the Fisher's F-test (F model biomass = 6.8 and F model lipid = 8.6) with a low p value ($p < 0.1$) by biomass and lipid. The predicted versus observed values of lipids indicate a good agreement between the

polynomial regression model and experimental data, with a coefficient of determination of 0.75 (R^2).

For the studied case, the influence on the biomass and oil increases with the decrease of the temperature. The p value of the models of 0.0003, 0.0567, 0.0227, 0.0567 and 0.0748 indicated the significance of the coefficients, and it can be concluded that a change in the linear temperature caused the major variation in lipid production. The effects: pH, the quadratic effect of pH and glucose concentration was also statistically significant. In order to gain a better understanding of the results, the predicted models are presented in Fig. 2 as the 3-D response surface contour plots.

3.2. Comparison of the Nile red fluorescence method with the conventional gravimetric method

The Nile red staining of *C. zeylanoides* QU33 cells was performed in each experiment. The results can be seen in Figure 3, in which the higher yellow gold intensities were seen at temperatures below 27.5°C. These results are in accordance with the gravimetric lipid values obtained for each experiment.

4. Discussion

4. 1. Effects of process parameters on optimization

From the results obtained, it could be concluded that the temperature had more significant effects on biomass yield and lipid content than pH and

glucose concentration (Figs. 1 and 2). According to Fei et al. (2011), oleaginous microorganisms can be divided into two groups in terms of low (25–30°C) and high (35–40°C) optimum temperatures for lipid accumulation. *C. zeylanoides* QU33 belongs to the low optimal temperature group. Cultivation at approximate room temperatures is usually favorable for commercial production, since the energy supply can be reduced. *C. zeylanoides* QU33 thereby satisfied this criterion.

Nile red has been successfully used as a fluorescence probe for the detection of neutral lipids in yeast (Poli et al., 2013), and rapid estimation of lipid concentration in various oleaginous fungi (Kimura et al., 2004; Wolinski et al. 2011). In our experiments, the Nile red fluorescence confirmed the strong influence of temperature. Earlier studies found that there is a significant correlation between the fluorescence intensity of Nile Red-stained cells and the lipid content in yeasts (Kimura et al., 2004) (Poli et al., 2013).

It is known that nitrogen limitation can endorse lipid accumulation by oleaginous yeasts when carbohydrates are used as carbon sources (Ratledge & Wynn, 2002). The cellular lipid accumulation process generally requires the exhaustion of nitrogen to allow the excess carbon to be converted into lipids. Under such conditions, the increase in intracellular lipid content results essentially from the synthesis of saturated and monounsaturated fatty acids in most oleaginous microorganisms (Papanikolaou & Aggelis, 2011). Lipid productivity is the product of biomass density and lipid content. For *C.*

zeylanoides QU33, both excessively low or high glucose concentration reduced the lipid content.

5. Conclusion

The response surface methodology allowed the development of empirical polynomial models for predicting biomass production and cellular lipid content for the oleaginous yeast *C. zeylanoides* QU33 grown on glucose. The derived equations and contour plots allowed the identification of optimal parameters for obtaining maximal biomass density and lipid content. Resulted in similar lipid content as those predicted by the models.

REFERENCES

- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories, 1219–1227. doi:10.1007/s00253-011-3200-z
- Beopoulos, A., Chardot, T., & Nicaud, J.-M. (2009). *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91(6), 692–6. doi:10.1016/j.biochi.2009.02.004
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiological*. v. 27, p. 911-917.

Cui, Y., Blackburn, J. W., & Liang, Y. (2012). Fermentation optimization for the production of lipid by *Cryptococcus curvatus*: Use of response surface methodology. *Biomass and Bioenergy*, 47, 410–417. doi:10.1016/j.biombioe.2012.09.017

Fei, Q., Nam, H., Shang, L., Choi, J., Kim, N., & Kang, J. (2011). The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresource Technology* 102, 2695–2701. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.141

Kimura, K., Yamaoka, M., & Kamisaka, Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence, 56, 331–338. doi:10.1016/j.mimet.2003.10.018

Landell, M. F., & Hartfelder, C. (2006). Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil, 34(December 2005), 49–55.

Papanikolaou, Seraphim, & Aggelis, G. (2011). Review Article Lipids of oleaginous yeasts . Part I : Biochemistry of single cell oil production, 1031–1051. doi:10.1002/ejlt.201100014

Poli, J. S., Dallé, P., Senter, L., Mendes, S., Ramirez, M., Vainstein, M. H., & Valente, P. (2013). Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21 : an alternative for vegetable oils, (1985), 203–208.

Rosa, P. D., Mattanna, P., Carboni, D., Amorim, L., Richards, N., & Valente, P. (2014). *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia Microbiologica*. doi:10.1007/s12223-014-0325-3

Ratledge, C. (2002) Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1047–1050.

Stroescu, M., Stoica-guzun, A., Ghergu, S., Chira, N., & Jipa, I. (2013). Optimization of fatty acids extraction from *Portulaca oleracea* seed using response surface methodology. *Industrial Crops & Products*, 43, 405–411. doi:10.1016/j.indcrop.2012.07.051

Wolinski, H., Kolb, D., Hermann, S., Koning, R. I., & Kohlwein, S. D. (2011). A role for seipin in lipid droplet dynamics and inheritance in yeast, 3894–3904. doi:10.1242/jcs.09145

LIST OF FIGURES AND TABLES

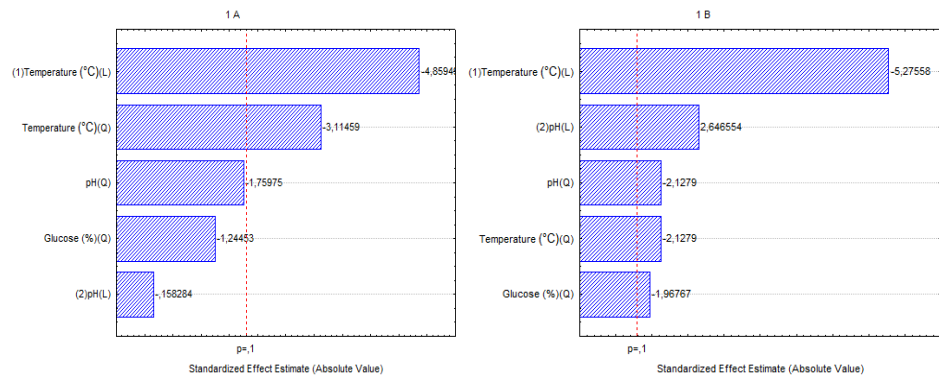


Figure 1: Pareto chart for the effects of temperature, pH, glucose (%) and of their interactions from *C. zeylanoides* yeast (L and Q correspond to the effects at linear and quadratic level, respectively) (A) Biomass and (B) Lipid.

