

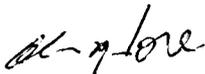
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA COMPOSIÇÃO**  
**DE ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS PELAS LEVEDURAS**  
***Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae***

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ENILENE DE FRANÇA CORDEIRO e aprovada pela Comissão Julgadora em 07 de novembro de 1997.

Campinas, 07 de novembro de 1997.



Profa. Dra. GLAUCIA M. PASTORE  
Presidente da Banca

**Enilene de França Cordeiro**

**Engenheira de Alimentos**

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gláucia Maria Pastore**

**Orientadora**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências dos Alimentos.

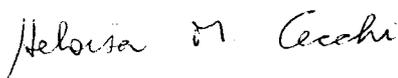
1997



## BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup>. Dra. Gláucia Maria Pastore  
(orientadora)



Prof<sup>a</sup>. Dra. Heloísa Mascia Cecchi  
(membro)



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho  
(membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira  
(membro)

Campinas,

de

de 1997

*Agradeço à Deus*

*É melhor tentar falhar,  
Que em vão preocupar-se,  
... E não ver a vida passar.  
É melhor tentar...  
Ainda em vão,  
Que sentar-se...  
Fazendo nada até o final.  
Martin Lutter King*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dra. Gláucia Maria Pastore pela amizade e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Heloísa Mascia Cecchi e ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho pelas correções e sugestões.

Aos funcionários Paulo e Dora pelo auxílio durante a realização experimental desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica pela amizade e convivência profissional.

Aos amigos que durante esse tempo se tornaram minha família. Em especial ao Marcílio Barbosa, Ângela Vitória, Cláudia Martins, Manuela da Silva, Ludwig, Walfrido Svoboda, Cáthia Pizetta, Marcelo Corrêia, Regilda, Viviane, Márcia Tiba, Jairo Agostini, Graziela Pestana...

À Patrícia Carvalho pelas sugestões e apoio durante toda a parte experimental.

Ao Freiria que muito contribuiu com seus conhecimentos e sugestões.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

# ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	x
SUMMARY .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Lipídeos em Leveduras.....	3
2.2 Fatores que influenciam na composição de lipídeos .....	6
2.3 Extração e análise de lipídeos.....	24
2.4 Bioquímica de acumulação de lipídeos.....	25
2.5 Aplicação .....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Materiais .....	37
3.1.1 Reagentes e materiais específicos .....	37
3.1.2 Equipamentos .....	38
3.2 Métodos .....	38
3.2.1 Coleta, isolamentos e seleção de microrganismos como potencial produtor de ácidos graxos insaturados..	38
3.2.1.1 Coleta de amostras .....	38
3.2.1.2 Isolamento de microrganismos .....	39

3.2.1.3 Seleção preliminar de microrganismos produtores de ácidos graxos poliinsaturados .....	39
3.2.1.4 Padronização do inóculo .....	40
3.2.2 Extração e determinação do teor de lipídeos totais .....	40
3.2.3 Preparação de ésteres metílicos dos ácidos graxos .....	40
3.2.4 Determinação do peso seco da biomassa .....	41
3.2.5 Análise da composição de ácidos graxos por cromatografia em camada delgada (TLC) .....	42
3.2.6 Análise da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa .....	42
3.2.7 Estudo das condições de fermentação para obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos, da quantificação da biomassa, do teor de lipídeos totais e da porcentagem de lipídeos na massa seca .....	43
3.2.7.1 Efeito da composição do meio de cultura na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos .....	43
3.2.7.2 Efeito de diferentes fontes de carbono na obtenção dos lipídeos totais, biomassa, porcentagem de lipídeos na massa seca e perfil cromatográfico dos ácidos graxos .....	44
3.2.7.3 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na obtenção dos lipídeos totais, biomassa, porcentagem de lipídeos na massa seca e perfil cromatográfico dos ácidos graxos..	44
3.2.7.4 Efeito da taxa carbono: nitrogênio (C:N) na obtenção dos lipídeos totais, biomassa, porcentagem de lipídeos na massa seca e perfil cromatográfico dos ácidos graxos .....	45
3.2.7.5 Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos .....	45
3.2.8 Identificação das linhagens .....	46
3.2.9 determinação da glicose residual no meio de cultura .....	46

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.1 Isolamento de microrganismos .....	47
4.2 Seleção de microrganismos .....	48
4.3 Identificação das linhagens selecionadas .....	51
4.3.1 Características morfológicas da levedura <i>Candida fabianii</i> .....	51
4.3.2 Características morfológicas da levedura <i>Trichosporon                   brassicae</i> .....	52
4.4 Análise da composição de ácidos graxos presentes nos lipídeos obtidos das linhagens selecionadas .....	53
4.5 Determinação do teor de lipídeos totais, biomassa seca e porcentagem de lipídeos na biomassa seca das leveduras selecionadas.....	55
4.6 Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos das linhagens selecionadas .....	56
4.7 Efeito da composição do meio de cultura no perfil cromatográfico dos ácidos graxos.....	60
4.8 Estudo da curva de crescimento das linhagens selecionadas.....	68
4.9 Estudo da influência de diferentes fontes de carbono no perfil cromatográfico dos ácidos graxos.....	69
4.10 Estudo da influência de diferentes fontes de carbono na obtenção de lipídeos totais, biomassa seca e porcentagem de lipídeos na biomassa seca.....	75
4.11 Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos.....	77
4.12 Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na obtenção de lipídeos totais, biomassa seca e porcentagem de lipídeos na biomassa seca.....	80
4.13 Estudo da influência de diferentes taxas C:N (carbono:nitrogênio) na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos.....	83

4.14 Estudo da influência de diferentes taxas C:N (carbono:nitrogênio) na obtenção de lipídeos totais, biomassa seca e porcentagem de lipídeos na biomassa seca.....	87
4.15 Estudo da influência do tempo de crescimento no teor de lipídeos e no teor de glicose residual no meio de cultura .....	90
5. CONCLUSÕES .....	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Exemplos de leveduras oleaginosas .....	6
Tabela 2- Efeito da temperatura na composição de ácidos graxos de vários microrganismos .....	18
Tabela 3- Efeito da taxa de oxigênio na composição de ácidos graxos de diferentes leveduras .....	23
Tabela 4- Composição de ácidos graxos em ordem decrescente de proporção .....	54
Tabela 5- Teor de lipídeos totais, biomassa seca e porcentagem de lipídeos na biomassa seca das leveduras selecionadas	55
Tabela 6- Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura <i>Candida fabianii</i> .....	58
Tabela 7- Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura <i>Trichosporon brassicae</i> .....	58
Tabela 8- Efeito da composição do meio de cultura na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura <i>Candida fabianii</i> .	61
Tabela 9 - Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura <i>Trichosporon brassicae</i> .....	62
Tabela 10 - Influência de Diferentes fontes de carbono na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Candida fabianii</i> .....	72

Tabela 11 - Influência de Diferentes fontes de carbono na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Trichosporon brassicae</i> .....	73
Tabela 12- Influência de Diferentes fontes de nitrogênio na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Candida fabianii</i> .....	78
Tabela 13 - Influência de Diferentes fontes de nitrogênio na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Trichosporon brassicae</i> .....	78
Tabela 14 - Influência de Diferentes Relação C : N na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Candida fabianii</i> .....	85
Tabela 15 - Influência de Diferentes Relação C : N na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Trichosporon brassicae</i> .....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Fluxograma da seleção de microrganismos produtores de ácidos graxos.....	50
Figura 2- Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura <i>Candida fabianii</i> .....	59
Figura 3- Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura <i>Trichosporon brassicae</i> . ....	59
Figura 4- Efeito da composição do meio de cultura na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura <i>Candida fabianii</i> ..	62
Figura 5- Composição de ácidos graxos da linhagem <i>Candida fabianii</i> obtida por cromatografia gasosa, em diferentes condições de incubação.....	64/65
Figura 6- Efeito da composição do meio de cultura na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura <i>Trichosporon brassicae</i> .....	63
Figura 7- Composição de ácidos graxos da linhagem <i>Trichosporon brassicae</i> obtida por cromatografia gasosa, em diferentes condições de incubação.....	66/67
Figura 8- Estudo da Influência do tempo de fermentação na concentração de biomassa seca por <i>Candida fabianii</i> .....	68
Figura 9- Estudo da Influência do tempo de fermentação na concentração de biomassa seca por <i>Trichosporon brassicae</i> .....	69
Figura 10- Estudo da Influência de diferentes fontes de carbono na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Candida fabianii</i>	73

Figura 11- Estudo da Influência de diferentes fontes de carbono na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Trichosporon brassicae</i> .....	74
Figura 12- Estudo comparativo da Influência de diferentes fontes de carbono na composição de ácido oléico.....	74
Figura 13- Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de carbono na produção de lipídeos.....	75
Figura 14- Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de carbono na produção de biomassa.....	76
Figura 15- Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de carbono na % de lipídeos na biomassa seca.....	76
Figura 16- Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Cândida fabianii</i>	79
Figura 17- Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Trichosporon brassicae</i> .....	79
Figura 18- Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na composição de ácido oléico.....	80
Figura 19- Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de lipídeos.....	82
Figura 20- Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de biomassa.....	82
Figura 21- Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na % de lipídeos na biomassa seca.....	83
Figura 22- Estudo da Influência de diferentes relação C:N na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Cândida fabianii</i> .	86
Figura 23- Estudo da Influência de diferentes relação C:N na composição de ácidos graxos produzidos por <i>Trichosporon brassicae</i> .....	86

Figura 24- Estudo comparativo da influência de diferentes relação C:N na composição de ácido oléico.....	87
Figura 25- Estudo comparativo da influência de diferentes taxas C:N na produção de lipídeos. ....	88
Figura 26- Estudo comparativo da influência de diferentes taxas C:N na produção de biomassa.....	89
Figura 27- Estudo comparativo da influência de diferentes taxas C:N na porcentagem de lipídeos na biomassa seca. ....	89
Figura 28- Estudo da influência do tempo de fermentação na concentração de glicose residual por <i>Candida fabianii</i> .....	90
Figura 29- Estudo da Influência do tempo de fermentação na massa de lipídeos totais na levedura <i>Candida fabianii</i> . ....	91
Figura 30- Estudo da influência do tempo de fermentação na concentração de glicose residual por <i>Trichosporon brassicae</i> ...	91
Figura 31- Estudo da influência do tempo de fermentação na massa de lipídeos totais pela levedura <i>Trichosporon brassicae</i> .....	92

## RESUMO

Foram isoladas 625 linhagens de microrganismos, a partir de amostras de vísceras de peixes de água salgada. Duas linhagens de microrganismos selecionadas, *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae*, foram submetidas à diferentes condições de cultivo. A partir de variações na composição do meio de cultura e das condições de cultivo, tais como temperatura, tempo de fermentação, fonte de carbono, fonte de nitrogênio e relação C:N; foram estudadas as variações na composição dos ácidos graxos. Os parâmetros de comparação utilizados durante este estudo,

foram a quantificação da massa celular, da massa de lipídeos e o teor de lipídeos na biomassa seca, bem como a composição de ácidos graxos. Entre os ácidos graxos produzidos, foram identificados os ácidos palmítico (16:0), palmitoléico (16:1), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolênico (18:3). Este estudo demonstrou que, mudanças nas condições de cultivo das leveduras provocam alterações significativas na composição e na quantidade dos ácidos graxos produzidos, indicando que as condições de cultivo podem ser adequadas em função do interesse na produção de cada ácido graxo específico.

## SUMMARY

Six hundred and twenty-five microorganisms were isolated from intestines samples of sea fishes. Two selected microorganism strains, *Candida fabianii* and *Trichosporon brassicae*, were submitted to different growth conditions. From the variations of media composition, temperature, time course, carbon and nitrogen sources and C:N ratio; it was studied the variation on the fatty acids composition. Among the fatty acids produced the following acids were identified : oleic, linoleic, palmitic, stearic, palmitoleic and linolenic. This study showed significant changes on the fatty acid composition when the culture conditions were modified. It indicates that, according to the interest on the production of specific fatty acids, proper growth conditions shall be applied.

# 1. INTRODUÇÃO

Microrganismos, particularmente bactérias e leveduras, são atrativos como sistemas experimentais de pesquisa devido à sua relativa simplicidade, rapidez de crescimento, facilidade de transformação genética e sua habilidade em usar uma ampla variedade de substratos na síntese de produtos. Esses atributos fazem dos microrganismos excelentes candidatos para o estudo de lipídeos e sua biossíntese.

A pesquisa sobre lipídeos de microrganismos serve como base para a identificação e exploração de oportunidades biotecnológicas. Essas oportunidades incluem o desenvolvimento de produtos economicamente competitivos com funcionalidade superior, novos processos, novas aplicações e principalmente novos produtos.

Os microrganismos não devem apenas produzir grandes quantidades de lipídeos, mas também devem produzi-los de forma apropriada, possuir distribuição de ácidos graxos desejáveis e devem ser aceitáveis como componentes de alimentos. Os lipídeos intracelulares são produtos que estão disponíveis em uma grande quantidade de células microbianas e que podem chegar à até 65% da biomassa seca de algumas espécies de leveduras.

A demanda por óleos e gorduras vem aumentando tanto para a indústria de alimentos quanto para propósitos não comestíveis. O interesse em microrganismos produtores de lipídeos como substituintes para gordura de origem animal e vegetal resultou em numerosas investigações, uma vez que os lipídeos de microrganismos tem importantes características. Seus ácidos graxos tem aproximadamente a mesma distribuição e proporções relativas. Eles podem crescer razoavelmente bem em substratos de baixo custo, sub-produtos da indústria de alimentos e agroindústria. Seus lipídeos podem ser produzidos rapidamente em reatores de grande capacidade num tempo menor do que o tempo requerido na prática agroindustrial.

O uso de técnicas de cultura contínua, para minimizar os custos de

produção, deve ser levado em consideração em todo o processo econômico. A habilidade dessas leveduras em produzir um óleo de boa qualidade, a partir de uma seleção de vários substratos indica o potencial econômico do processo de utilização de leveduras.

Contudo, normalmente a habilidade para catalisar um substrato precursor para um componente lipídico desejável é limitado. O aumento da produtividade de um componente lipídico específico requer o controle do metabolismo enzimático. Este controle pode ser exercido por estimulação ou inibição de rotas metabólicas sob condições otimizadas de crescimento na presença de grandes quantidades de precursores ou substratos disponíveis.