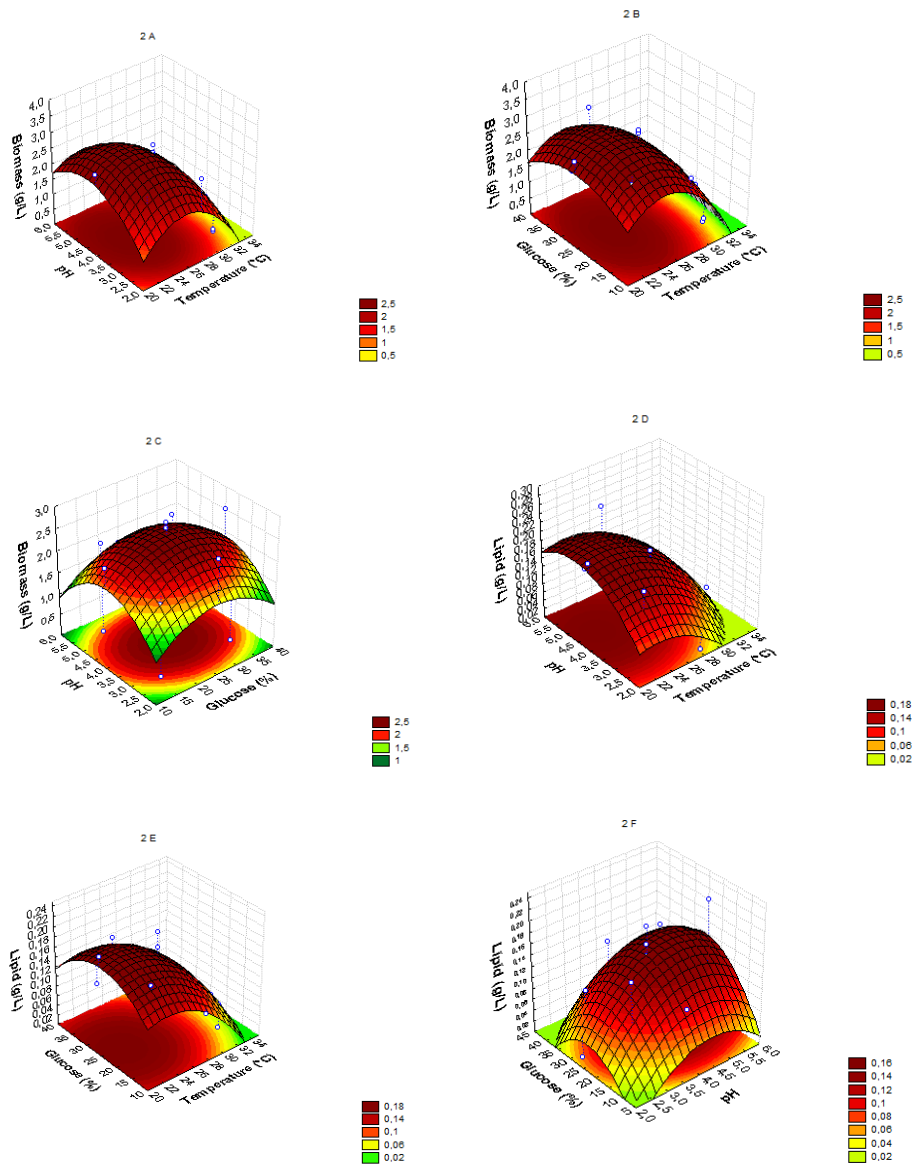


Figure 2: Response surfaces of *Candida zeylanoides* QU 33 Biomass as a function of: (a) temperature and pH; (b) temperature and glucose; (c) pH and glucose. Lipid as a function of: (d) temperature and pH; (e) temperature and glucose; (f) pH and glucose.

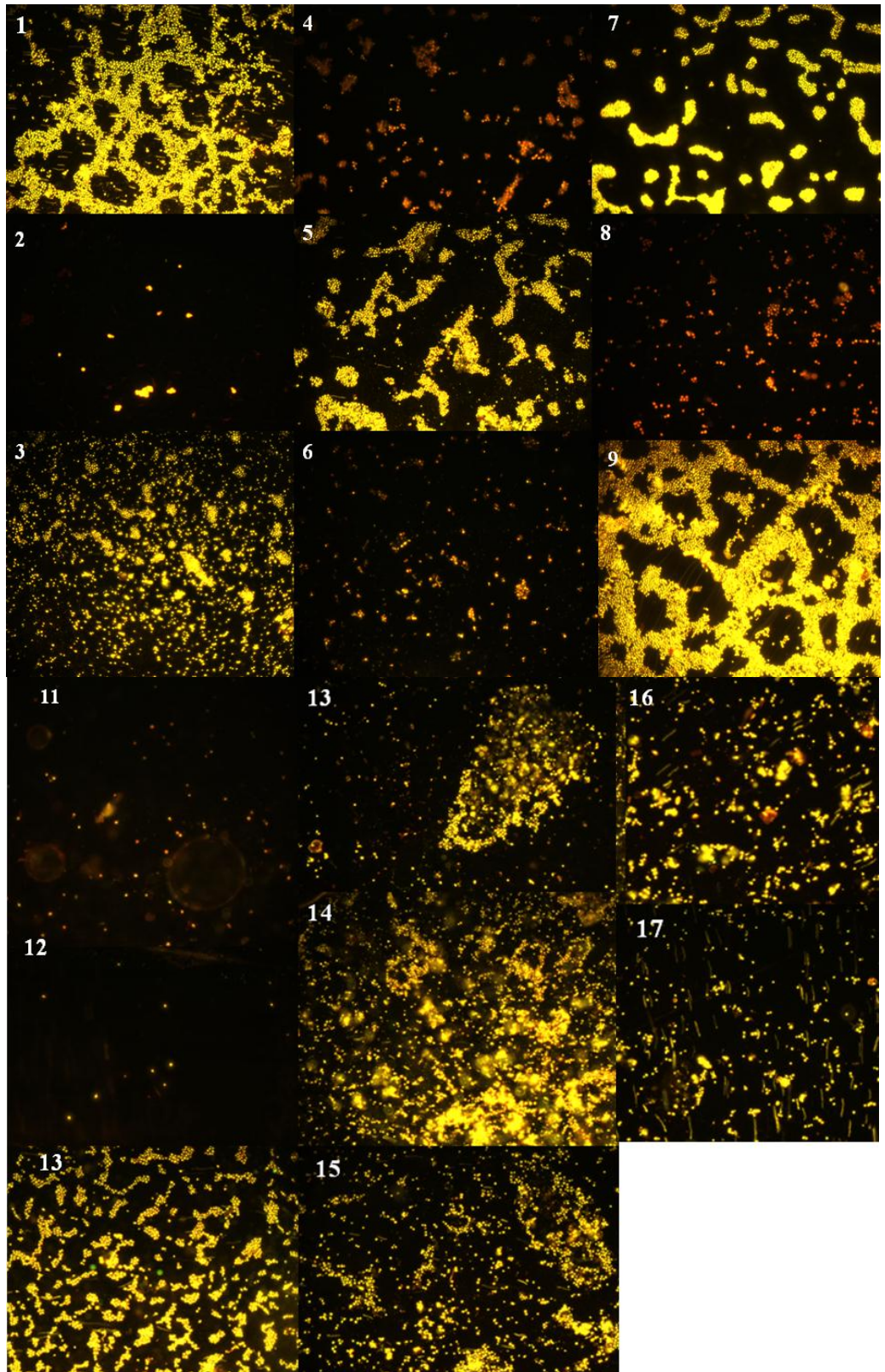


Figure 3: Representative photos of yeast strains by lipid droplets (yellow-gold) inside the cell visualized with objective lenses (40x).

Table 1: Uncoded and coded levels of independent variables for oil extraction from yeast *Candida zeylanoides* QU33.

Variables	Codes	Levels				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Temperature (°C)	X1	20	23	27.5	32	35
pH	X2	2	2.8	4	5.2	6
Glucose %	X3	10	16.07	25	33.93	40

Table 2: Design of the variables and experimental results regarding biomass and lipid, CCD experimental results, predicted values, and residual lipid.

Run	T (°C)	pH	Glucose %	X (g L ⁻¹)	L (g L ⁻¹)Obs.	L (g L ⁻¹)Pred.	L (g L ⁻¹) Residual
1	23	2,8	16,07	1,72	0,160	0,126	0,034
2	32	2,8	16,07	0,03	0,010	0,015	-0,005
3	23	5,2	16,07	2,22	0,120	0,164	-0,044
4	32	5,2	16,07	0,13	0,060	0,063	-0,003
5	23	2,8	33,93	1,41	0,090	0,112	-0,022
6	32	2,8	33,93	0,1	0,020	0,001	0,019
7	23	5,2	33,93	2,19	0,150	0,170	-0,020
8	32	5,2	33,93	0,12	0,010	0,069	-0,059
9	20	4	25	2,62	0,200	0,181	0,019
10	35	4	25	0,23	0,020	0,003	0,017
11	27,5	2	25	2,66	0,020	0,048	-0,028
12	27,5	6	25	1,61	0,200	0,137	0,063
13	27,5	4	10	2,31	0,100	0,101	-0,001
14	27,5	4	40	2,50	0,130	0,094	0,036
15	27,5	4	25	2,33	0,150	0,159	-0,009
16	27,5	4	25	2,26	0,170	0,159	0,011
17	27,5	4	25	2,75	0,150	0,159	-0,009

* X = biomass (g L⁻¹), L = lipid productivity (g L⁻¹)

Table 3: Analysis of variance (ANOVA) of response surface quadratic model for the prediction of biomass from *Candida zeylanoides* QU33.