Todos os estudos resultam em entender melhor a bioquímica de acumulação de lipídeos em microrganismos e a influência de várias condições de cultivo na produção de lipídeos. O grande desafio da Biotecnologia de produção de lipídeos é identificar, formas economicamente viáveis de aplicação desta tecnologia na indústria de alimentos.

Esse trabalho teve por objetivo a seleção de microrganismos capazes de produzir ácidos graxos insaturados, bem como a identificação e avaliação do efeito das condições de fermentação (diferentes composições de meios de cultura, tempo de cultivo, temperatura de cultivo, diferentes fontes de carbono, nitrogênio e taxa C:N) sobre a composição desses ácidos graxos. Finalmente procedeu-se à comparação do perfil de ácidos graxos produzidos pelos dois gêneros de leveduras selecionadas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Lipídeos em Leveduras

Lipídeos intracelulares de microrganismos consistem principalmente de: monoglicerídeos, diglicerídeos, triacilgliceróis, fosfolipídeos, esteróis, terpenos, carotenóides, tocoferóis, vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos livres. Eles fazem parte dos produtos do metabolismo primário. Triacilgliceróis e ácidos graxos são os principais componentes dos lipídeos de interesse industrial e são encontrados como constituintes de gorduras nas células cultivadas em condições de nitrogênio limite como, por exemplo, em muitas espécies de *Candida* (THORPE & RATLEDGE, 1972 e GILL *et al.*1977) e certas linhagens de *Lipomyces* (PITRYUK *et al.*1975) e *Rhodotorula* (YOON & RHEE, 1983). Fosfolipídeos predominam em linhagens não produtoras de lipídeos, como por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* (ILLINGWORTH, 1973).

Fosfolipídeos, como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol, são usualmente o segundo componente encontrado em maior quantidade nos lipídeos de leveduras (KANEKO *et al.* 1976).

Ácido oleico é o ácido graxo predominante em leveduras oleaginosas, embora haja algumas exceções. Ácido palmítico é o segundo ácido graxo mais abundante e o ácido linoléico o terceiro. O ácido linolênico pode ser detectado em quantidades menores. O triacilglicerol mais abundante encontrado em leveduras é do tipo SUS(saturado, insaturado e saturado) e SUU(saturado, insaturado e insaturado). Os ácidos graxos saturados encontrados são ácido palmítico e esteárico em pequenas quantidades, o ácido insaturado mais encontrado é o oleico, embora possa encontrar algum ácido monoinsaturado ou poliinsaturado (RATLEDGE, 1982) .

Ácidos graxos de cadeia curta (C14:0 e C12:0) ocorrem em pequenas porcentagens, embora (WATANABE, 1975) tenha encontrado 6% de ácido graxo

C12:0 em uma linhagem de *Lipomyces sp.* cultivada em meio contendo xilose.

Ácidos graxos de cadeia longa (C20:0 e C22:0) juntos com alguns ácidos graxos monoinsaturados de mesmo comprimento de cadeia podem, em alguns casos, ser detectados em pequenas quantidades. Até 10% do total de ácidos graxos podem ser constituídos pelo ácido palmitoléico.

Estas evidências demonstram que os lipídeos de leveduras assemelham-se aos lipídeos de plantas, pois ambos possuem alto conteúdo de triacilgliceróis, os mesmos ácidos graxos e a mesma distribuição estereoespecífica dos triacilgliceróis. Quando a distribuição de ácidos graxos na molécula de glicerol é examinada, os óleos de plantas são caracterizados pela quase ausência de ácidos saturados na posição 2 da molécula de glicerol. Isto também pode ser observado em diferentes leveduras (RATLEDGE, 1982)

Nos microrganismos os lipídeos são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. Entretanto o acúmulo de gordura em muitos microrganismos não está relacionado com a fonte de nutriente (TURCOTTE & KOSARIC, 1989). A composição de lipídeos, qualidade e quantidade variam de espécie para espécie de acordo com o estágio de crescimento, disponibilidade de nutrientes essenciais e condições de fermentação no reator.

O nitrogênio foi reconhecido como nutriente limite para leveduras oleaginosas (YOON & RHEE, 1983). Como por exemplo, a levedura *Cryptococcus albidus* var. *albidus* estudada por HANSSON & DOSTÁLEK (1986) que produziu 25% de lipídeos em meio rico em nitrogênio, enquanto que em condições de nitrogênio limite o conteúdo de lipídeos alcançou 32%.

A ausência de fosfatos, sulfatos e ferro também induz a formação de lipídeos na levedura *Rhodotorula Gracilis* (MAAS-FORSTER, 1955). Mas, nem todos os organismos irão acumular lipídeos se um ou outro nutriente se tornar escasso. O autor sugere que a máxima formação de lipídeos a partir de um balanço otimizado de nutrientes é característica de organismos lipogênicos.

Os lipídeos que se acumulam dentro de várias células de leveduras oleaginosas estão presentes na forma de glóbulos. O óleo isolado dos glóbulos de *Lipomyces starkeyi* apresentou em sua composição 88% de triacilglicerol (UZUKA *et al.* 1975). Em *Saccharomyces cerevisiae*, os triacilgliceróis foram os constituintes encontrados em menor quantidade nos óleos dessa levedura (CHRISTIANSEN, 1978). Isso demonstra uma diferença na constituição dos lipídeos entre espécies de leveduras oleaginosas e não oleaginosas.

O número de leveduras oleaginosas é pequeno em relação ao número total de espécies. Algumas linhagens produtoras de lipídeos estão listadas na tabela 1.

Tabela 01- Exemplos de leveduras Oleaginosas

	Lipídeos totais / Biomassa seca (%p/p)
<i>Candida curvata D</i>	58
<i>Candida curvata R</i>	51
<i>Candida lipolytica</i>	36
<i>Candida paralipolytica</i>	32
<i>Candida sp.107</i>	42
<i>Endomycopsis vernalis</i>	65
<i>Lipomyces starkeyi</i>	37
<i>Rhodospiridium toruloides IFO 0413</i>	66
<i>Trichosporon cutaneum</i>	45

Fonte: (RATLEDGE, 1982)

## 2.2 - Fatores que influenciam na composição de lipídeos

THORPE & RATLEDGE (1972) estudaram a distribuição de triglicerídeos em duas leveduras cultivadas em glicose e n-alcanos. Quando *Candida* 107 e *C. tropicalis* cresceram em meio com n-alcanos do tipo C<sub>12</sub> e C<sub>16</sub> a composição de ácidos graxos variou de acordo com o comprimento da cadeia do substrato, embora com n-tridecano a levedura não tenha produzido ácido tridecanóico e com n-dodecano apenas *C.tropicalis* tenha apresentado uma significativa quantidade de ácido dodecanóico.

O conteúdo de lipídeos e a proporção de triacilgliceróis foi mais baixo nas leveduras cultivadas em n-alcanos do que naquelas crescidas em glicose.

Os ácidos graxos saturados foram localizados na posição dois do triacilglicerol de *Candida* 107 que produziu 46% de triacilglicerol quando crescida em n-tetradecano. O aumento dos fosfolipídeos em leveduras crescidas em n-alcanos é maior do que o observado quando o crescimento é realizado em um meio contendo glicose. Isto reflete provavelmente diferenças na estrutura da membrana. Leveduras crescidas em alcanos tem uma profunda invaginação na membrana citoplasmática e uma maior quantidade de fosfolipídeos é necessária para manter essa integridade. A variação na composição de ácidos graxos em leveduras crescidas em n-alcanos pode ser devido a necessidade de produzir triacilgliceróis com propriedades fisiológicas aceitáveis como por exemplo ponto de fusão, estrutura cristalina e solubilidade. A principal vantagem de usar n-alcanos como substrato para leveduras, está relacionado com a biossíntese específica de ácidos graxos do que com a produção de triacilgliceróis semelhante aos de origem vegetal.

HALL & RATLEDGE (1977) estudaram a acumulação de lipídeos e composição de ácidos graxos em *Candida* 107 usando sistema de cultura contínuo em duplo estágio onde: no primeiro estágio o crescimento ocorre sem acumulação de lipídeos e o meio é com carbono limite; no segundo estágio a acumulação de lipídeos foi estimulada apenas por alimentação com glicose como um nutriente extra permitindo a levedura crescer no meio com nitrogênio limite.

Variando as condições apenas no segundo estágio foi verificado se havia alguma alteração na acumulação de lipídeos e ao mesmo tempo se as mesmas variáveis produziam efeito semelhante quando a acumulação de lipídeos ocorria num sistema de cultivo contínuo em estágio simples. A composição de ácidos graxos não foi significativamente alterada em nenhum dos dois sistemas de cultivo mesmo com mudanças na temperatura de crescimento, taxa de aeração, pH e tempo de residência da levedura no segundo reator.

No sistema de cultivo contínuo em duplo estágio a fase de acumulação de lipídeos pode ser separada da fase de crescimento. Isto não ofereceu vantagens práticas quando comparado ao sistema de estágio simples para produção de lipídeos de microrganismos.

GILL *et al.* (1977) estudaram a acumulação de lipídeos em *Candida* 107 em meio de cultivo com carbono, nitrogênio, fosfato e magnésio limite. Com nitrogênio limite houve um aumento na eficiência de converter o substrato em lipídeos. O crescimento com carbono limite apresentou um alto conteúdo de lipídeos e o grau de insaturação dos ácidos graxos diminuiu. Com nitrogênio limite o grau de insaturação dos ácidos graxos aumentou. Quando o magnésio foi um nutriente limite, houve um aumento considerável na proporção de ácido mirístico produzido. Em todos os casos, a proporção dos ácidos graxos linoléico e oléico variaram em direções opostas.

YOON *et al.* (1982) estudaram o efeito da fonte de carbono e nitrogênio na produção de lipídeos de *Rhodotorula gracilis*. Entre as fontes de nitrogênio testadas, o extrato de levedura, peptona,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , asparagina e  $\text{KNO}_3$  foram os que apresentaram maior conteúdo de lipídeos. As fontes de carbono glicose, sacarose, maltose, xilose, celobiose, lactose, palha de arroz e palha de arroz sacarificada foram avaliadas na síntese de lipídeos usando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e a mesma taxa C:N. Foi concluído que a produção de lipídeos foi maior quando a fonte de carbono usada foi a glicose, seguida da sacarose, maltose, xilose e celobiose. Os autores sugerem que hidrolisados agrícolas de celulose que contém quantidades de pentoses como, xilose e celobiose, podem ser utilizados como material barato para a síntese de

lipídeos por microrganismos.

YOON, S.M. & RHEE, J.S. (1983) estudaram o efeito das condições de cultivo na produção de lipídeos da levedura *Rhodotorula glutinis*. A levedura foi cultivada em sistema contínuo e em batelada, sob condições de nitrogênio e carbono limite. Em cultura contínua sob condições de nitrogênio limite, a concentração de biomassa e o conteúdo de lipídeos diminuíram. Contudo, nas condições de carbono limite, o conteúdo de lipídeos não mudou significativamente, indicando que o conteúdo de lipídeo celular corresponde apenas aos lipídeos estruturais e funcionais, não havendo acumulação de lipídeos. Através de cromatografia em camada delgada, foi feito um fracionamento dos lipídeos em lipídeos neutros, glico e fosfolipídeos.

Foi observado que em condições de nitrogênio limite, há um aumento dos lipídeos neutros e uma diminuição da porção glico e fosfolipídica. Em condições de carbono limite, os lipídeos neutros diminuem e a porção glico e fosfolipídica aumenta com o aumento da diluição. Em condições de nitrogênio e carbono limite, o grau de insaturação dos lipídeos neutros e glicolipídeos variou significativamente. O grau de insaturação em culturas com carbono limite foi maior do que em culturas com nitrogênio limite. As condições de cultivo alteram a produtividade e as características dos lipídeos de *Rhodotorula glutinis*.

EVANS & RATLEDGE (1983) estudaram o crescimento da levedura oleaginosa *Candida curvata D* em sistema de cultivo contínuo e em batelada com cinco diferentes fontes de carbono (sacarose, lactose, glicose, xilose e etanol) para comparar a eficiência da produção de lipídeos em diferentes substratos. A máxima acumulação de lipídeos ocorreu em cultivo em batelada com xilose como fonte de carbono. A maior concentração de biomassa e maior produção de lipídeos foi alcançada em sistema contínuo usando lactose como fonte de carbono. A proporção relativa dos ácidos graxos mais abundantes (16:0, 18:0, 18:1, 18:2) encontrados nos lipídeos diminuiu consideravelmente em cultura em batelada e em cultura contínua sob condições de carbono limite. A composição dos ácidos graxos no meio com nitrogênio limite permaneceu constante. A porcentagem de ácido esteárico aumentou enquanto que a porcentagem de ácido

linoléico diminuiu quando os lipídeos foram provenientes de células crescidas em meio contendo xilose. Os lipídeos de células crescidas em etanol apresentaram elevados níveis de ácido oléico e pouco ácido palmítico. A lactose foi a mais efetiva fonte de carbono para produção de biomassa, a xilose foi a mais eficiente para produção de lipídeos e o etanol foi a fonte de carbono menos eficiente tanto para produção de biomassa quanto para produção de lipídeos.

YOON, S.M. & RHEE, J.S. (1983) estudaram a produção de lipídeos pela levedura *Rhodotorula glutinis* em sistema de cultura contínua em condições de nitrogênio e carbono limite visando determinar a relação entre crescimento e produção de lipídeos. A composição do meio sintético usado para a cultura de carbono limite foi 0,02% de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,15% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,7% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,05% de extrato de levedura, 0,3% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 1,5% de glicose. Para o nitrogênio limite a composição foi a mesma, com exceção da glicose, 3,5% e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1%. As células foram cultivadas por 50 horas, a 30°C, com pH 5,5 e com aeração de 2L/min. Foi observado que em cultura contínua, os valores da concentração da biomassa e o percentual de lipídeos aumentaram tanto para as condições de nitrogênio limite quanto para as condições de carbono limite. Com relação ao consumo de nitrogênio nas condições de carbono e nitrogênio limite, houve um aumento da biomassa devido a proliferação celular sem acumulação de lipídeos. Com relação ao consumo de oxigênio para o crescimento, foi observado que o oxigênio foi mais requerido em cultura com carbono limite do que em cultura com nitrogênio limite.

Os autores concluíram que os estudos em *Rhodotorula glutinis* usando cultivo em batelada e contínuo têm demonstrado que as condições ótimas para o crescimento celular são diferentes das condições ótimas para acumulação de lipídeos.

O efeito da fonte de nitrogênio  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , asparagina e glutamato foi estudada por EVANS & RATLEDGE (1984) em 17 espécies de leveduras. Eles observaram que um pequeno número de espécies mostrou uma variação no conteúdo de lipídeos e apenas uma linhagem, *Rhodosporidium toruloides*, mostrou diferença significativa. Eles observaram que, *Rhodosporidium Toruloides* CBS 14,

acumulava maior quantidade de lipídeos quando crescida na presença de uréia, treonina, aspartato, asparagina, glutamato, e arginina do que quando crescida na presença de nitrogênio inorgânico ou em misturas do tipo orgânico e inorgânico.

LENA HANSSON & MILAN DOSTALEK (1986) estudaram a influência das condições de cultivo na composição de ácidos graxos dos lipídeos produzidos pela levedura *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. A influência das diferentes fontes de carbono (xilose, glicose, maltose, lactose, amido, manitol, glicerol e etanol) na composição de ácidos graxos foi investigada sob condições de nitrogênio limite. A levedura foi capaz de usar todas as fontes de carbono para crescimento, exceto o etanol, onde não houve crescimento, e o glicerol, onde o crescimento foi desprezível. Não houve mudança significativa na composição de ácidos graxos, nem no grau de insaturação com as diferentes fontes de carbono. Na levedura *Cryptococcus albidus* var. *albidus* foi observado o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (NH<sub>4</sub>Cl, sulfato de amônio, uréia, L-glutamato, L-arginina, L-ornitina e L-prolina) na composição de ácidos graxos com glicose como fonte de carbono. Foi observado que a quantidade de ácido esteárico (18:0) foi menor quando as células cresceram em fontes inorgânicas. Quando as células foram crescidas em L-argina, L-ornitina houve uma diminuição na quantidade de ácido palmítico (16:0) e um aumento na quantidade de ácido linoléico (18:2). A síntese de ácidos graxos dessa levedura resulta principalmente na formação de ácido palmítico e em menor proporção de ácido esteárico (18:0), como também ácido oléico (18:1) e linoléico. Entretanto, o grau de insaturação foi o mesmo em todas as condições testadas.

A eficiência de várias leveduras em converter diferentes fontes de carbono para SCO (single cell oil) ou SCP (single cell protein) já é bem conhecida. A lactose, o principal nutriente do soro de queijo pode ser mais economicamente utilizado pela levedura *Trichosporon beigelli* na conversão de SCO e SCO. Com isso, TAHOUN *et al.* (1987) estudaram a utilização da lactose do soro de queijo para a produção de biomassa e lipídeo por essa levedura, bem como o efeito da idade da cultura na produção de lipídeos e na composição de ácidos graxos. Essa levedura produz alta quantidade de biomassa quando crescida em soro de queijo com uma taxa carbono : nitrogênio de 30:1. Por

outro lado, o meio com a taxa carbono e nitrogênio limitante (2:1) aumentou a síntese de ácidos graxos insaturados. O máximo de crescimento foi alcançado em 12 dias de cultivo no meio com nitrogênio limitante. Os triacilgliceróis nesse meio contém altas quantidades de ácido oléico e linoléico. A idade da cultura aumentou a quantidade de ácidos graxos insaturados. Essa levedura converte eficientemente a lactose do soro dessalinizado em biomassa. Com soro integral, a lactose foi assimilada para SCO. A levedura produziu maior quantidade de lipídeos quando crescida em soro de queijo do que usando a lactose quimicamente pura como fonte de carbono.

JACOB (1988) estudou quatro espécies de levedura do gênero *Rhodotorula*, *R. gracilis*, *R. glutinis*, *R. rubra* e uma não identificada, quanto a capacidade de produzir lipídeos. Foi utilizado um meio de cultura composto de 40g/l de glicose, 1,0g/L de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ; 1g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g/L NaCl; 1,0g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,005g/L de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5g/L de extrato de levedura e pH 5,5. As linhagens foram incubadas a 28°C por 96 horas em agitador rotatório de 250 rpm. Os lipídeos foram extraídos através do método de Soxhlet, usando éter de petróleo como solvente. *R. gracilis* apresentou maior percentagem de conteúdo de lipídeos, mostrando ser um potencial produtor. A síntese de lipídeos em microrganismos depende principalmente da razão C:N e do balanço dos elementos como hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e potássio. Por isso, foi feita uma otimização no processo de fermentação com relação a composição do meio de crescimento. Foram testados três fontes de nitrogênio: uréia,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Houve diminuição da biomassa com uréia, enquanto que para  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a biomassa aumentou e o percentual de lipídeo diminuiu. A razão C:N de 65:1 foi que mostrou uma alta produção de biomassa e lipídeos. Foi concluído que, as concentrações ótimas para a produção de lipídeos por *R. glutinis* são 0,4g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 0,75g/l para  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , condição esta que assegurou a completa assimilação de açúcar. NaCl e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  não aumentaram a produção de lipídeos. Dessa forma, foi preparado um meio seletivo com concentrações ótimas de diferentes componentes com pH 5,0, aumentando a produção de lipídeos de *R. gracilis* em mais que 65%.

YKEMA *et al.* (1988) analisaram a produção de lipídeos em uma levedura oleaginosa *Apiotrichum curvatum* usando como meio de cultivo permeato de soro para determinar as condições ótimas de operação. Estudos da influência da taxa carbono:nitrogênio no meio de crescimento para produção de lipídeos em culturas contínua demonstraram que os lipídeos celulares contidos nesse meio permaneceram constante quando a taxa C:N foi 25. Foi concluído que a máxima produção de lipídeos foi obtida em uma taxa C:N de 30-35 em permeato de soro. A produção de lipídeos dessa levedura foi analisada de quatro modos: cultivo em batelada, retroalimentação, contínuo e reciclagem parcial de culturas. A alta produção de lipídeos foi alcançada no sistema de reciclagem parcial de culturas por apresentar alta densidade de células. Usando essa técnica de cultivo a produção de lipídeos pode ser alcançada quando o suprimento de oxigênio for otimizado.

TURCOTTE & KOSARIC (1989) estudaram o efeito da razão C:N no meio de crescimento para a produção e distribuição de ácidos graxos em lipídeos sintetizados pela levedura *Rhodospiridium toruloides* ATCC10788. As células foram crescidas em agitador rotatório por 6 dias à 30°C em meio composto de 0,314g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2,0g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 7g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5g/l de extrato de levedura e 35,0g/l de glicose. As taxas de carbono:nitrogênio usadas foram 77,16 e 55 a 99 e 99 a 121. Com relação C:N 121 foi observada que a concentração de amônia cai a zero depois de 70 horas, embora a curva de peso seco para glicose e células sugira a possibilidade da limitação de nutriente em torno de 20 horas. A glicose remanescente deste período é lentamente incorporada nos lipídeos intracelulares por aumento no peso seco de células e lipídeos, especialmente após a limitação de nitrogênio. O perfil de ácidos graxos nos lipídeos extraídos revela uma mudança inicial até o término do nitrogênio. Os meios com C:N 77 supridos com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e uréia, apresentaram um conteúdo de lipídeos de 33,9; 35,3 e 38,6g/100g de células respectivamente. Os meios com C:N 16 supridos com  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$  e uréia apresentaram um conteúdo de lipídeos de 19,8 e 21,6g/100g de célula

respectivamente. Os autores concluíram que um aumento da taxa C:N no meio não causa um aumento proporcional de lipídeos, mas causa uma variação na concentração de ácidos graxos. O ácido oléico (C18:1) diminui em 60% o total de lipídeo quando C:N 55 e diminui aproximadamente 40% quando C:N 99, mas parece estabilizar após esse nível. Simultaneamente o ácido palmítico (C16:O) aumenta de 10% para 25% e o ácido esteárico (C18:O) de 3% para 10%. Contudo, tanto o ácido linoléico (18:2) quanto o linolênico (18:3) varia menos de 5%.

A produção de lipídeo foi significativamente afetada pelo tipo de açúcar presente. Com frutose e glicose, a produção de lipídeos fica em torno de 35% e com galactose a produção é de aproximadamente 5% de lipídeos. A fonte de carbono produz variação igual no C16:O, C18:O e C18:1. C18:2 variou de 5% para 22% e C18:3 não foi encontrado quando as células cresceram na presença de frutose. A razão C:N 77 foi a máxima para a produção de lipídeos usando glicose ou frutose como fonte de carbono e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou uréia como fonte de nitrogênio. Foi concluído pelos autores que a composição dos ácidos graxos dos lipídeos foi afetada pela razão C:N inicial e pelo tipo de açúcar.

É sabido que leveduras podem usar n-parafina como substrato para crescimento. Baseado nesse fato, BLASIG *et al.* (1989) estudaram a degradação de n-alcanos sólidos e líquidos pela levedura *Candida maltosa*. Eles observaram que a oxidação de n-alcanos sólidos por essa levedura produziu um padrão de ácidos graxos semelhante aquele com células crescidas em n-alcanos líquidos. Esses resultados podem ser de importância industrial para produção de proteínas e lipídeos por leveduras a partir de misturas de n-alcanos como fonte de carbono. Não há acumulação de ácidos graxos de cadeia longa que possam ter efeito negativo sobre a membrana celular. Na levedura analisada, os ácidos graxos encontrados tem entre dezesseis e dezoito átomos de carbonos independente do comprimento da cadeia do n-alcano.

YKEMA *et al.* (1989) estudaram importantes parâmetros de crescimento para a levedura oleaginosa *Apiotrichum curvatum* e concluíram com esse experimento que, para uma alta produção industrial desejável, a técnica de

retroalimentação deve ser usada pois é baseada na alta concentração de biomassa e baixa taxa específica de crescimento, o que assegura a rápida produção com baixo custo de processo.

GRANGER *et al.* (1992) estudaram o efeito das condições de cultivo, especialmente a taxa carbono:nitrogênio e temperatura, no perfil de lipídeos na levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis*. Após a fase de crescimento, quando toda a glicose havia sido consumida, a taxa C:N influenciou aumentando a concentração final da biomassa sem lipídeos, diminuindo a produção de ácidos graxos e diminuindo a concentração de ácido linoléico. A redução da temperatura de cultivo de 30°C para 25°C resultou numa diminuição do crescimento e na síntese de produtos. Contudo, a formação de ácido linoléico (18:2) e  $\alpha$ -linolênico (18:3) foi menos afetada do que a produção de biomassa e síntese de ácidos graxos. Experimentos usando meio com nitrogênio limite revelaram que a mudança na temperatura só é eficiente quando é feita durante a fase de crescimento exponencial.

ALVARES *et al.* (1992) estudaram a produção de lipídeos por *Rhodotorula glutinis* crescida em cultura contínua usando melaço de cana como substrato sob condições de nitrogênio limite. A relação C:N não mudou significativamente quando a concentração de açúcar foi aumentando, porque o melaço contém grande quantidade de nitrogênio orgânico. Contudo, houve um aumento na síntese de lipídeos e biomassa celular quando foram usadas altas concentrações de melaço. Para o crescimento em batelada e cultura contínua, a composição de ácidos graxos foi similar, mas com a diminuição de crescimento, o grau de insaturação diminuiu. Esse efeito foi principalmente devido ao aumento nos níveis de ácido esteárico e uma diminuição de ácido oléico.

Sabendo que a levedura *Cryptococcus curvatus* é uma das mais eficientes leveduras oleaginosas e que pode acumular até 60% de lipídeos na sua biomassa seca sob condições de nitrogênio limite, HASSAN *et al.* (1994) estudaram a produção de lipídeos desta levedura usando como substrato seiva do espinho da pera que possui alto conteúdo de açúcares redutores, principalmente glicose e frutose, além de alta razão C:N e de baixo custo. Visto

que usando vários subprodutos da agroindústria e aproveitando a habilidade dos microrganismos em converter diversas fontes de carbono em lipídeo, essa é uma maneira de melhorar a competitividade econômica da fermentação de óleos microbianos. Com relação a assimilação da fonte de carbono, a glicose foi preferencialmente assimilada em relação a frutose, sendo que esta passou a ser assimilada logo após o término da glicose. A fase de crescimento exponencial foi observada antes da exaustão de nitrogênio e após a formação da biomassa, o crescimento diminuiu e a acumulação de lipídeo intracelular aumentou. O processo de acumulação de lipídeo continua até que toda a fonte de carbono tenha sido assimilada, sugerindo que as células estocam alguns componentes que serão metabolizados até lipídeos. A produção total de lipídeos foi de 0,30g de lipídeo produzido por grama de açúcar consumido, mostrando que o excesso de açúcar foi essencialmente usado para a produção de lipídeo.

O choque ambiental, pode induzir várias mudanças adaptativas na membrana de microrganismos. A influência do estresse osmótico e a alteração na composição de ácidos graxos foram estudados em oito linhagens de leveduras dos gêneros *Dipodases* e *Dipodascopsis* por SAJABDOR *et al.* (1994). Todas as linhagens, exceto *Dipodascopsis uninucleata*, cresceram em meio contendo 8% p/v de NaCl. A presença de NaCl no meio de cultivo geralmente inibiu a acumulação de lipídeos, embora tenha havido um fraco aumento de lipídeos nas linhagens de *D. aggregatus*. Com relação aos ácidos graxos, foi observado uma diminuição no C18:2 (linoléico), acompanhado pelo aumento no C18:1 (oléico) em *D. uninucleata*, *D. reesii*, *D. tetrasperma* e *D. australiensis*. Nas linhagens *D. tothii* e *D. aggregatus*, o conteúdo desses dois ácidos graxos diminuiu. A diminuição dos ácidos graxos di e mono insaturados C:18 foi associada à acumulação preferencial de ácido miristoléico (C14:1) e ácido palmitoléico (C16:1), em todas as linhagens, com exceção da linhagem *D. uninucleata*. Foi observada em todas as linhagens uma pequena mudança na proporção de ácido palmítico (C16:0). O estresse salino causou uma diminuição nos lipídeos insaturados em todas as linhagens, exceto *D. uninucleata*. Foi concluído que as linhagens *Dipodacopsis* e *Dipodascus spp.* parecem responder ao estresse salino pela diminuição da síntese de lipídeos e ácidos graxos insaturados. A eliminação

do ácido oléico e linoléico foi acompanhado pelo acúmulo de miristoléico e ácido palmítico.

O conteúdo de lipídeos de um organismo oleaginoso e a composição de seus ácidos graxos sofrem grande influência quando a concentração de glicose ou de outro carboidrato como substrato aumentam. Esse efeito tem sido observado também em leveduras não oleaginosas. Os resultados de STEINBERG & ORDAL (1954) com *Rhodotorula gracilis* indicam que o conteúdo de lipídeos de um organismo oleaginoso não será afetado pelo aumento da concentração de glicose até que o excesso de carbono seja consumido. A alta concentração de substrato pode ser obtida pela adição de certas quantidades ou adicionadas continuamente caso o crescimento do microrganismo seja inibido com altas concentrações de substratos ( ALLEN *et al.* 1964).