Fator	SS ^a	df ^b	MSS ^c	F	p ^d
(1)Temperature (°C)(L)	9,15258	1	9,152578	23,61469	0,000503
Temperature (°C)(Q)	3,75980	1	3,759796	9,70070	0,009844
(2)pH (L)	0,00971	1	0,009710	0,02505	0,877101
pH (Q)	1,20023	1	1,200232	3,09673	0,106192
Glucose (°)(Q)	0,60031	1	0,600308	1,54886	0,239167
Error	4,26338	11	0,387580		
Total	17,49529	16			

R²=0.76; Adj:0.64, 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=0.39DV: Biomass (g/L)

SS^a: Sum of squares

df^b: Degrees of liberty

MSS^c: Average sum of squares

p^d: < 0.1 is considered significative

Table 4: Analysis of variance (ANOVA) of response surface quadratic model for the prediction of microbial oil from *Candida zeylanoides* yeast.

Factor	SS ^a	df ^b	MSS ^c	F	p ^d
X1: Linear Temperature	0,038246	1	0,038246	27,83176	0,000262
X1: Quadratic Temperature	0,006222	1	0,006222	4,52797	0,056786
X2: Linear pH	0,009625	1	0,009625	7,00425	0,022726
X2: Quadratic pH	0,006222	1	0,006222	4,52797	0,056786
X3: Quadratic Glucose	0,005320	1	0,005320	3,87172	0,074829
Error	0,015116	11	0,001374		
Total sum of squares	0,074188	16			

R²=0.79; Adj:0.70, 3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=0.0014 DV: Lipid (g/L)

SS^a: Sum of squares

df^b: Degrees of liberty

MSS^c: Average sum of squares

p^d: < 0.1 is considered significative

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

A identificação molecular correspondeu uma identidade de 99% com *Candida zeylanoides*, portanto estirpe QU33 foi identificada como pertencendo a esta espécie.

No presente trabalho foi realizado um ensaio preliminar com a *Candida zeylanoides* QU33 para avaliar seu crescimento nos pH 4, 6, e 8 nas 24, 48, 72 e 96 h de cultivo, usando tubos de ensaio, sendo o crescimento avaliado visualmente no meio líquido GYP e no meio A, incubados na estufa a 25°C (Tabela 2). A avaliação do crescimento foi realizada pela verificação da turbidez causada pelo crescimento da levedura. Com o pH 6 obtivemos maior turbidez nas primeiras 48 horas nos dois meios testados. Também foi feito esse ensaio para temperatura de 30°C e 35°C, demonstrando ter um melhor crescimento com a temperatura de 30°C (Tabela 3).

Tabela 2: Ensaio preliminar da faixa de crescimento da levedura QU33 em diferentes pH ao longo de 96h de cultivo com os meios GYP e A.

Meio	GYP/A	GYP/A	GYP/A	GYP/A
	24h	48h	72h	96h
pH 4	0/0	+/0	++/+	+++/**
pH 6	+/0	+/+	++/+	+++/**
pH 8	0/0	+/0	++/+	+++/**

0= sem crescimento, +=turbidez, +=média turbidez, +++=alta turbidez.

Tabela 3: Ensaio preliminar para avaliar o crescimento da levedura QU33 em diferentes temperaturas ao longo de 96h de cultivo com os meios GYP e A.

Meio	GYP/A	GYP/A	GYP/A	GYP/A
	24h	48h	72h	96h
30 °C	0/0	+/+	++/++	+++/>+++
35 °C	0/0	0/0	+/+	+/+

0= sem crescimento, +=turbidez, ++=média turbidez, +++=alta turbidez.

Foram avaliadas as quatro fontes de carbono, como glicose, glicerol, lactose e xilose, para verificação da fonte de carbono preferida pela *Candida zeylanoides* QU33, fixando a fonte de nitrogênio como sulfato de amônio, na razão de C/N de 100:1 por 7 dias de incubação a temperatura ambiente. Conforme pode ser observado na Figura 5, a fonte de carbono que apresentou crescimento mais expressivo e uniforme foi a glicose (Figura 5). A melhor intensidade de fluorescência amarelo-ouro após coloração com vermelho de Nilo também foi obtida com a glicose. Sabemos que a intensidade de fluorescência correspondente à quantidade de lipídeos intracelulares, sendo, portanto, um método de estimativa rápida do teor lipídico intracelular em microrganismos, utilizado já por vários autores, como Kimura *et al.* (2004), Liu *et al.* (2008), Chen *et al.*, (2009) e Poli *et al.*, (2013). A maioria dos estudos sobre a produção de lipídeos em microrganismos oleaginosos (microalgas, fungos, bactérias, etc) foram realizadas com glicose como única fonte de carbono (Li *et al.*, 2007, Papanikolaou *et al.*, 2010, Steen *et al.*, 2010).

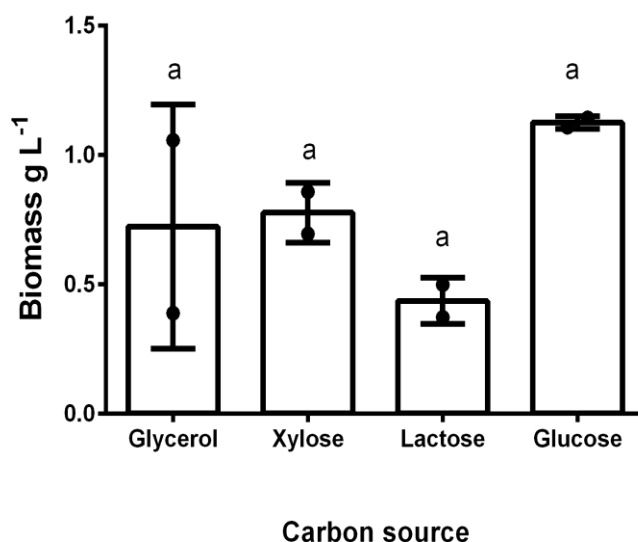


Figura 5: Crescimento celular da *Candida zeylanoides* QU33 sob as condições de cultivo de 25°C, 150 rpm, por 7 dias.

Conhecendo o intervalo de crescimento da levedura de acordo com os parâmetros pH e temperatura (Tabelas 2 e 3), foram realizados então a triagem com os experimentos utilizando o meio A em Erlenmeyer de 250 mL, sob as condições descritas nos materiais e métodos, para avaliar o acúmulo de lipídeo intracelular com o fluorocromo Vermelho de Nilo. Todas as linhagens avaliadas apresentaram gotas lipídicas, no entanto, este acúmulo ocorreu em proporções diferentes em cada tratamento. Desta forma em pH inferiores houve uma maior intensidade amarelo-ouro, porém com um baixo crescimento celular, dificultando a obtenção de lipídeo pelo método gravimétrico. Os resultados obtidos demonstram que o pH influencia no crescimento deste microrganismo, sendo preferidos para seu crescimento os pH mais próximos do

pH neutro. No entanto, na figura 6 observa-se que com o pH 2, ácido, a intensidade da fluorescência fica mais amarela e com o aumento do pH a fluorescência torna se mais alaranjada, como demonstrado com o pH 8.