O conteúdo de lipídeo em *Candida utilis* elevou-se quando a concentração de glicose aumentou e este é um comportamento típico de leveduras que não sofreram prejuízo em seu metabolismo oxidativo devido a um aumento na concentração de glicose (BABIJI *et al.* 1969). Em estudos com *Saccharomyces cerevisiae*, o aumento da concentração de glicose de 2g/L para 10g/L ocorreu diminuição da quantidade de ácidos graxos de 8% para 5% mas produziu pouco efeito sobre o grau de insaturação (BROWN & JOHNSON, 1970).

O efeito da temperatura na síntese de lipídeos de leveduras geralmente é o mesmo observado sobre outros microrganismos. O conteúdo de lipídeos aumenta quando a temperatura é menor do que a temperatura ótima de crescimento. Mas, estudando espécies de *Candida*, LATES & BAXTER (1962) e THORPE & RATLEDGE (1973), concordam que o aumento na temperatura de 10°C para 25°C, e de 30°C para 40°C, respectivamente, resulta numa quantidade de lipídeos constante, embora eles tenham observado mudanças na composição de ácidos graxos dos lipídeos. A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam a composição de lipídeos de microrganismos. (NEIDELMAN, 1987 e RATLEDGE, 1987).

GOULET (1975) comparou a energia de ativação para a síntese de gordura e para o crescimento da espécie *Rhodotorula Glutinis* e concluiu que o

aumento da temperatura de 23°C para 31°C tem um efeito menor na síntese de lipídeos do que no crescimento.

Embora haja uma tendência dos ácidos graxos se tornarem menos saturados com o crescimento a baixas temperaturas, tanto no sistema contínuo quanto em batelada, foi feito um estudo usando vários microrganismos crescidos em diferentes condições, como mostra a tabela 2. Nem todos os microrganismos mostraram o mesmo grau de resposta (RATLEDGE, 1982).

Tabela 02- Efeito da temperatura na composição de ácidos graxos de vários microrganismos.

<b>Microrganismo</b>	<b>método de crescimento</b>	<b>temp.(°c)</b>	<b>16:0</b>	<b>18:0</b>	<b>18:1</b>	<b>18:2</b>	<b>18:3</b>
<i>C.utilis</i>	contínuo	15	16	0	26	33	17
		20	11	0	27	43	12
		30	12	1	34	48	3
<i>Rhodotorula gracilis</i>	batelada	20	22	8	53	10	3
		27	14	12	53	12	4
		35	21	10	45	18	2
<i>Rhodotorula glutinis</i>	contínuo	22.5	12	3	26	25	5
		25	12	4	30	24	4
		28	13	6	35	23	3
		30	16	7	39	24	1
<i>L.lipoferus</i>	batelada	22	28	20	45	3	0
		30	28	10	47	7	0
<i>Candida sp107</i>	continuo	19	28	6	42	19	1
		27	26	9	40	20	2
		33	24	7	42	19	2

SUUTARI *et al.* (1993) estudaram o efeito da temperatura na acumulação de triacilglicerol de *Lipomyces starkeyi*. A temperatura foi mudada durante o crescimento e na fase de acumulação e pós acumulação de lipídeos. A temperatura da fase de crescimento afetou o conteúdo de ácidos graxos e a duração dessa fase. Quando a temperatura na fase de crescimento foi 28°C o conteúdo de lipídeo celular e a eficiência na conversão de glicose foi maior. A temperatura na fase de acumulação tem uma influência na qualidade dos lipídeos, pois o conteúdo de ácido oléico e ácido palmítico aumenta quando a temperatura diminui. O grau de insaturação foi maior quando a temperatura na fase de acumulação de lipídeos foi mais baixa e vice e versa. Após a fase de acumulação de lipídeos a mudança na temperatura não afetou a composição nem a quantidade de lipídeos acumulados. Eles concluíram que o perfil de temperatura para a alta produção de lipídeos se divide em dois estágios, uma temperatura onde há um máximo de crescimento e uma temperatura onde há produção de ácido palmítico para ácido oléico.

Embora ENEBO (1946) tenha sugerido que o pH deva ser controlado durante o crescimento para minimizar os efeitos de sua variação, não foi detectado nenhuma mudança na produção de lipídeos por leveduras devido ao pH, mostrando que esse efeito tem papel secundário.

KESSEL (1968) trabalhando em condições de pH entre 3.0 e 6.0 constatou que o crescimento do organismo foi retardado em valores de pH baixos mas que o conteúdo de lipídeos diminuiu de 63% para 40% embora a concentração final de lipídeos extraídos tenha sido a mesma. Deste modo, ele concluiu que o pH pode ser um fator inicializador da acumulação de lipídeos em *R. gracilis*. GOULET (1975) encontrou que o conteúdo de lipídeos aumenta linearmente de 20 para 22% com o aumento no pH controlado entre 3.0 e 8.0.

O pH inicial do meio e a composição de lipídeos de *Candida stellatoidea* foi estudado por GUARNERI *et al.* (1987). O pH inicial escolhido foi 4.0; 6.5; 8.0 e 10.0, e o pH final após 48 horas de cultivo foi 6.99; 8.29; 7.8 e 8.95, respectivamente. Entretanto o autor concluiu que as mudanças na produção de lipídeos não podem ser atribuídas apenas aos efeitos do pH, mas a combinação do efeito do pH e mudanças na fisiologia da célula como uma função do tempo e condições iniciais de cultivo.

JOHNSON *et al.* (1992) estudaram a variação na biomassa e o padrão de lipídeos de uma levedura oleaginosa, *Rhodotorula glutinis* 11P-30, utilizando glicose para fermentação sob condições de nitrogênio limite, a diferentes valores de pH. Quando houve variação nos valores de pH do meio de crescimento, houve uma variação significativa na biomassa e conteúdo de lipídeos. A biomassa e o nível de lipídeos diminuíram drasticamente com pH 3,0. No pH 5,0 e 6,0 ocorreu também diminuição da biomassa e dos lipídios quando comparados aos valores obtidos de biomassa e lipídeos com o meio de crescimento em pH 4,0. O perfil de ácidos graxos variou muito pouco com os diferentes valores de pH do meio.

O oxigênio tem um pronunciado efeito no metabolismo geral e do crescimento de alguns organismos. Embora a aeração seja um fator importante na insaturação de ácidos graxos esse parâmetro tem sido raramente quantificado. PAN *et al.* (1949) observaram que variando a taxa de aeração não houve efeito na produção de células de *Rhodotorula gracilis* ou no conteúdo de seus lipídeos, embora tenha havido uma pequena diminuição na utilização do açúcar.

KESSEL (1968) determinou a concentração crítica de oxigênio dissolvido durante a fase de crescimento exponencial da levedura *Rhodotorula gracilis* e observou que o peso seco das células aumentou no final da fase exponencial com o aumento da agitação. BROWN & ROSE (1969) e BABIJ *et al.* (1969) trabalharam com uma levedura não oleaginosa *Candida utilis* e encontraram que diminuindo a tensão de oxigênio dissolvido diminuía a síntese de ácidos graxos insaturados sob condições de nitrogênio e carbono limite.

Estudando a levedura *Rhodotorula gracilis*, COCUCCI *et al.* (1975) encontraram que não houve mudança significativa na produção de lipídeos totais e fosfolipídeos variando a taxa de oxigênio dissolvido e que a produção dos não fosfolipídeos diminuiu muito pouco. Quando a acumulação de lipídeos ocorreu usando um meio com nitrogênio limite em cultura contínua de *Candida* NCYC911 e *Rhodotorula gracilis* RATLEDGE & HALL (1977) encontraram que a demanda de oxigênio caiu drasticamente. Contudo, HALL & RATLEDGE (1977) trabalhando com *Candida* 107 não encontraram alteração significativa no perfil de ácidos graxos com baixos níveis de aeração.

COMBS *et al.* (1980) estudaram o comportamento da levedura *Candida albicans* com baixa pressão de oxigênio e observaram que não houve mudança significativa na produção de lipídeos totais.

Sabendo que diferenças na estrutura das organelas pode resultar em diferenças na atividade metabólica, microrganismos anaeróbicos facultativos podem empregar um sistema metabólico diferente daqueles que são aeróbicos obrigatórios para biossíntese de lipídeos e portanto a resposta para o conteúdo de oxigênio pode ser diferente nos dois tipos de microrganismos. Com isso, CHOI *et al.* (1982) estudaram os lipídeos de levedura *Rhodotorula gracilis* crescida em cultura contínua sob condições de nitrogênio limite e avaliou o efeito do crescimento e concentração de oxigênio no grau de insaturação dos ácidos graxos. Quando o crescimento aumentou, os ácidos graxos poliinsaturados (18:2 e 18:3) aumentaram e os ácidos graxos saturados (16:0 e 18:0) e o ácido graxo monoinsaturado (18:1) diminuíram. Quando há uma assimilação maior de oxigênio, aumenta o grau de insaturação. Os ácidos graxos sintetizados com alta assimilação de oxigênio e alta taxa de crescimento parecem sofrer mais dessaturação, como por exemplo, de ácido oléico para ácido linoléico. Tanto a biomassa celular quanto o conteúdo de lipídeos aumentam com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido. Isto resulta, numa diminuição de ácido esteárico e ácido oléico enquanto que os ácidos graxos poliinsaturados, linoléico e linolênico, aumentam. O ácido palmítico aumenta proporcionalmente à diminuição de ácido esteárico. Embora essa levedura seja aeróbica obrigatória, a variação de ácidos graxos com mudanças na concentração de oxigênio

sob condições de nitrogênio limitante não afeta significativamente o grau de insaturação.

PAN *et al.* (1986) estudaram uma espécie de levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis* usando cultura em batelada e avaliaram a densidade de células usando cultura com ar e ar enriquecido com oxigênio. Eles observaram que com ar enriquecido com oxigênio, houve um aumento na concentração de biomassa e que a quantidade de oxigênio requerido na fase de acumulação de lipídeos é baixa. O metabolismo aeróbico dessa levedura é vantajoso para alta densidade de células, pois o crescimento com oxigênio limitante continua sem causar acumulação de subprodutos da fermentação.

TURCOTTE (1987) mostrou que a concentração de oxigênio dissolvido durante cultura em batelada de *Rhodospiridium toruloides* ATCC10788 indica que o oxigênio deve ser requerido após a exaustão de nitrogênio, quando as células mudam seu metabolismo para acumulação de lipídeos. O que deve ser reconhecido na verdade é que o que ocorre é a interação entre a concentração de oxigênio dissolvido e outros fatores como a temperatura e composição do meio.

DAVIES *et al.* (1990) estudaram o efeito da disponibilidade de oxigênio no perfil de ácidos graxos da levedura *Apiotrichum curvatum* ATCC20509 durante o crescimento. A taxa de ingestão de oxigênio diminuiu na fase de acumulação de lipídeos e houve uma diminuição no total de ácidos graxos insaturados. O efeito da ingestão de glicose no perfil de ácidos graxos dessa levedura foi examinado.

Os efeitos na produção de biomassa, eficiência da conversão de lactose em lipídeos, tempo de fermentação e conteúdo de lipídeos foram estudados ao longo da fermentação. A medida da eficiência de conversão da lactose para lipídeo diminuiu com o aumento da assimilação de oxigênio. O tempo de fermentação foi maior para uma completa utilização da lactose numa baixa taxa de assimilação de oxigênio. A produção de biomassa foi diminuindo quando aumentou a taxa de assimilação de oxigênio. Com relação ao perfil de ácidos graxos foi observado que essa levedura mostra uma variação nos níveis de ácido esteárico e ácido palmítico quando há uma baixa ingestão de oxigênio. O ácido

esteárico e o ácido palmítico aumentam, enquanto o ácido oléico e o linoléico diminuem.

A tabela 3 mostra o efeito do oxigênio na composição de ácidos graxos de várias leveduras.

Tabela 03- Efeito da taxa de oxigênio na composição de ácidos graxos de diferentes leveduras

		% Relativa de Ácidos Graxos				
Microrganismo	Tensão de O <sub>2</sub> no Fermentador	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
<i>C. utilis</i>	alta	18	0	42	34	0
	baixa	15	0	29	45	0
<i>C. utilis</i>	alta	11	1	24	39	25
	baixa	11	1	36	46	4
<i>Candida sp107</i>	alta	24	6	45	15	3
	baixa	31	8	42	9	2
<i>Rh. gracilis</i>	alta	20	8	29	23	16
	baixa	17	6	48	17	6

Fonte: RATLEDGE, 1982

A demanda de vitamina estudada por ALLEN *et al.* (1964) na levedura *Rhodotorula gracilis* demonstrou que apenas tiamina e ácido pantotênico são requeridos para um máximo de crescimento, mas para a fase de acumulação de lipídeos nenhuma vitamina ou qualquer fator de crescimento foi necessário, confirmando os resultados obtidos previamente por STEINBERG & ORDAL (1954). O meio usado para induzir a acumulação de lipídeos tem sido principalmente uma elevada taxa de carbono e nitrogênio. Além disso, outros nutrientes tem sido usados para limitar o crescimento celular, incluindo fosfato, sulfato e ferro.

A ausência ou adição de vitaminas e minerais também pode causar mudanças no padrão de acumulação de lipídeos. Em *Saccharomyces carlsbergensis*, NISHIKAWA *et al.* (1974) observaram que a ausência de piridoxina levou à produção de pouca quantidade de ácidos graxos insaturados sem esteróis e que a ausência de tiamina reduziu a quantidade de lipídeos dessa levedura (NISHIKAWA *et al.* 1977).

GRANGER *et al.* (1993) estudaram os efeitos da limitação de nitrogênio, fósforo, zinco e ferro na produção de ácidos graxos e síntese de ácido  $\alpha$ -linolênico em uma levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis*. A limitação de nutrientes no meio resulta em crescimento lento e aumento do conteúdo de ácidos graxos da célula. Em todas as condições limitantes testadas houve acumulação de lipídeos e um aumento na produção de ácidos graxos, embora essas condições não pareçam ser favoráveis para a produção de  $\alpha$ -linolênico. Durante o crescimento em condições de fósforo limite, uma diminuição de temperatura de 30°C para 25°C provocou redução do conteúdo de ácidos graxos e aumento da produção de  $\alpha$ -linolênico. A falta desses nutrientes resultou em diminuição no crescimento e no aumento do conteúdo de ácidos graxos da célula.

### **2.3 Extração e análise de lipídeos**

Uma etapa importante na obtenção de lipídeos de microrganismos é a sua extração, que deve ser completa e sem o aparecimento de ácidos graxos livres durante o processo, pois os microrganismos possuem uma grande quantidade de ácidos graxos livres na porção lipídica e esses materiais são extremamente tóxicos e sua presença indica que lipases e fosfatases estão ativas.

A extração de lipídeos de microrganismos exige a ruptura celular e isso pode ser feito através de processos químicos, físicos ou bioquímicos. Um fator determinante que deve ser levado em consideração no processo de extração é a escolha dos solventes. Na maioria dos casos é usada uma mistura de solventes visando uma maior eficiência de extração.

MOON & HAMMOND (1978) estudaram a escolha de solventes para extração de lipídeos em uma levedura oleaginosa, *Candida curvata*, levando em consideração o custo e a toxicidade. Eles observaram que o uso de etanol / hexano (1:1 v/v) seguido de uma lavagem da célula com hexano é mais eficiente do que a mistura etanol/benzeno ou metanol/hexano. Esse método foi usado diretamente sem ruptura preliminar da célula.

Para uma efetiva extração de lipídeos é necessário que as células estejam no estado fisiológico ativo. As células cultivadas há muitos dias e que estão na fase estacionária de crescimento podem se degenerar. Neste estado pode ocorrer autólise parcial de lipídeos e de outros componentes celulares. Se proteínas ou carboidratos são utilizados ou degradados o conteúdo de lipídeos das células será alto. Pela mesma razão, as células para análise não devem esperar muito tempo após serem separadas. Poucas horas na temperatura ambiente podem provocar mudanças na composição de lipídeos das células, como também, amostras deixadas sob refrigeração por 12 horas podem apresentar mudanças significativas na composição celular.

Durante a etapa de extração deve ser levada em consideração alguns parâmetros importantes para a manutenção da estrutura química dos lipídeos extraídos, de modo que, haja uma eficiência no aproveitamento desses lipídeos que serão analisados.

## **2.4 Bioquímica de acumulação de lipídeos**

O padrão de acumulação de lipídeos em muitos microrganismos oleaginosos crescidos em cultura em batelada segue em dois estágios. O primeiro estágio é a proliferação das células no máximo de crescimento e isso continua até que um nutriente que não seja o carbono, usualmente o nitrogênio, torne-se escasso no meio. Poucos microrganismos encontrados possuem um padrão de acumulação de lipídeos diferente, ou seja, o alto conteúdo de lipídeos é obtido na fase de crescimento quando não há nenhum nutriente limite (RATLEDGE, 1882).

PEDERSEN (1962) constatou que a levedura *Cryptotococcus albidus* var. *albidus* foi a única levedura oleaginosa que não seguiu o padrão clássico de acumulação de lipídeos, apesar desse ainda não ter sido esclarecido.

A produção de novas células requer síntese de proteínas, RNA e DNA e essa biossíntese é modificada devido a ausência de nitrogênio. Contudo, o excesso de carbono continua a ser consumido e, em certos microrganismos, é convertido em lipídeos. Porém, não há aumento da síntese de lipídeos o que ocorre é uma acumulação de lipídeos porque um outro processo celular cessa (KESSEL, 1968).

A eficiência na qual um carboidrato pode ser convertido a lipídeo não depende apenas da produção de unidades de  $C_2$  para alongamento da cadeia de ácidos graxos mas também da geração simultânea de suficiente poder redutor na forma de NADPH para a síntese. Se um organismo metaboliza carboidrato através da via glicolítica e pentose fosfato sem muita eficiência, terá que providenciar açúcares  $C_3$  e  $C_4$  como precursores de ácidos nucléicos e aminoácidos aromáticos ou então, sofrerá uma redução em toda eficiência de conversão de glicose em gordura.

A bioquímica de acumulação de lipídeos tem sido recentemente estudado por RATLEDGE (1988). O evento iniciador é a exaustão de nitrogênio do meio de cultura. Consequentemente segue uma rápida diminuição da concentração de AMP intracelular devido a ação de AMP desaminase.

O baixo nível de AMP resulta em uma baixa atividade de isocitrato desidrogenase mitocondrial e um rápido aumento na concentração de citrato intracelular. O citrato é clivado no citossol pela ATP citrato liase, uma enzima que só é encontrada em leveduras oleaginosas para produzir acetil coA, que é o produto de partida para a biossíntese de ácidos graxos.

O NADPH requerido para a biossíntese de ácidos graxos é gerado pela enzima málica. Essa enzima não é usualmente encontrada em leveduras não oleaginosas. O ácido málico para esta reação é inicialmente providenciado do malato mitocondrial produzido do piruvato via piruvato carboxilase e malato

desidrogenase e a permuta para piruvato em uma série de sistemas translocase. É necessário que algum malato seja transformado em citrato ainda dentro da mitocôndria. O citrato vai para o citossol e é clivado a acetil coA e oxalacetato o qual é usado para gerar malato.

O processo é regulado pela atividade da isocitrato desidrogenase e pelas enzimas chaves reguladoras da glicólise, fosfofrutoquinase e piruvato quinase, cuja função assegura o continuo suprimento de piruvato. Os produtos finais ácido palmítico e ácido esteárico, que podem ser desaturados a palmitoléico e oléico, antes são transacilados para formar fosfatidilglicerol, um precursor dos fosfolipídeos e triacilgliceróis (CARMAM & HENRY, 1989 e WAKIL *et al.* 1983).

Esse processo é descrito para leveduras oleaginosas. No caso de leveduras não oleaginosas a via metabólica usada é a da carnitina acetiltransferase para gerar acetil coA no citossol. O NADPH é provavelmente gerado nessas leveduras pela glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogliconato desidrogenase (KOHHLHAW & TAN-WILSON, 1977).

O processo de acumulação de lipídeos não ocorre unicamente devido a uma levedura possuir uma ou duas enzimas (ATP citrato liase e enzima málica), mas também outras enzimas capazes de responder sinais intracelulares para transformar carbono em acetil coA.

O processo de melhoria genética ou conversão de uma linhagem não oleaginosa em oleaginosa é ainda remoto. Contudo, através de manipulações metabólicas, pela escolha da fonte de carbono e nitrogênio, tem sido possível aumentar o conteúdo de lipídeos de algumas leveduras de uma maneira satisfatória.

WHITWORTH & RATLEDGE (1975) analisaram o metabolismo intermediário e o controle na síntese de lipídeos da levedura *Candida* 107 crescida em glicose. Enzimas da glicólise, pentose fosfato, gliconeogênese, ciclo do ácido tricarboxílico e biossíntese de lipídeos foram ensaiadas em extratos dessa levedura crescida em glicose como fonte de carbono e em condições de nitrogênio limite. A enzima fosfofrutoquinase esteve ausente sobre todas

condições onde a enzima da gliconeogênese, incluindo frutose 1,6-bifosfatase, e do ciclo das pentose fosfato estavam presentes. Glicose 6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase foram específicas para NADP e foram inibidas de maneira não competitiva por NADPH e NADH. Fosfoenolpiruvato, citrato, ATP e acetil-CoA não tem efeito inibitório. Na verdade o metabolismo da glicose parece ser pela via da pentose fosfato no qual irá rapidamente produzir NADPH. O NADPH pode prontamente ser consumido durante a biossíntese de ácidos graxos e esse processo parece não inibir o fluxo de carbono de glicose a acetil CoA, a síntese de ácidos graxos pode continuar até que todo o suprimento de carbono acabe. Esses resultados ajudam a explicar a provável causa da acumulação de lipídeos.

Em células crescidas em alcanos, a lipogênese cessa e o carbono é capaz de passar de alcano via acetil CoA, oxaloacetato e piruvato a pentoses e hexoses de uma maneira unidirecional devido a repressão de piruvato quinase e devido o aumento da atividade da fosfoenolpiruvato quinase e frutose 2,6-bifosfato sob essas condições. Embora haja poucas mudanças no total de atividade das enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico sobre as várias condições de crescimento, a isocitrato liase foi induzida sobre condições lipolíticas.

EVANS & RATLEDGE (1983) estudaram a atividade bioquímica em *Candida curvata* durante a fase de acumulação de lipídeos. A concentração de citrato intracelular e extracelular e a atividade de dez enzimas diferentes foram examinadas em relação a biossíntese de lipídeos em cultura contínua e em batelada. Citrato é acumulado antes da produção de lipídeos e declina consideravelmente quando os lipídeos são acumulados. O citrato foi excretado da cultura de células quando o nitrogênio se tornou limitante após 30h de crescimento, mas pouco foi excretado após 40h de crescimento, quando a acumulação de lipídeos era máxima. Em cultura contínua, baixos níveis de citrato foram detectados. A atividade da enzima málica, malato desidrogenase e ATP citrato liase aumentaram em cultura em batelada na fase de acumulação de lipídeos indicando uma correlação dessas enzimas com a biossíntese de lipídeos. Em cultura contínua, tanto a enzima málica quanto a ATP citrato liase variaram em paralelo com a síntese de lipídeos. A atividade da malato desidrogenase,

citrato sintase e glicose-6-fosfato desidrogenase diminuíram.

Os autores concluíram que, quando o nitrogênio se torna limitante, a síntese dos outros componentes celulares diminui e a produção de lipídeos predomina. Contudo, é também evidente que as mudanças no metabolismo celular após um período de tempo, promovem uma maior eficiência na produção de lipídeos e isso é devido ao aumento na síntese de enzimas que convertem carbono em lipídeos.

MORETON (1985) estudou o efeito do ácido graxo estercúlico e malvático nos lipídeos da levedura *Candida sp.* 107, *Trichosporon cutaneum* e *Rhodospordium toruloides*, sob condições de nitrogênio limitante, para determinar se o ácido graxo ciclopropano poderia ser usado para modificar os lipídeos dessas leveduras e produzir um lipídeo de importância industrial. Esses ácidos graxos são encontrados em óleos das sementes da família *Malvaceae* e *Sterculiaceae*, são ácidos graxos de cadeia linear com 17 e 18 carbonos, respectivamente, com um grupo ciclopropano na posição  $\Delta 9$  (CPFA). Esses ácidos graxos parecem interferir com a dessaturação de ácidos graxos em animais, plantas e certas leveduras. Duplas ligações são introduzidas por uma dessaturação sequencial, a primeira na posição  $\Delta 9$  e posteriormente  $\Delta 12$  e  $\Delta 15$ . Essas três dessaturações são catalisadas por três dessaturases específicas para cada posição. A dessaturação é um mecanismo oxidativo que requer oxigênio molecular, NADH, NADPH e substrato. Nos três microrganismos, *Candida sp* 107, *Trichosporon cutaneum* e *Rhodospordium toruloides*, esses componentes estudados causaram mudanças na composição dos ácidos graxos. Ácido palmítico e oléico diminuíram e o ácido esteárico aumentou com pequenas doses de CPFA. A concentração de ácido palmítico permaneceu a mesma. A adição de CPFA inibe a  $\Delta 9$  dessaturase daí a redução de 18:2 e 18:3 não ser observada em todos os organismos testados. Com *Candida sp* 107 e *Rhodospordium toruloides*, 18:2 foi substancialmente reduzido pela adição de óleo de estercúlia, enquanto que 18:3 não sofreu redução. Com *Trichosporon cutaneum*, o 18:2 não foi reduzido com adição de óleo de estercúlia, a concentração permaneceu constante. A redução da biomassa observada com adição de baixos níveis de

CPFA, em alguns casos, sugere alguma forma de adaptação.

KRYLOVA *et al.* (1985) investigaram a composição da biomassa (conteúdo de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) e formação de lipídeos durante a fase de crescimento da levedura *Cryptococcus albidus*. O aumento da biomassa livre de lipídeos para após 3 dias de crescimento da cultura e permanece o mesmo nível após 6 dias, conseqüentemente o aumento no total da biomassa após 3 dias de crescimento pode ser explicado pela intensiva síntese de lipídeos que começa após o conteúdo de nitrogênio diminuir à quantidades traços. O alto conteúdo de proteínas e ácidos nucleicos é observado no período de crescimento ativo da cultura, após o qual a proporção de proteínas e ácidos nucleicos diminui gradualmente. A proporção de lipídeos aumenta, e alcança o máximo em seis dias. O aumento na proporção de lipídeos é responsável pela mudança na composição elementar da biomassa: o conteúdo de carbono e hidrogênio aumenta, enquanto que a proporção de nitrogênio e oxigênio cai. O máximo de eficiência da síntese de lipídeos é notada após cinco dias de cultivo quando o conteúdo da biomassa livre de lipídeos fica estabilizado. A composição de ácidos graxos dos lipídeos mostrou um conteúdo máximo de ácido linoléico durante o crescimento ativo da cultura e constituiu 16.9% do total dos ácidos graxos. Durante o crescimento da cultura o grau de insaturação dos lipídeos aumentou, pois o conteúdo de ácido palmítico diminuiu e a proporção de ácido oléico aumentou. Foi estabelecido então que, a máxima taxa na síntese de lipídeos nessa levedura foi observada durante o período de diminuição no crescimento da cultura, o que contesta a opinião prévia de que a síntese de lipídeos em leveduras desse gênero ocorre em paralelo a fase de crescimento.

PAN & RHEE (1986) analisaram o efeito cinético e energético da acumulação de lipídeos da levedura *Rhodotorula glutinis* e verificaram que após toda fonte de nitrogênio ter sido exaurida o número de células aumentou, a biomassa livre de lipídeos cessou e o lipídeos intracelulares aumentaram. O oxigênio ingerido durante a fase de acumulação de lipídeos foi dez vezes menor do que o ingerido na fase de crescimento. O crescimento específico em termos de número de células foi zero na fase de acumulação de lipídeos. O que tornou a análise energética possível foi a divisão em duas fases claramente

distintas, onde a produção de biomassa diminuiu com a fase de acumulação de lipídeos.

A produção energética corresponde a eficiência de formação de biomassa a partir de um substrato. Os autores analisaram se a alta produção energética de leveduras oleaginosas é inerente as características da levedura ou depende da fase de acumulação de lipídeos. Com isso foi evidente que a alta produção energética é dependente das condições de acumulação de lipídeos. A alta eficiência de síntese de lipídeos é consistente com a proposta de que a síntese de produtos se processa mais eficientemente do que a formação de biomassa. A alta produção energética está relacionada a muitos parâmetros de importância industrial como baixa requisição de oxigênio, baixa geração de calor e baixa produção de dióxido de carbono. Os autores concluíram que, na verdade, microrganismos que tem alta produção energética são candidatos favoráveis para cultura com alta densidade de células.