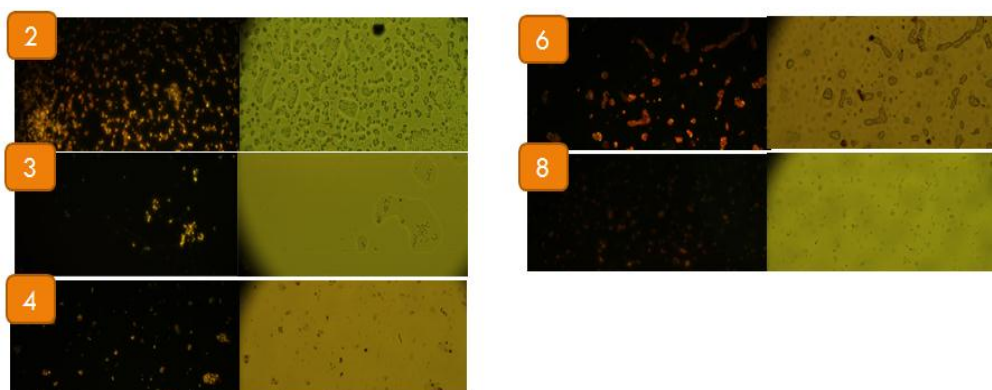


Figura 6: *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano em pH de 2, 3, 4, 6 e 8 na figura da direita e da esquerda com luz branca. Segundo as condições de cultivo de 25 °C, 150 rpm, por 72 h.

No artigo Hall & Ratledge, 1977 com a *Candida* 107 acreditavam que o pH não tinha um importante efeito sobre a produção de lipídeos, não era tão amplamente estudado como os outros parâmetros. Neste artigo foi demonstrado que temperatura foi importante no acúmulo de lipídeo, contudo o pH teve pouca influência sobre a quantidade de lipídeo produzido e na sua composição de ácido graxos.

No trabalho com outra levedura, *Cryptococcus albidus* (Fei *et al.*, 2011), o acúmulo de lipídios foi fortemente inibido em pH ácido, abaixo de pH

4,0. No entanto, a partir de pH 5,5 a 7,0, *C. albidus* apresentou boa capacidade de acúmulo de lipídeos. A concentração mais elevada de lipídeos e rendimento foram de 0,3 g/L e 26,7% com o pH 6,0 nessa levedura. No primeiro momento deste trabalho, foi verificado pelo vermelho de Nilo, que pH mais ácido era favorável para o acúmulo de lipídeo pela *C. zeylanoides* QU33, porém seu crescimento celular também ficava inibido, da mesma forma que com a *C. albidus*. Com o pH mais próximos do neutro a *C. zeylanoides* QU33 se desenvolvia melhor. Logo, era necessário descobrir a condição ideal para seu crescimento e acúmulo de lipídeo, então foi realizado a otimização com a metodologia de superfície de resposta e assim descoberto o seu pH ótimo.

Na literatura, valores de pH diferentes são relatados para acúmulo de lipídeos em microrganismos, o qual parece depender das fontes de carbono e das fontes de nitrogênio utilizadas. Um pH ótimo de 4,9 para a acumulação de lipídeos foi encontrado quando a glicose foi utilizada como uma fonte de carbono, enquanto o pH ótimo de 4,0 quando o etanol foi utilizado como fonte de carbono (Angerbauer *et al.*, 2008) com a levedura *Lipomyces starkeyi*. Verificou-se no artigo III neste trabalho, quando feito a otimização com o a fonte de nitrogênio sendo a peptona, o pH ótimo foi de 4, e quando realizada a otimização com sulfato de amônio, o pH ótimo foi de 7 (artigo II), demonstrando também que variando a fonte de nitrogênio também influencia no pH ótimo de acúmulo de lipídeo.

Na Figura 7 é analisada a influência da temperatura no acúmulo de lipídeo pela microscopia de fluorescência, observando uma gotícula

amarelo-ouro intracelular a 20°C, e nenhum acúmulo de lipídeo e crescimento celular a 40°C. Demonstrando ter um melhor desempenho no crescimento celular em temperaturas abaixo de 25°C. Entretanto houve uma boa intensidade com o vermelho de Nilo a 35°C, porém um baixo crescimento celular, provavelmente pela influência do estresse da temperatura que o microrganismo está sofrendo. No trabalho realizado em 2011 pelo Q. Fei e colaboradores com a *Cryptococcus albidus*, houve bom crescimento e acúmulo de uma grande quantidade de lipídeos num intervalo de temperatura de 20-30 °C, tendo sido as concentrações máximas de lipídeos obtidas a uma temperatura de 25°C. E em contraste, os lipídeos não foram acumulados a 35 °C, apesar de obterem crescimento celular máximo em 48 horas nesta temperatura com o *C. albidus* (Fei *et al.*, 2011). A levedura *C. zeylanoides* QU 33 teve um comportamento semelhante, com um bom crescimento em temperaturas mais baixas, como verificado na Figura 7.

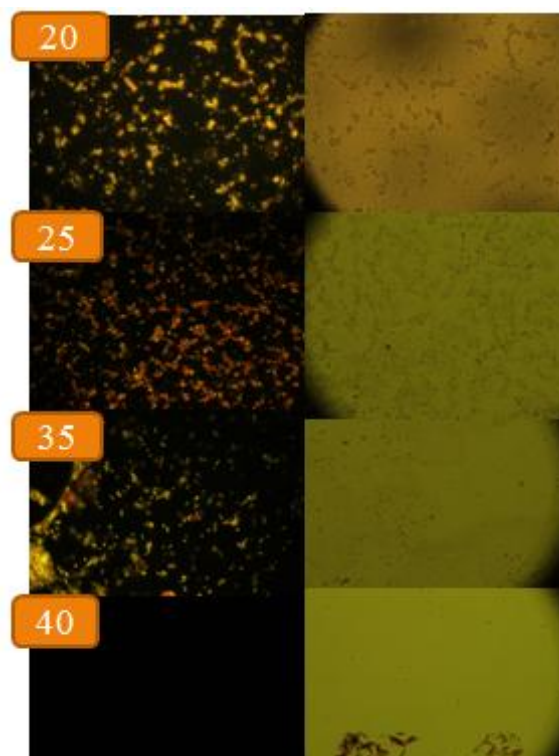


Figura 7: *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano nas temperaturas de 20°C, 25°C, 35°C e 40°C na imagem da esquerda e na da direita leveduras sob a luz branca. Segundo as condições de cultivo 150 rpm, por 72 h.

Na maioria das leveduras oleaginosas os efeitos da concentração de glicose no crescimento e na produção de lipídeos ocorrem quando a fonte de nitrogênio é exaurida, tendo a fonte de carbono ainda disponível e em excesso, continuando a ser assimilada pelas células, que progressivamente se tornam obesas. É de se esperar que tendo maior aporte de fonte de carbono, maiores concentrações de glicose, ela se tornará obesa mais rapidamente. Em um trabalho referente à produção de lipídeos pela *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 (Amaretti *et al.*, 2010), foram testadas as seguintes concentrações iniciais de glicose: 1, 4, 6, 8, 16, 40, 80, 120, e 160 g/L, num

experimento em batelada com um biorreator. A concentração de glicose de 120 e 160 g/L correspondeu à maior produção de lipídeos, 19 e 22 g/L, respectivamente. Foi descrito que as células não se multiplicaram durante a fase lipogênica, enquanto está aumentando a produção de biomassa proporcionalmente ao consumo de glicose, ocorrendo o acúmulo de intracelular de lipídeos. Pode-se avaliar na figura 8 que, em concentrações superiores a 12% de glicose, se obteve uma maior fluorescência pela metodologia do Vermelho de Nilo com a levedura *C. zeylanoides* QU33.