ROLPH *et al.* (1989) investigaram o efeito das condições de cultivo no metabolismo de triacilgliceróis em uma levedura oleaginosa *Rhodotorula gracilis*. O crescimento sob condições de nitrogênio limitante resulta em acumulação de grande quantidades de triacilgliceróis. A análise dos lipídeos totais extraídos mostrou que a maioria dos lipídeos são produzidos na fase estacionária de crescimento. Em contraste, não houve aumento na biossíntese de triacilgliceróis em células com carbono limitante. O meio de crescimento teve pouco efeito na quantidade relativa de fosfolipídeos e de triacilgliceróis. Ao contrário, o grau de insaturação exibido pela fração fosfolipídica pareceu ser sensível em células com nitrogênio limitante pois esta fração apresentou-se mais saturada com o aumento de idade da cultura. As células crescidas em nitrogênio limitante em baixa temperatura de crescimento tiveram pouco efeito na acumulação de triacilgliceróis. Contudo, tanto os triacilgliceróis quanto os fosfolipídeos extraídos dessa cultura aumentaram a proporção de ácidos graxos poliinsaturados e  $\alpha$ -linolênico.

O efeito da temperatura no metabolismo de triacilgliceróis foi estudado por ROLPH (1989). Ele observou que embora o crescimento de *R. gracilis* a uma

temperatura mais baixa do que 15°C tenha resultado num duplo ciclo no tempo de crescimento, isso teve pouco efeito na quantidade de triacilgliceróis e fosfolipídeos. Mudanças na temperatura de cultivo resultaram em mudanças na proporção relativa do total de ácidos graxos presentes, ou seja, em culturas crescidas com temperaturas abaixo de 20°C há maiores quantidades de ácidos graxos poliinsaturados do que naquelas crescidas com temperaturas maiores do que 25°C. Um aumento na insaturação à temperaturas mais baixas é uma característica de mudança dos lipídeos envolvidos na adaptação e manutenção da função da membrana. Foi observado que tanto a fração de fosfolipídeos quanto a de triacilgliceróis extraídas de culturas crescidas à 15°C continham duas vezes mais  $\alpha$ -linolênico do que as mesmas frações extraídas de culturas crescidas à 30°C. O aumento de  $\alpha$ -linolênico foi muito maior na fração fosfolipídica, devido ao maior conteúdo de poliinsaturados, acompanhado da diminuição de palmitato e oleato.

PARK *et al.* (1990) estudaram o metabolismo de lipídeos e composição celular de uma levedura oleaginosa *Apiotrichum curvatum* ATCC 20509 crescida em diferentes taxas de carbono e nitrogênio. Essa levedura foi cultivada em meio com nitrogênio limitante, meio balanceado, meio sem lactose, meio com asparagina como fonte de nitrogênio e lactose como fonte de carbono. Foi analisada a biomassa, acumulação de lipídeos e a composição da célula. Esse microrganismo acumulou maior quantidade de lipídeo celular quando crescido em meio com nitrogênio limitante do que quando crescido em meio balanceado. Em condições de carbono limitante, as células utilizaram lipídeos e carboidrato endógeno como fonte de carbono e de energia, pois o conteúdo intracelular destes componentes diminuíram. Os carboidratos intracelulares parecem ser usados como intermediários para acumulação de lipídeos.

DAVIES *et al.* (1990) estudaram o efeito da disponibilidade de oxigênio no perfil de ácidos graxos da levedura *Apiotrichum curvatum* ATCC20509 durante o crescimento. A taxa de assimilação de oxigênio diminuiu na fase de acumulação de lipídeos e houve uma diminuição no total de ácidos graxos insaturados. Isso indica que tanto a enzima de alongação que converte ácido palmítico para ácido

esteárico e a enzima  $\Delta 9$  dessaturase que converte ácido esteárico a ácido oléico são afetadas pela disponibilidade de oxigênio. A dupla ligação  $\Delta 9$  é introduzida por um sistema específico de monoxigenase que requer uma molécula de oxigênio para dessaturar uma molécula de ácido graxo.

## 2.5 Aplicação

A membrana plasmática é o primeiro componente celular que entra em contato com o álcool produzido por leveduras usadas em processos fermentativos. Estudos sobre a correlação entre etanol e solubilidade de lipídeos concluíram que sítios hidrofóbicos na membrana plasmática parecem ser o primeiro alvo da ação do etanol (INGRAM & BUTTKE 1984). Isso mostra que dos vários componentes da membrana, os lipídeos são os principais sítios para a toxicidade do etanol (THOMAS *et al.* 1978; THOMAS & ROSE, 1979; INGRAM & BUTTER, 1984). A alta concentração de etanol presente no meio externo age como um choque químico e células crescidas nessas condições sofrem mudanças nos fosfolipídeos e resíduos de ácidos graxos presentes na membrana plasmática. Essas alterações na composição induzidas pelo etanol são uma resposta adaptativa do organismo (INGRAM, 1986).

LEGMANN & MARGALITH (1987) compararam a composição de lipídeos de *Saccharomyces mellis*, uma levedura que possui baixo poder fermentativo e *Saccharomyces cerevisiae*, que possui alto poder fermentativo. Foram usadas diferentes concentrações de açúcar. Na levedura com baixo poder fermentativo foram encontrados ácidos graxos poliinsaturados (18:2 e 18:3) e o conteúdo desses ácidos aumentou com o aumento do nível de glicose, enquanto que o conteúdo de esteróis diminuiu. Na levedura com alta capacidade de fermentação não foram encontrados ácidos graxos poliinsaturados em todas as concentrações de açúcar analisados, enquanto que o conteúdo de esteróis aumentou. Os autores concluíram que esses resultados enfatizam a importância da estrutura da membrana citoplasmática na tolerância ao etanol de leveduras usadas para fermentação, pois a alta fluidez da membrana não foi relacionada com a alta

capacidade fermentativa.

*Saccharomyces cerevisiae* é um dos organismos eucarióticos mais resistente ao álcool. É sabido que a produção de álcool por leveduras cessa o seu crescimento em uma determinada concentração de álcool. A toxicidade do etanol produzido por leveduras age como em fator limitante ao alcançar alta produção. Há evidências de que a toxicidade é a nível de membrana plasmática. A correlação entre a tolerância ao etanol e a composição de ácidos graxos de *Saccharomyces cerevisiae* foi estudada por MISHRA & PROSAD (1989). Eles observaram que células enriquecidas com ácidos graxos poliinsaturados adquirem grande tolerância ao etanol quando comparados com ácidos graxos monoinsaturados. Uma adição sequencial de duplas ligações nos lipídeos da membrana dos microrganismos foi alcançada por variação do grau de insaturação de ácidos graxos. Os resultados mostraram que *S. cerevisiae* tornou-se mais resistente ao etanol com um aumento no grau de insaturação e que a fluidez da membrana, bem como a composição de outros lipídeos, poderiam ser um importante determinante da tolerância ao etanol.

PIERRE *et al.* (1991) estudaram a relação do conteúdo de lipídeos e a tolerância ao congelamento em *Saccharomyces cerevisiae* crescida em diferentes condições de temperatura e aeração. Para os modos de crescimento estudados, a presença do excesso de oxigênio dissolvido no meio de cultura aumentou a crioresistência da levedura sem mudanças significativas no perfil de ácidos graxos. Não houve correlação entre a criotolerância de leveduras de panificação e o conteúdo total de lipídeos celulares, o conteúdo total de esterol, o índice de insaturação dos fosfolipídeos, o conteúdo de fosfato ou extrato protéico e nem na morfologia das células da levedura. Foi concluído que somente a análise de lipídeo não é suficiente para limitar um valor para a seleção industrial de levedura criotolerante, mas essa análise é importante para estudos de criobiologia de leveduras.

BENDOVÁ *et al.* (1991) compararam a composição de ácidos graxos em cinco grupos de *Saccharomyces cerevisiae* tecnologicamente distintos, crescidos e analisados sob as mesmas condições a fim de encontrar características em

comum. Foi observado que as linhagens isoladas do laboratório possuem grandes quantidades de ácidos graxos com 16 carbonos, enquanto que as linhagens tecnológicas (leveduras de destilaria e leveduras da cabeça da cervejaria) apresentaram quantidades traços desses ácidos graxos. Contudo, a quantidade de ácido oleico (C18:1) nas leveduras de laboratório foi bem menor do que nas leveduras industriais. Leveduras de cauda da cervejaria podem ser caracterizadas por altas concentrações de ácidos graxos insaturados como o ácido palmitoléico (C16:1) e ácido oléico. O perfil de ácidos graxos de leveduras da cabeça da cervejaria diferem das leveduras da cauda pela maior quantidade de ácidos graxos de cadeia longa (24 carbonos) e na proporção de C16:1 e C18:1. Linhagens de vinho e destilaria possuem baixa proporção dos ácidos graxos C18:1 e C16:1 e altas quantidades de ácidos graxos com 24 carbonos distinguindo-as de leveduras inferiores de cervejaria. A diferenciação entre linhagens de vinho e destilaria pode ser feita comparando a proporção relativa de ácidos graxos com 24 carbonos. As diferenças analisadas entre as leveduras do gênero *Saccharomyces* de aplicação industrial e de laboratório, podem refletir diferenças na tolerância ao etanol e adaptação a temperaturas dos processos tecnológicos. Apesar de não ser possível prever a relação entre essas características e o perfil de ácidos graxos, é possível diferenciar as linhagens de *Saccharomyces* industrial e de laboratório pelo perfil de ácidos graxos. Foi concluído pelos autores que as características de osmotolerância, termotolerância e tolerância ao etanol de várias linhagens estarão adaptadas as variações das condições tecnológicas, pois elas estão relacionadas a estrutura e a composição de ácidos graxos da membrana celular.

DEL CASTILLO AGUDO (1992) estudou a composição de ácidos graxos e esteróis de várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* variando a concentração de etanol. Os resultados obtidos concordam com a existência de uma correlação entre a fluidez de membrana e a tolerância ao etanol, mas não confirmam o papel dos ácidos graxos poliinsaturados nessa tolerância. Por outro lado, esses dados mostram que o ergosterol tem papel importante nesse fenômeno.

O potencial de um microrganismo de realizar uma série de biotransformações usando óleo vegetal como fonte de carbono para melhorar a qualidade do óleo produzido é conhecido. Com isso, JOHNSON *et al.* (1992) estudaram uma levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis* IIP-30 crescida em óleo de coco como fonte de carbono. Foi observado que a levedura acumulou lipídeos com perfil de ácidos graxos totalmente diferentes da composição do substrato. O óleo de coco tem ácidos graxos C:12 e C:14 em maior proporção, enquanto que após a fermentação os ácidos graxos predominantes nos lipídeos isolados foram C18:1 e C18:2. Foi concluído que essa levedura é capaz de modificar a composição de ácidos graxos do óleo de coco por converter ácidos graxos saturados de cadeia curta em ácidos graxos insaturados de cadeia longa. Com isso há possibilidades de se efetuar biomodificações de óleos e gorduras por microrganismos.

BOTHA & KOCK (1993) estudaram a aplicação do perfil de ácidos graxos na identificação de leveduras, principalmente a composição dos ácidos graxos de cadeia longa. Isso foi feito cultivando as linhagens de leveduras sob condições padronizadas em um meio líquido sintético. Quando a fase estacionária foi alcançada as células de cada cultura foram liofilizadas e os ácidos graxos de cadeia longa foram examinados por cromatografia gasosa. Contudo, ficou claro que existem variações nas espécies e que a porcentagem relativa de algumas linhagens de diferentes espécies podem ser sobrepostas. Quando usados isoladamente, a análise dos ácidos graxos de cadeia longa não é aplicada nas técnicas de identificação de espécies de leveduras. Contudo, a técnica tem um valor como ferramenta quimiotaxonômica para distinguir entre linhagens de certas espécies, espécies de certo gênero e espécies de ambientes específicos. Essa técnica encontra aplicação nos alimentos da África do Sul e na indústria de cerveja como um método rápido, barato e fácil de distinguir entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e também é usada por indústrias que produzem bioproteína de *Geotrichum candidum* para determinar contaminantes fúngicos no controle de qualidade do processo.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - MATERIAIS**

##### **3.1.1 - Reagentes e Materiais específicos:**

- Reagentes químicos: ácidos, bases, sais minerais e solventes (grau P.A. das marcas Merck e Carlo Erba ou equivalentes)
- Meios de cultura: Extrato de malte, extrato de levedura, peptona bacteriológica, ágar, extrato de carne (marcas Difco , Biobrás e Oxoid).
- Açúcares: glicose, sacarose, maltose, galactose, xilose, frutose e lactose (marcas Merck ou equivalentes).
- Padrões para cromatografia gasosa: Ésteres metílicos de ácidos graxos: ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoleico, ácido  $\alpha$ -linolênico e ácido  $\gamma$ -linolênico, marca Sigma.
- Sílica gel G-60 Merck, para cromatografia em camada delgada.
- Padrões para cromatografia em camada delgada (CCD): ésteres metílicos de óleo de sardinha, óleo de oliva e óleo de babaçu.
- Revelador para cromatografia em camada delgada: iodo sublimado, marca Merck.
- Outros: 4-aminofenazona, fenol, solução enzimática (glicose oxidase e peroxidase), água destilada, água do mar.

### **3.1.2 - Equipamentos :**

- Balança analítica Mettler, mod. H-10
- Estufas bacteriológicas, Fanem
- Estufa à vácuo, Fanem, mod. 099EV
- Câmara climática Fanem, mod. 346
- Espectrofotômetro Beckman DU-70
- Centrífuga refrigerada Beckman, mod. J-2183
- Agitador de tubos, Phoenix - mod. AT 56
- Fluxo Laminar, Veco - mod. HLSS-12 / Filtro GAG 22-1
- Banhos-maria termostatizados, Fanem
- Balança semi-analítica, Ohaus TT 2KS - Série 5761
- Cromatógrafo marca Philips modelo Pye Unicam PU 4550 com detector de ionização em chama.

## **3.2 - MÉTODOS**

**3.2.1 - Coleta, isolamento e seleção de microrganismos para obtenção de ácidos graxos insaturados.**

### **3.2.1.1 - Coleta de amostras**

Foram coletadas diversas amostras de vísceras de peixes de água salgada de diversas espécies, em 10 locais diferentes (mercados, feiras e supermercados) de várias regiões do município de Campinas, Estado de São Paulo, num total de 300 amostras. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas até o laboratório à temperatura de 10°C.