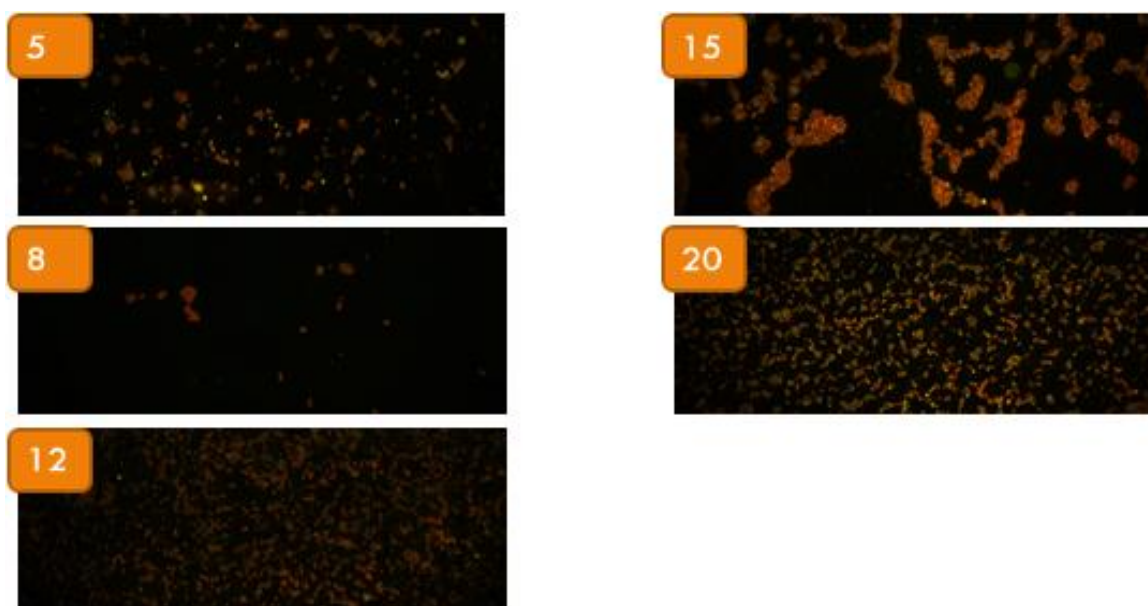


Figura 8: *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano concentrações de glicose, como 5%, 8%, 12%, 14% e 20%. Segundo as condições de cultivo 25 °C, 150 rpm, por 72 h.

Foram testadas as velocidades de agitação para incubação de 150, 200 e 300 rpm e as condições iniciais de 150 rpm mostraram mais favoráveis ao acúmulo de lipídeo segundo a metodologia do vermelho de Nilo, como pode ser observado na figura 9. A maioria dos trabalhos com leveduras usaram agitação de 150 rpm com objetivo de acumular lipídeo (Deak *et al.*, 2000, Cui *et al.*, 2012, Peng *et al.* 2013, Poli *et al.*, 2013, Shareck *et al.*, 2011), no entanto com algas variam de 200 a 300 rpm (Hosokawa *et al.*, 2003, Taha *et al.*, 2010 (Vasudevan & Briggs, 2008).

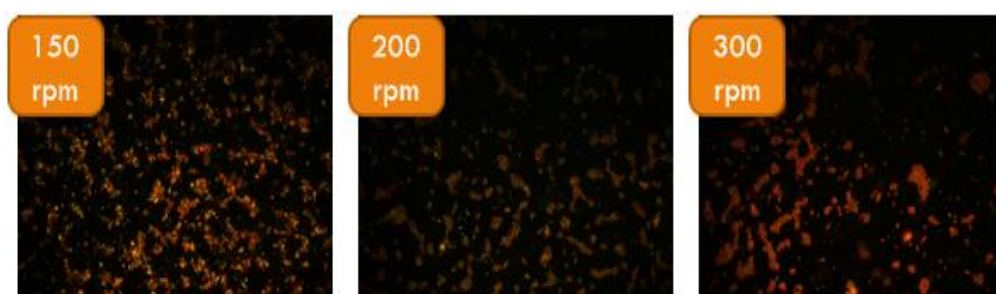


Figura 9: *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano nas velocidades de agitação de 150, 200 e 300 rpm. Segundo as condições de cultivo 25 °C, 150 rpm, por 72 h.

No artigo I podemos relacionar o peso gravimétrico de lipídeo das diferentes fontes de nitrogênio com a intensidade do vermelho de Nilo, no qual a fluorescência mais intensa foi com o meio P, seguido pelo meio N, YE, S da

mesma forma como se comportou a quantidade de lipídeo no gráfico 1B do artigo I.

Em relação aos efeitos dos componentes do meio de cultura sobre a biomassa e a produção de lipídeo em trabalhos com *T. fermentans*, entre as fontes de nitrogênio testadas, a ureia apresentou crescimento máximo para a biomassa (23,1 g/L), seguido pela peptona (19,7 g/L). No entanto, o rendimento do acúmulo de lipídeo em relação a biomassa foi melhor com a fonte de nitrogênio sendo peptona (54,9%) e a produção máxima de lipídeos de 10,8 g/L. As fontes de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl e NH_4NO_3 tiveram baixo rendimento de biomassa quanto de lipídeos, indicando que as fontes de nitrogênio orgânico são mais benéficas para a produção de lipídios em *T. fermentans* que as fontes de nitrogênio inorgânico (Zhu, Zong, & Wu, 2008). No presente estudo também se observou um melhor crescimento e acúmulo de lipídeo com fonte de nitrogênio orgânica, sendo, portanto superiores na produção de biomassa em relação ao peso gravimétrico das inorgânicas. E quando testado nitrato de potássio foi obtido crescimento nulo (dado não apresentado).

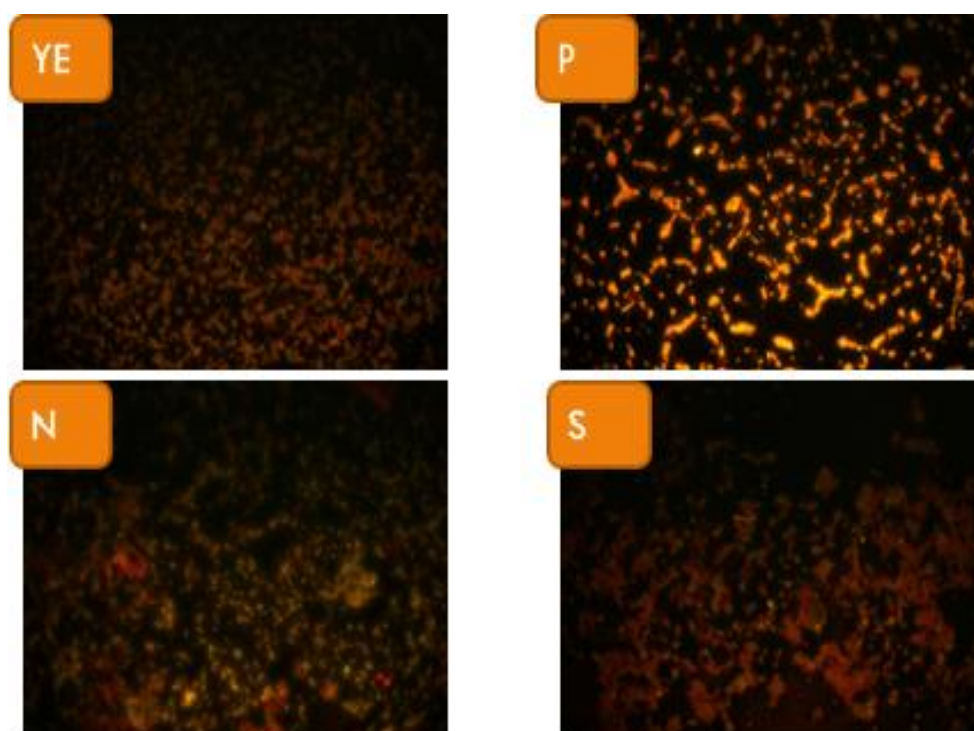


Figura 10: *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano em diferentes fontes de nitrogênio. S: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, N: NH_4NO_3 , P: Peptona, YE: Extrato de levedura. Condições de cultivo 25 °C, 150 rpm, por 72 h.