### **3.2.1.2 - Isolamento de microrganismos**

Foram retiradas cinco amostras de cada peixe e dispostas em tubos de ensaio contendo 2mL de caldo YM (Yeast malt) contendo 0,3% de extrato de malte, 0,3% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 1% de glicose. Os tubos inoculados foram mantidos em estufa à 30°C por 24 horas. Após o crescimento, a massa celular foi diluída em água destilada esterilizada. Em seguida foram inoculados em placa de Petri contendo meio PYM composto de 1% Peptona, 0,5% extrato de levedura, 0,25% extrato de carne, 2% glicose, 2% ágar e 50% água do mar, 50% de água destilada. As placas foram incubadas a 30°C por 24 à 48 horas. As colônias de microrganismos isoladas foram repicadas em tubo de ensaio contendo o mesmo meio inclinado e incubadas a 30°C até o crescimento satisfatório das culturas.

### **3.2.1.3 Seleção preliminar de microrganismos produtores de ácidos graxos insaturados.**

Os microrganismos foram inoculados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 250mL, contendo 50mL de meio PYM líquido, previamente esterilizado. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm a temperatura de 24°C durante 72 horas. Após o tempo de incubação a biomassa foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos e lavada duas vezes com água destilada. O material foi transferido para placas de porcelana, lavado com acetona e seco à temperatura ambiente por 12 horas. As células foram rompidas por trituração em almofariz utilizando-se areia, como abrasivo, previamente tratada com HCl.

Os lipídeos totais foram extraídos, esterificados e ensaiados.

#### **3.2.1.4 - Padronização do inóculo**

O inóculo foi padronizado utilizando-se uma alçada de cultura pura das linhagens selecionadas dissolvidas em água destilada esterilizada. A solução de inóculo utilizada em todo o trabalho (1mL) continha  $10^{10}$  UFC/mL.

#### **3.2.2 - Extração e determinação do teor de lipídeos totais**

Para extração de lipídeos totais dos microrganismos foi utilizado o método de BLIGH e DYER (1959).

A biomassa triturada foi transferida para tubo de ensaio com rosca e foram adicionados 2mL de metanol, 1mL de clorofórmio e 8mL de água destilada, resultando numa proporção inicial de (2:1:0.8). A mistura foi agitada por inversão durante 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1mL de clorofórmio e 1mL de água destilada resultando numa proporção final de (2:2:1.8) para metanol, clorofórmio e água. Essa mistura foi novamente agitada por inversão durante 5 minutos.

As misturas foram deixadas em repouso até a separação total das fases. A camada superior, contendo metanol e água, foi retirada por vácuo e a camada inferior, contendo os lipídios dissolvidos em clorofórmio, foi filtrada em lã de vidro com sulfato de sódio anidro e recolhida em outro tubo de ensaio com rosca.

#### **3.2.3 - Preparação de ésteres metílicos dos ácidos graxos**

O método utilizado para metilação dos ácidos graxos foi baseado no método descrito por METCLAFE *et al.* (1966).

Os lipídeos obtidos foram saponificados através da adição de 4ml da solução de NaOH 0,5N em metanol. Os tubos de ensaio fechados foram

colocados em banho de água fervente por 3 minutos e em seguida resfriados em água corrente até a temperatura ambiente.

A esterificação das amostras foi realizada pela adição de 3 mL de  $\text{BF}_3$ . Os tubos fechados foram aquecidos em banho fervente por 2 minutos e resfriados rapidamente em água corrente até a temperatura ambiente. Após o resfriamento, foram adicionados 3mL de solução saturada de NaCl e 6mL de hexano. O tubo foi agitado vigorosamente e deixado em repouso até que houvesse separação das fases.

A fase superior (hexano) contendo os ésteres metílicos foi transferida para um tubo de ensaio. Após evaporação total do hexano as amostras foram guardadas em congelador para posteriores análises.

#### **3.2.4 - Determinação do peso seco da biomassa**

Os microrganismos foram inoculados em frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura (PYM) líquido previamente esterilizado foram incubados em agitador rotatório a 150 rpm e temperatura de 24°C por 72 horas.

Foram adicionados 200mL de água destilada ao meio de cultura. O meio foi então centrifugado à 8000 rpm por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante foi descartado e a massa celular foi lavada novamente com água destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições.

O sobrenadante foi descartado e a massa celular foi levada à estufa à vácuo em placas de porcelana previamente taradas. O peso seco da biomassa foi determinado em balança analítica até peso constante.

### **3.2.5 - Análise da composição de ácidos graxos por cromatografia em camada delgada (CCD)**

A preparação da placa para cromatografia em camada delgada foi realizada misturando-se 45g de sílica gel G-60 (MERK) com 90mL de solução de ácido bórico 0,3M. A mistura foi aplicada em placas de vidro 20X20 cm com 2mm de espessura com aplicador Desaga. As placas foram aquecidas em estufa à 110° C por uma hora para ativação antes de serem utilizadas.

Foram aplicados 100 $\mu$ L de ésteres metílicos de cada amostra na placa. O desenvolvimento do cromatograma foi realizado à temperatura de 25°C e o sistema solvente da fase móvel foi composto de hexano:éter etílico (90:10). Foram usados como padrões os ésteres metílicos de óleo de sardinha (poliinsaturados), óleo de oliva(monoinsaturado) e óleo de babaçu(saturado). A revelação do cromatograma foi feita através da aplicação de Iôdo sublimado, aquecendo-se a placa à 110°C por 20 minutos.

### **3.2.6 - Análise da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa.**

Após a metilação das amostras de lipídeos totais do microrganismo, os ésteres metílicos foram analisados por cromatografia gasosa.

A cromatografia foi realizada em coluna capilar Chrompack (CP - Sil - 88 Fused Sílica WCOT 0,25mm x 50m), com temperatura do detector de 270°C, temperatura do injetor de 250°C e a temperatura da coluna de 180°C por 12 min, com programação de 5°C/min até a temperatura máxima de 220°C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com fluxo de 2,0mL/min na coluna. O volume de amostra injetado foi de 3 $\mu$ L.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos componentes da amostra com os do padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos. A quantificação dos ácidos foi feita por normalização

e expressa em porcentagem relativa aos ácidos graxos totais utilizando-se o integrador PHILIPS PU4811.

### **3.2.7 - Estudo das condições de fermentação para obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos, da quantificação de biomassa, do teor de lipídeos totais e da porcentagem de lipídeos na massa seca.**

Os experimentos foram feitos com repetição em quadruplicata

#### **3.2.7.1 - Efeito da composição do meio de cultura na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos.**

As linhagens selecionadas foram cultivadas em diferentes meios com o objetivo de avaliar a composição de ácidos graxos. Os microrganismos foram inoculados em Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL dos meios de cultura de incubados a 24°C em agitador rotatório a 150 rpm por 72 horas. As composições, por litro, dos meios de cultura foram:

- MEIO 1(ML<sub>1</sub>) (ZACARIAS JACOB, 1988): Glicose 4,0g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,75g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,4g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,4g; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,285g; extrato de levedura 1,5g.

- MEIO 2(ML<sub>2</sub>) (L. M. GRANGER *et al.* 1993): Glicose 2,5g; extrato de levedura 1,0g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,4g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0g; traços de minerais 10mL; solução de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (24g/l) 1ml. A solução de minerais foi composta de: CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 3,6g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,75g; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,13g; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,13g; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,5g e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>7</sub> 0,12g.

- MEIO 3(ML<sub>3</sub>) (modificado de YAZAWA *et al.* 1988): Glicose 20g; peptona 10g, extrato de levedura 5,0g, extrato de carne 2,5g e 1000mL de água destilada.

- MEIO 4(ML<sub>4</sub>) (YAZAWA *et al.* 1988): Glicose 20g; peptona 10g, extrato de levedura 5,0g, extrato de carne 2,5g e 500mL de água destilada e 500mL de água do mar.

### **3.2.7.2 - Efeito de diferentes fontes de carbono na obtenção dos lipídeos totais, biomassa, porcentagem de lipídeos na massa seca e perfil cromatográfico dos ácidos graxos.**

Foram utilizadas como fonte de carbono glicose, sacarose, maltose, galactose, xilose, frutose e lactose de modo a obter-se 8g de carbono por litro de meio de cultura. Foram usados como fonte de nitrogênio extrato de levedura e peptona numa concentração de 13,5g/L e 6,18g/L respectivamente, resultando em 2g/L de nitrogênio no meio. A taxa C:N 4 foi mantida constante para todas as fontes de carbonos testadas. Os meios foram preparados em Erlenmeyer com capacidade de 250mL contendo 50mL de meio de cultura e incubados à 24°C em agitação constante por 72 horas.

### **3.2.7.3 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na obtenção dos lipídeos totais, biomassa, porcentagem de lipídeos na massa seca e perfil cromatográfico dos ácidos graxos.**

Foram utilizadas como fonte de nitrogênio extrato de levedura, peptona,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e uréia de modo a obter-se 2g de nitrogênio por litro de meio de cultura. Glicose na concentração de 20g/L foi usada como fonte de carbono. A taxa C:N 4 foi mantida constante para todas as fontes de nitrogênio testadas. Os meios foram preparados em Erlenmeyer com capacidade de 250mL contendo 50mL de meio de cultura e incubados à 24°C em agitação constante por 72 horas.

#### **3.2.7.4 - Efeito da taxa carbono:nitrogênio (C:N) na obtenção dos lipídeos totais, biomassa, porcentagem de lipídeos na massa seca e perfil cromatográfico dos ácidos graxos.**

Para verificar a influência da taxa C:N a concentração de extrato de levedura e peptona do meio de cultura foi modificada de tal modo a resultar em valores de 4, 10, 20, 40, 80, 100 e 120. A fonte de carbono usada foi a glicose numa concentração de 20g/L. Os meios foram preparados em Erlenmeyer com capacidade de 250mL contendo 50mL de meio de cultura e incubados à 24°C em agitação constante por 72 horas.

#### **3.2.7.5 - Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos.**

Para verificar o efeito de diferentes temperaturas e tempos de incubação no perfil cromatográfico, as linhagens selecionadas foram submetidas a três diferentes condições de cultivo. No primeiro tratamento (T1) a linhagem foi submetida a crescimento por 72 horas à 24°C em agitador rotatório. No segundo tratamento (T2), a linhagem foi cultivada à 24°C por 24 horas. Após esse período a temperatura foi alterada para 12°C e mantida constante por mais 48 horas. No terceiro tratamento (T3), a linhagem foi cultivada à 24°C por 72 horas. Após esse período a temperatura foi alterada para 12°C e mantida constante por mais 72 horas. Os meios foram preparados em Erlenmeyer com capacidade de 250mL contendo 50mL de meio de cultura. A fonte de carbono usada no meio de cultura foi a glicose a uma concentração de 20g/L e a fonte de nitrogênio foi extrato de levedura e peptona a uma concentração de 5g/L e 10g/L respectivamente, de modo a manter-se a taxa C:N igual a 4.

### **3.2.8 - Identificação das linhagens**

A identificação das linhagens selecionadas para o estudo do efeito das condições de cultivo foi realizada no laboratório da Coleção de Culturas Tropical, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.

### **3.2.9 - Determinação da glicose residual no meio de cultura**

O método utilizado baseia-se na oxidação enzimática da glicose pela glicose-oxidase à ácido glucônico e peróxido de hidrogênio.

De cada meio de cultura cultivado com o microrganismo selecionado em diferentes tempos de incubação foram retiradas amostras de 20 $\mu$ L. As amostras, contendo 20g/L de glicose e 13 g/L de extrato de levedura foram colocadas em tubos de ensaio pós diferentes tempos de incubação e colocadas em tubos de ensaio. Adicionou-se 2,0 mL do reativo de trabalho, preparado pela dissolução de 50 mL de solução de 4-aminofenazona 25mmol/L em tampão Tris-HCl 0,92 mol/L, 50 mL dos reativos fenol 55mmol e 3 mL de solução enzimática, composta de glicose-oxidase (>1.000U/ml) e peroxidase (>120U/ml) em 1 litro de água destilada. A mistura foi incubada em banho-maria à 37°C por 10 minutos. Após esse tempo a amostra foi submetida a espectrofotometria a 505nm, utilizando-se como padrão uma solução de glicose com concentração de 100mg/dL.

Cálculo:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \text{Abs. Amostra} \times 100 \text{ (mg/dL)} / \text{Abs. Padrão}$$

Abs. = absorvância a 505 nm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Isolamento de microrganismos

Foram isolados 625 microrganismos de vísceras de peixes de água salgada oriundos de diversos pontos de venda, supermercados, mercado municipal de Campinas e da cidade do Guarujá.

A coleta de amostras de vísceras de peixes como fonte de microrganismos foi baseada nos trabalhos de YAZAWA *et al.* (1988), que descreveram o isolamento de bactérias produtoras de ácido eicosapentaenóico (EPA) a partir de um isolamento de microrganismos marinhos utilizando meio PYM(1% de Peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,25% de extrato de carne, 2% de glicose, 50% de água destilada e 50% de água do mar) e incubação a 25°C durante 24 horas.

Estudos nutricionais e farmacológicos na fisiologia humana demonstraram que os ácidos graxos poliinsaturados, especialmente o EPA, o araquidônico e o docosahexaenóico (DHA) são efetivos na prevenção e cura da trombose, arteriosclerose e doenças do sistema circulatório.

O ácido eicosapentaenóico(EPA), C20:5, é convertido à prostaglandina I<sub>3</sub>, substância esta que evita a agregação de plaquetas e pode reduzir os níveis de lipídeos no homem e em rato (YAZAWA *et al.* 1988). Estes estudos mostram que os ácidos graxos poliinsaturados são essenciais na manutenção da homeostase humana.

Estes ácidos graxos ocorrem largamente em óleo de peixe marinho. Contudo, o conteúdo desses ácidos nesses óleos é muito baixo e sua extração se torna difícil. Por estas razões, este trabalho buscou encontrar fonte alternativa desses ácidos graxos em microrganismos de origem marinha, com base na cadeia alimentar do peixe.

GELLERMAN & SCHLENK (1979) observaram que lipídeos de *Saprolegnia parasitico*, um fungo parasita de peixes, contém EPA como constituinte celular. WIRSEN *et al.* (1987) estudaram uma bactéria marinha pertencente ao gênero *Alteromonas*, que contém ácido graxo poliinsaturado. W. YONGMANITCHAI &

O.P. WARD (1991) estudaram a produção de ácidos graxos  $\omega$ -3 por uma alga, *Phaeodactylum tricornutum*, em diferentes condições de cultivo.