O extrato de levedura também se mostrou importante para o crescimento da *C. fascians* CF15 com Cooper *et al.* (1981) usando como fonte de carbono a sacarose, a concentração da biomassa aumentou 600%. Resultados semelhantes foram obtidos por Cooper e Paddock (1984), que relataram que o extrato de levedura mostrou alta influência sobre a produção de biomassa de *T. bombycolia*. A biomassa produzida com *C. ingens* (24 g/L) foi maior do que com *T. bombycolia* (9,1 g/L) (Cooper e Paddock, 1984) e *C. bombycolia* NRRL 17069-Y (11,7 g/L) cultivadas sob as mesmas condições ótimas de cultura (Amézcuca *et al.*, 2007). Da mesma forma o extrato de levedura como fonte de nitrogênio apresentou grande influência no crescimento

da biomassa, com crescimento máximo de 2,4 g/L demonstrado no artigo I, sendo 43% superior as quantidades de biomassa produzidas com as fontes inorgânicas.

Muitos fatores, incluindo os componentes do meio, tais como a fonte de carbono, fonte de nitrogênio e razão C/N, bem como as condições de cultura (temperatura e pH) têm influência significativa sobre o crescimento celular e acúmulo de lipídeos pelos microrganismos oleaginosos (Papanikolaou *et al*, 2007). A razão C/N 400:1 para o acúmulo de lipídeo foi melhor segundo a metodologia do vermelho de Nilo (figura 11), já que apresentou uma intensidade maior em relação às outras testadas. Contudo essa relação fez com que reduzisse demais o crescimento da biomassa e, conseqüentemente, a quantidade de lipídeo, podendo ser comparado aos pesos gravimétricos nas figuras 2 A e 2 B no artigo I, prevalecendo a razão 200:1 como a melhor para biossíntese do óleo microbiano.

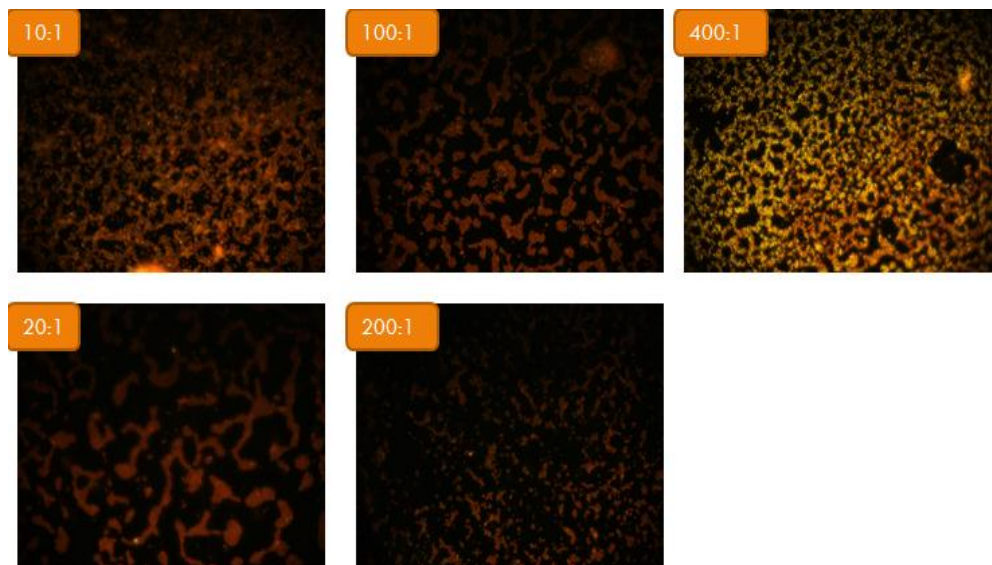


Figura 11: *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano nas diferentes razões C/N com a fonte de carbono sendo glicose e a fonte de nitrogênio sendo peptona. Condições de cultivo 25 °C, 150 rpm, por 72 h. Razões C/N de 10:1, 20:1, 100:1, 200:1 e 400:1.

Num estudo com *L. starkeyi* foi comparado as diferentes razões C/N de 150, 60, 30, 20 e 15. Os resultados apresentados com o maior teor de lipídeos foram com a razão a razão de C/N 150:1, com 68% de lipídeos em relação a biomassa seca (Angerbauer *et al.*, 2008). Também foi verificado que a alta razão de C/N de 120:1 foi favorável tanto para sintetizar lipídios quanto carotenóides pela *Rhodotorula glutinis* (Schneider *et al.*, 2013).

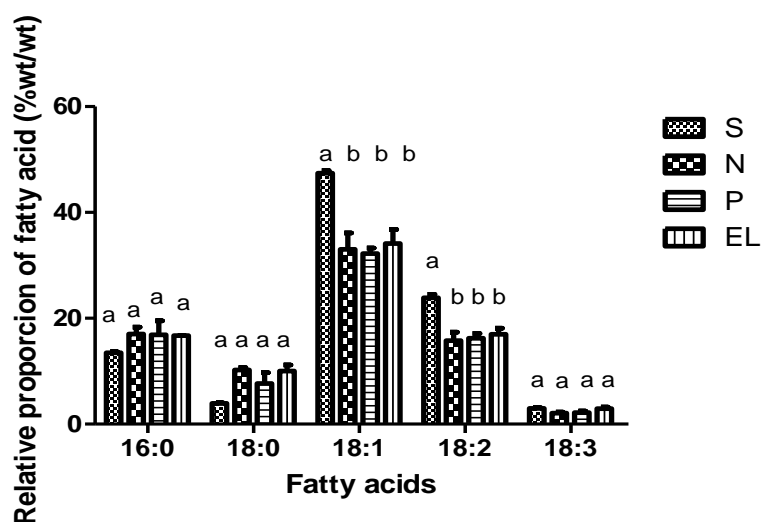


Figura 12: Composição dos principais ácidos graxos da *C. zeylanoides*. Condições de cultura da Fig. 10.

No artigo II a otimização foi capaz de produzir uma boa quantidade de biomassa (4,02 g/L) no experimento de número 9 com cinco dias de crescimento em glicose e sulfato de amônio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Houve um aumento de aproximadamente 140% no crescimento de biomassa e um aumento de 78 % de lipídeo em relação ao artigo I (Rosa *et al.*, 2014) com essas fontes de C e de N. O acúmulo visualizado com o fluorocromo Vermelho de Nilo ficou com uma intensidade bem superior ao primeiro artigo, podendo comparar a figura 13 com 20°C de cultivo com a figura 10 com o meio S. Neste artigo a composição deste meio levou a um perfil lipídico predominantemente de ácidos graxos insaturados (figura 12), podendo ser empregado na indústria de alimentos, tanto na farmacêutica sendo uma alternativa na obtenção de Ômega 3 e Ômega 6. Os resultados obtidos no Artigo I (Rosa *et al.*, 2014) mostram que, quando as condições de cultivo, bem como o meio de cultura são modificados, a

composição dos ácidos graxos também sofre alterações. Portanto, o óleo obtido a partir de uma determinada espécie de levedura pode ter mais de uma aplicação à medida que as condições e/ou o meio de cultivo forem modificados.

Na otimização com sulfato de amônio no artigo II a produção máxima de biomassa pela levedura *C. zeylanoides* QU33 foi de 4,02 g/L no experimento 9 e de acúmulo de lipídeo foi de 0,16 g/L no experimento 8. Obtendo maior produção de biomassa em menores temperaturas e com concentrações mais altas de glicose, sendo que a temperatura ótima para produção de biomassa foi a 20°C, enquanto de lipídeo foi de 26,4°C com uma concentração de glicose de 16,5%. Na figura 13 com a metodologia do vermelho de Nilo são demonstrados os pontos extremos da otimização nas mesmas condições de pH e concentração de glicose, demonstrando que a temperatura também influencia no acúmulo de lipídeo, sendo com 20°C a intensidade de lipídeo intracelular bem superior a temperatura de 28°C demonstrados na figura 13.

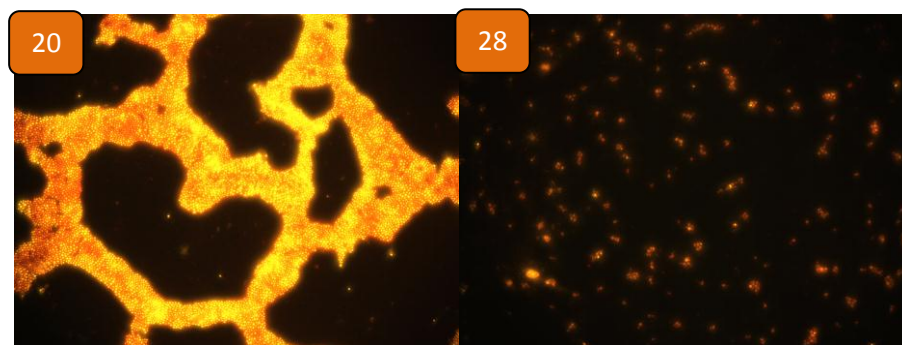


Figura 13: *Candida zeylanoides* QU33 observada em microscópio de fluorescência após coloração com vermelho de Nilo. Pode-se observar gotas lipídicas amarelo-ouro indicando o acúmulo de óleo microbiano a partir da otimização com sulfato de amônio. Condições 150 rpm, por 120 h, pH 7, 14% de glicose. A figura da direita a 20°C e a figura da esquerda a 28°C.

Foi previamente demonstrado no artigo I (Rosa *et al.*, 2014) que a utilização da peptona como fonte de nitrogênio era mais eficiente para o acúmulo de lipídeo. Além disso, foram avaliados os parâmetros que influenciavam o acúmulo de lipídeo, como a concentração de fonte de carbono, a temperatura de incubação, a agitação e o pH. A partir disso montou-se a análise do desenho experimental no artigo III e pode-se avaliar todo tipo de interação nesse processo em relação ao pH, temperatura e concentração de glicose. Os resultados apresentados mostraram um bom ajuste no modelo escolhido. Isto é devido aos parâmetros previamente selecionados para aplicar a metodologia de superfície de resposta. O F calculado foi maior que o F tabelado tanto na produção de biomassa quanto de lipídeo, e também tiveram coeficiente de regressão razoável para um ensaio microbiológico. O resíduo do modelo foi mínimo, o que é fundamental na avaliação da qualidade do ajuste

do modelo, ou seja, todas as previsões (ou predições, como se diz na estatística) coincidiram com os resultados observados.

No artigo III pode-se comparar a intensidade de fluorescência com a quantidade de acúmulo de lipídeo, mostrando ter um melhor acúmulo de lipídeo o experimento de número 9, tendo uma boa correlação por esta metodologia do vermelho de Nilo em relação ao peso gravimétrico, esse ponto ideal para biossíntese de óleo microbiano foi também favorável para o crescimento celular.

6. CONCLUSÕES

Esta dissertação teve como foco a biossíntese de óleo microbiano a partir de diferentes condições de cultivo, por meio da seleção de uma linhagem de levedura potencialmente oleaginosa. Foi identificadas as principais condições de cultivo, e também foi aplicada a metodologia de triagem com microscopia de fluorescência, a qual facilitou na escolha dos parâmetros para o delineamento experimental afim de aplicar a Metodologia de Superfície de Resposta. As principais contribuições resultantes destes estudos estão resumidas abaixo.

- A levedura *Candida zeylanoides* QU33 foi selecionada como potencialmente oleaginosa.
- A metodologia de triagem com vermelho de Nilo foi eficaz e rápida para a seleção das leveduras potencialmente oleaginosas, apresentando resultados compatíveis com a análise gravimétrica dos lipídeos.
- A levedura *Candida zeylanoides* QU33 foi capaz de crescer e acumular lipídeos em glicose, glicerol e trealose como únicas fontes de carbono.
- O meio de cultura, assim como as condições de cultivo, influenciaram no perfil de ácidos graxos presentes no óleo produzido pela levedura *C. zeylanoides* QU33.

▪ A metodologia de superfície de resposta permitiu o desenvolvimento de um modelo polinomial de segunda ordem empírico para a previsão da produção de biomassa e do conteúdo lipídico intracelular pela levedura *Candida zeylanoides* QU33 quando cultivada em glicose como fonte de carbono. No experimento com a temperatura, o pH e a concentração de glicose ótimos foram obtidos até 0,16 g/L de lipídeo com a fonte de nitrogênio sendo sulfato de amônio e 0,2 g/L de lipídeo com a fonte de nitrogênio sendo peptona.

A perspectiva com base nos resultados obtidos na presente dissertação pode ser proposta para trabalhos futuros:

- Utilização de resíduos industriais como matéria prima para a produção de óleo microbiano;
- Otimização da produção de óleo microbiano em biorreator para maior controle das variáveis do processo, como aeração, agitação, temperatura e pH;
- Engenherar a *C. zeylanoides* QU33 com as enzimas presentes nas leveduras oleaginosas;
- Estudo do modelo de obesidade;

7. BIBLIOGRAFIA

Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-crespo, P., & Villa, T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1219–1227, 2011.

Amaretti, A., Raimondi, S., Sala, M., Roncaglia, L., Lucia, M. De, Leonardi, A., & Rossi, M. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. **Microbial Cell Factories**, v. 9(73), p. 7–12, 2010.

Amézcuca-Vega, C., Poggi-Varaldo, H.M., Esparza-García, F., Ríos-Leal E. & Rodríguez-Vázquez. R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 237–240, 2007.

Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., & Guebitz, G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 99(8), p. 3051–3056, 2008.

Arbia, W., Adour, L., Amrane, A., & Lounici, H. Food Hydrocolloids Optimization of medium composition for enhanced chitin extraction from *Parapenaeus longirostris* by *Lactobacillus helveticus* using response surface methodology. **Food hydrocolloids**, v. 31(2), p. 392–403, 2013.

Assy, N., Nassar, F., Nasser, G., & Grosovski, M. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15(15), p. 1809–1815, 2009.

Batista, K. a, Bataus, L. A. M., Campos, I. T. N., & Fernandes, K. F. Development of culture medium using extruded bean as a nitrogen source for yeast growth. **Journal of microbiological methods**, p. 1–6, 2013.

Beopoulos, A., Chardot, T., & Nicaud, J.-M. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. **Biochimie**, v. 91(6), p. 692–696, 2009.

Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. **Journal of microbiological methods**, v. 77(1), p. 41–47, 2009.

Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25(3), p. 294–306, 2007.

Chisti, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in biotechnology**, v. 26(3), p. 126–131, 2008.

Christopher, J. L., Danaei, G., Ding, E. L., Mozaffarian, D., Taylor, B., & Ezzati, M.. The Preventable Causes of Death in the United States : Comparative Risk Assessment of Dietary, Lifestyle, and Metabolic Risk Factors. **PLoS Medicine**, v. 6(4), p. 1-23, 2009.

Cui, Y., Blackburn, J. W., & Liang, Y. Fermentation optimization for the production of lipid by *Cryptococcus curvatus*: Use of response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 410–417, 2012.

Daum, G., Wagner, A., Czabany, T., & Athenstaedt, K. Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. **Biochimie**, v. 89, p. 243–248, 2007.

Deak, T., Chen, J., & Beuchat, L. R. Molecular Characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* Isolated from Poultry Molecular Characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66(10), p. 1–6, 2000.

Dey, P., & Maiti, M. K. Molecular characterization of a novel isolate of *Candida tropicalis* for enhanced lipid production. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1–12, 2013.

Fei, Q., Chang, H. N., Shang, L., Choi, J., Kim, N., & Kang, J. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid

accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 102(3), p. 2695–701, 2011.

Fornazzari, I. M., Ribeiro, G., Olegario, T. G., & Terebejzyk, J. Ácido graxo ômega 3 e a saúde humana. **V Semana de Tecnologia em Alimentos**, v. 90(2), p. 01-10, 2007

Francielle, F., Ufc, S., Queiroz, J. De, Ufc, M., Pedro, F., & Fernandes, N. Análise de Superfície de Resposta na Produção de Biodiesel a partir dos Blends do Óleo de Mamona e Babaçu. **IV SEPRONE** – Fortaleza, CE, Brasil, 2009.

Gema, H., Kavadia, a, Dimou, D., Tsagou, V., Komaitis, M., & Aggelis, G. Production of gamma-linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58(3), p. 303–307, 2002.

Gill, C. O., Hall, M. J., & Ratledge, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. **Applied and environmental microbiology**, v. 33(2), p. 231–239, 1977.

Gillingham, L. G., Gustafson, J. A., Han, S., Jassal, D. S., & Jones, P. J. H. High-oleic rapeseed (canola) and flaxseed oils modulate serum lipids and inflammatory biomarkers in hypercholesterolaemic subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 1, p. 417–427, 2011.

Hall, M. J., & Ratledge, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose under various conditions in a one- and two-stage continuous culture. **Applied and environmental microbiology**, v. 33(3), p. 577–584, 1977.

Hosokawa, M., Hou, C. T., & Weisleder, D. Production of Novel Tetrahydroxyfuranyl Fatty Acids from α -Linolenic Acid by *Clavibacter* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69(7), p. 3868–3873, 2003.

Hou, C. T. Production of arachidonic acid and dihomo-gamma-linolenic acid from glycerol by oil-producing filamentous fungi, *Mortierella* in the ARS culture collection. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35(6), p.501–506, 2008.

Iassonova, D.R., Hammond, E.G. and Beattie, S.E. Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerols encapsulated in oleaginous yeast. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 711–716, 2008.

Jang, H.-D., Lin, Y.-Y., & Yang, S. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. **Bioresource technology**, v. 96(15), p. 1633–44, 2005.

Kimura, K., Yamaoka, M., & Kamisaka, Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 331–338, 2004.

Landell, M. F., & Hartfelder, C. Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 49–55, 2006.

Levison, M. E. Effect of Colon Flora and Short-Chain Fatty Acids on Growth In Vitro of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*,. **Infection and immunity**, v. 8(1), p. 30–35, 1973

Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., & Dubois-Calero, N. Biofuels from microalgae. **Biotechnology progress**, v. 24(4), p. 815–820, 2008.

Liu, Z.-Y., Wang, G.-C., & Zhou, B.-C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource technology**, v. 99(11), p. 4717–4722, 2008.

Meka, P. K., Tripathi, V., & Singh, R. P. Synthesis of biodiesel fuel from safflower oil using various reaction parameters. **Journal of oleo science**, v. 56(1), p. 9–12, 2006.

Papanikolaou, S, Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., & Aggelis, G. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58(3), p. 308–312, 2002.

Papanikolaou, Seraphim, & Aggelis, G. Review Article Lipids of oleaginous yeasts . Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, p. 1031–1051, 2011.

Papanikolaou, Seraphim, Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., & Aggelis, G. Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. **Current microbiology**, v. 52(2), p. 134–142, 2006.

Papanikolaou, Seraphim, Komaitis, M., & Aggelis, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. **Bioresource technology**, v. 95(3), p. 287–91, 2004.

Papanikolaou, Seraphim, Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., & Marc, I. Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. **Current microbiology**, v. 46(2), p. 124–30, 2003.

Peng, W., Huang, C., Chen, X., Xiong, L., Chen, X., Chen, Y., & Ma, L. Microbial conversion of wastewater from butanol fermentation to microbial oil by oleaginous yeast *Trichosporon dermatis*. **Renewable Energy**, v. 55, p. 31–34, 2013.

Petschow, B. W., Batema, R. P., & Ford, L. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40(2), p. 302–6, 1996.

Poli, J. S., Dallé, P., Senter, L., Mendes, S., Ramirez, M., Vainstein, M. H., & Valente, P. Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. **Revista brasileira de Biociências**, v. 11(2), p. 203–208, 2013

Ratledge, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, p. 807–815, 2004.

Rinaldi, R., Garcia, C., Marciniuk, L. L., Vitorino, A., & Schuchardt, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 30(5), p. 1374-1380, 2007.

Rosa, P. D., Mattanna, P., Carboni, D., Amorim, L., Richards, N., & Valente, P. *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. **Folia Microbiologica**, v. 59 (3), p 1-9, 2014.

Santos, S. S., Lorenzoni, A., Pegoraro, N. S., Denardi, L. B., Alves, S. H., Schaffazick, S. R., & Cruz, L. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal

delivery of clotrimazole. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 270–276 , 2014.

Schneider T., Graeff-hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W. & Pham, P. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, v. 30, p. 1-10, 2013

Shareck, J., Nantel, A., & Belhumeur, P. Conjugated linoleic acid inhibits hyphal growth in *Candida albicans* by modulating Ras1p cellular levels and downregulating TEC1 expression. **Eukaryotic cell**, v. 10(4), p. 565–77, 2011

Sheu, C. W., & Freese, E. Lipopolysaccharide layer protection of gram-negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids. **Journal of bacteriology**, v. 115(3), p.869–75, 1973.

Smith, V. J., Desbois, A. P., & Dyrinda, E. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. **Marine drugs**, v. 8(4), p. 1213–62, 2010.

Souza, P. H. M.; Souza Neto, M. H.; & Maia, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**, v. 37(2), p. 127-135, 2003.

Stroescu, M., Stoica-guzun, A., Ghergu, S., Chira, N., & Jipa, I. Optimization of fatty acids extraction from *Portulaca oleracea* seed using response surface methodology. **Industrial Crops & Products**, v. 43, p. 405–411, 2013.

Suarez P., Meneghetti S., & Meneghetti M. Transformação de triglicerídeos em combustíveis materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30(3), p. 667-676, 2007.

Taha, E. M., Omar, O., Mohtar, W., Yusoff, W., & Hamid, A. Lipid biosynthesis in *Cunninghamella bainieri* 2A1 in N-limited and N-excess media. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 615–622, 2010.

Tai, M., & Stephanopoulos, G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 1–9, 2013.

Vasudevan, P. T., & Briggs, M. Biodiesel production--current state of the art and challenges. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35(5), p. 421–30, 2008.

Wolinski, H., Kolb, D., Hermann, S., Koning, R. I., & Kohlwein, S. D. (2011). A role for seipin in lipid droplet dynamics and inheritance in yeast. **Journal of Cell Science**, v. 124, p. 3894–3904, 2011.

Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., & Zhao, Z. K. Bioresource Technology Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. **Bioresource Technology**, v. 102(2), p. 1803–1807, 2011.

Wynn JP, Hamid ABA, Ratledge C. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. **Microbiology**, v. 145, p.1911–1917, 1999.

Xiong, W., Li, X., Xiang, J., & Wu, Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. **Applied microbiology and biotechnology**, v.78(1), p. 29–36, 2008.

Zhang, L., Critzer, F., Davidson, P. M., & Zhong, Q. Formulating essential oil microemulsions as washing solutions for organic fresh produce production. **Food Chemistry**, v. 165, p. 113–118, 2014.

Zhu, L. Y., Zong, M. H., & Wu, H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. **Bioresource technology**, v. 99(16), p. 7881–5, 2008.