YANO *et al.* (1994) estudaram a produção de ácido docosahexaenóico (DHA) por uma bactéria marinha isolada do intestino de peixes de águas profundas. Esta linhagem pertence ao gênero *vibrio*, é flagelada, Gram-negativa, com motilidade, anaeróbico facultativo e requer água do mar para seu crescimento. Este ácido graxo é conhecido por ser essencial para o crescimento normal de peixes no estágio de larvas. A produção de DHA por bactérias é de interesse devido a facilidade em cultivá-las em modernos equipamentos biotecnológicos. DE LONG, E.F. & YAYANOS, A. A. (1986) também encontraram bactérias produtoras de DHA em bactérias isoladas de peixes de águas profundas.

AKIMOTO *et al.* (1990) verificaram que uma linhagem de bactéria isolada a partir de intestinos de mackerel, *Pneumatophorus japonicus*, contém altos níveis de EPA nos lipídeos celulares e determinaram a produtividade desse ácido graxo sob condições ótimas de cultivo.

Recentemente vários produtos de óleo de peixe marinho têm se tornado disponíveis como fonte de EPA. Contudo esta fonte convencional de EPA não é satisfatória para o propósito prático devido ao seu baixo conteúdo deste ácido devido a mistura com outros ácidos graxos.

## **4.2 - Seleção de microrganismos**

Após o isolamento dos 625 microrganismos, os lipídeos totais extraídos de cada um dos microrganismos foram esterificados à ésteres metílicos de ácidos graxos e analisados primeiramente através da cromatografia em camada delgada.

Nesta etapa foi tomado como parâmetro a comparação entre a taxa de fluxo(RF) dos ácidos graxos padrões e os obtidos com os lipídeos dos microrganismos.

Portanto, o critério aplicado na pré-seleção foi a comparação encontrada entre o perfil cromatográfico dos ésteres metílicos das amostras e o perfil cromatográfico do éster metílico de óleo de sardinha, tendo sido pré selecionadas 300 linhagens.

Numa segunda etapa de pré-seleção os 300 ésteres de ácidos graxos provenientes dos lipídeos das linhagens estudadas foram analisados através de cromatografia gasosa.

Nesta etapa foi utilizado como parâmetro o perfil cromatográfico dos ésteres metílicos obtidos por cromatografia gasosa, sendo selecionadas 34 linhagens de microrganismos, dentre os que apresentaram em sua composição ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados. O critério aplicado nesta etapa de seleção foi a composição de lipídeos.

Numa etapa posterior de seleção, e levando-se em consideração a adequação das linhagens selecionadas à modificações da temperatura e do tempo de crescimento, foram selecionadas 13 linhagens de microrganismos, tendo como critério a composição de lipídeos.

Destas linhagens analisadas foram selecionadas duas levando-se em consideração a composição e a proporção de ácidos graxos. Tendo sido feita a seleção as duas linhagens foram catalogadas dentro da coleção de culturas do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Engenharia de Alimentos como n° 144 e n° 377. Posteriormente foram identificadas quanto ao gênero e espécie. Estes microrganismos foram selecionados para estudo do efeito das condições de fermentação no perfil dos ácidos graxos .

O fluxograma de isolamento e seleção dos microrganismos estudados está ilustrado na figura 01.

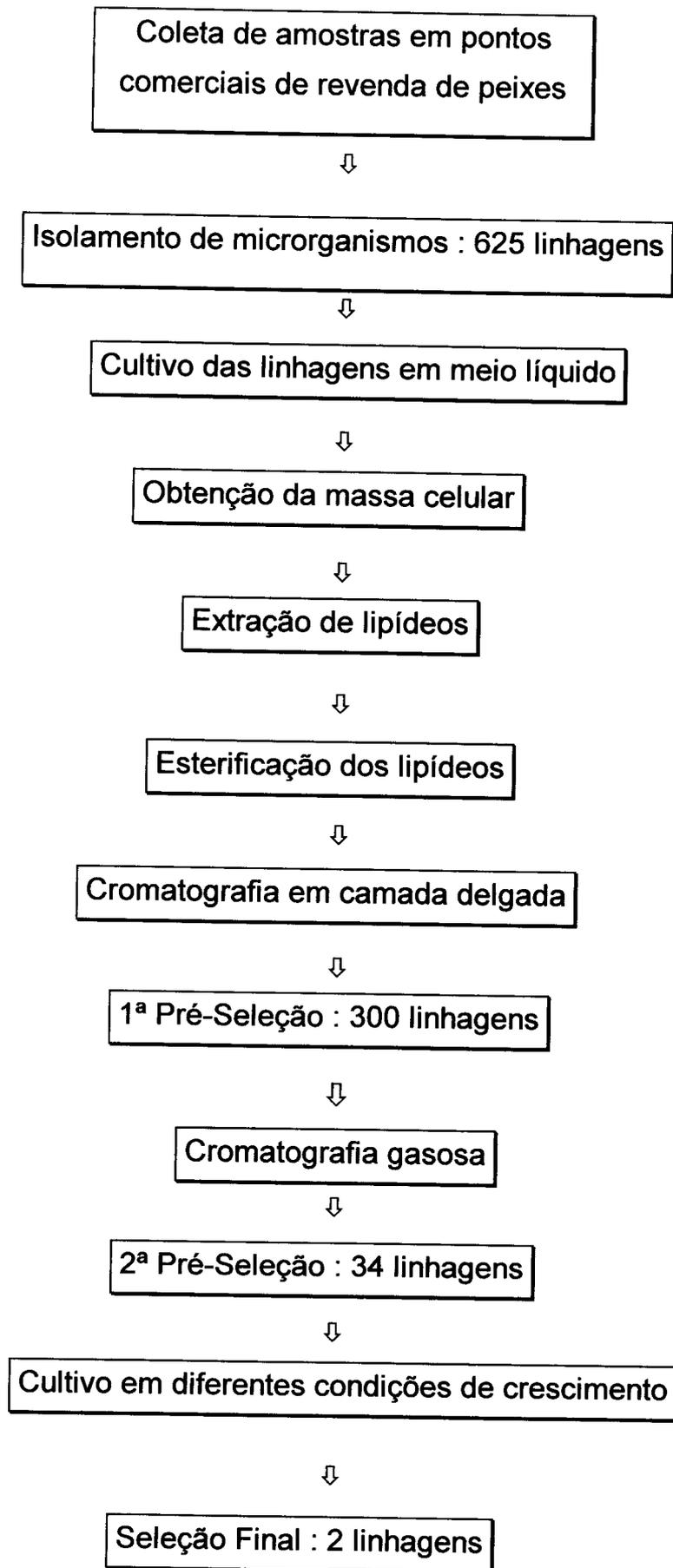


Fig.1- Fluxograma da Seleção de Microrganismos Produtores de Ácidos Graxos

### 4.3 Identificação das linhagens selecionadas

As culturas puras das linhagens selecionadas foram enviadas para a Fundação Tropical André Tosello para a determinação do gênero e espécie através de análise taxonômica e bioquímica das linhagens, tendo sido identificada a linhagem 144 como *Candida fabianii* e a linhagem 377 como *Trichosporon brassicae*.

#### 4.3.1 Características morfológicas da levedura *Candida fabianni*

##### 1. Morfologia em meio sólido (YM / 28°C/48 h) :

Forma: redonda

Pigmentação : branca

Superfície : lisa

Textura : cremosa

Borda : inteira

##### 2. Crescimento e morfologia celular em meio líquido sólido (YM/ 28°C/48 h) :

Película: incompleta, delgada, opaca e lisa

Forma: globosa

Sedimento : moderado e mucóide

Anel : incompleto e delgado

Reprodução : gemulação multipolar

##### 3. Esporulação (acetato ágar/ 3,4 e 8 dias / 28°C) :

Asco : -

esporo : -

Conjugação : -

Nº de esporos/asco : -

##### 4. Microcultivo (CMA / 7 dias / 28°C)

Pseudohifas/hifas : pseudohifas com blastosporos intercalares

##### 5. Produção de balistosporos : -

### **4.3.2 Características morfológicas da levedura *Trichosporon brassicae***

#### **1. Morfologia em meio sólido (YM / 28°C/48 h) :**

Forma: filamentosa

Pigmentação : branca

Superfície : hirsuta

Textura : compacta

Borda : ciliada

#### **2. Crescimento e morfologia celular em meio líquido sólido (YM/ 28°C/48 h) :**

Película: incompleta, espessa, opaca e rugosa

Forma: globosa

Sedimento : abundante e floculento

Anel: incompleto e espesso

Reprodução : gemulação e fissão

#### **3. Esporulação (acetato ágar/ 3,4 e 8 dias / 28°C) :**

Asco : -

esporo : -

Conjugação : -

Nº de esporos/asco : -

#### **4. Microcultivo (CMA / 7 dias / 28°C)**

Pseudohifas/hifas : hifas verdadeiras

#### **5. Produção de balistosporos : -**

#### 4.4 - Análise da composição de ácidos graxos presentes nos lipídeos obtidos das linhagens selecionadas.

A caracterização dos ácidos graxos presentes nos lipídeos extraídos dos microrganismos selecionados foi feita através de cromatografia gasosa, utilizando-se a comparação entre os tempos de retenção dos ácidos graxos padrão (ácido oléico, linoléico, palmítico, palmitoléico, linolênico e esteárico).

Os ácidos graxos encontrados nas linhagens *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae* em maior proporção, ilustrados na Tabela 4, estão de acordo com os trabalhos relatados na literatura.

Observando a composição dos ésteres de ácidos graxos das leveduras *C. fabianni* e *T. brassicae*, podemos observar que, para ambas as linhagens, os ésteres do ácido oléico, linoléico e palmítico foram encontrados em maior proporção relativa, respectivamente. Foi observado também que a proporção e composição de ácidos graxos das duas leveduras diferem de maneira significativa e que a levedura *C. fabianni* possui mais ácidos graxos insaturados do que a levedura *T. brassicae*.

GILL *et al.* (1977) estudaram a composição de ácidos graxos produzidos por *Candida 107* e observaram que o ácido graxo encontrado em maior proporção foi o ácido oléico (40%), seguido de ácido linoléico (24%), ácido palmítico (20%), ácido esteárico (7%) e ácido palmitoléico (1,6%) e traços de ácido linolênico.

Os resultados obtidos estão, em parte, de acordo com as observações de RATLEDGE (1982), que estudando a composição de ácidos graxos de leveduras concluiu que os ésteres de ácidos graxos encontrados em maior concentração são respectivamente os ésteres de ácido oléico, palmítico e linoléico.

YOON *et al.* (1982) estudaram a composição de lipídeos da levedura *Rhodotorula gracilis* e observaram que os lipídeos isolados eram compostos de 84,1% de lipídeos neutros, 13,7% de glicolipídeos e 2,2% de fosfolipídeos. Os ácidos graxos dos lipídeos neutros foram 55,6% de ácido oléico, 12,5 % de ácido linoléico, 11,3% de ácido esteárico, 11,0% de ácido palmítico, 4,5% de ácido linolênico e 1,2% de ácido araquidônico.

EVANS & RATLEDGE (1983) estudaram a composição dos ácidos graxos da levedura oleaginosa *Candida curvata* D e observaram que os ácidos graxos

encontrados em maior proporção foram o ácido palmítico, o ácido esteárico, o ácido oléico e o ácido linoléico.

Em contrapartida, TAHOUN *et al.* (1987) estudaram a composição de ácidos graxos de *Trichosporon beigeli*, utilizando lactose como fonte de carbono com três dias de incubação à 28°C em agitador rotatório de 125 rpm. Eles observaram que os ácidos graxos encontrados em maior proporção foram os insaturados, seguidos do ácido linoléico e oléico.

TURCOTTE & KOSARIC (1989) encontraram que a composição de ácidos graxos da levedura *Rhodospordium toruloides* ATCC 10788 foi formada de ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoléico e ácido linolênico.

HASSAN *et al.* (1994) encontraram que a composição dos ácidos graxos da levedura *Cryptococcus curvatus* foi de ácido oléico, ácido palmítico, ácido linoléico e ácido linolênico.

Tabela 4 - Composição de ácidos graxos em ordem decrescente de proporção.

<i>Candida fabianii</i>	Ácido oléico (18:1)
	Ácido linoléico (18:2)
	Ácido palmitoléico (16:1)
	Ácido palmítico (16:0)
	Ácido esteárico (18:0)
	Ácido linolênico (18:3)
<i>Trichosporon brassicae</i>	Ácido oléico (18:1)
	Ácido palmítico (16:0)
	Ácido esteárico (18:0)
	Ácido linoléico (18:2)
	Ácido linolênico (18:3)

#### 4.5 - Determinação do teor de lipídeos totais, biomassa seca e porcentagem de lipídeos na biomassa seca das leveduras selecionadas.

O teor de lipídeos totais das leveduras selecionadas foram obtidos por extração segundo o método descrito por BLIGH & DYER (1959). A biomassa seca foi obtida conforme descrito no item 3.4.

As leveduras selecionadas foram cultivadas em meio líquido, contendo glicose como fonte de carbono, extrato de levedura e peptona como fontes de nitrogênio e a razão C:N 4. As linhagens foram inoculadas em 50 ml de meio de cultivo e incubadas por 72 horas à 24°C, em agitador rotatório com 150 rpm.

De acordo com a tabela 5, pode-se observar que apesar das duas leveduras apresentarem aproximadamente o mesmo valor de biomassa seca, a porcentagem de lipídeos em relação à biomassa seca da levedura *T. brassicae* é maior do que da levedura *C. fabianii*.

Tabela 5 - Teor de lipídeos totais, biomassa seca e porcentagem de lipídeos na biomassa seca das leveduras selecionadas

	<b>Biomassa seca (g/l)</b>	<b>Lipídeos totais (g/l)</b>	<b>Lipídeos totais / Biomassa seca (%p/p)</b>
<b><i>C. fabianii</i></b>	9,22 ± 0,040	0,151 ± 0,04	1,60 ± 0,033
<b><i>T. brassicae</i></b>	11,02 ± 0,070	0,52 ± 0,010	4,8 ± 0,060

#### **4.6 - Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos das linhagens selecionadas.**

Tanto a temperatura quanto o tempo de incubação são importantes parâmetros na caracterização da composição de ácidos graxos em leveduras, levando esse fato em consideração, foi analisado o efeito da temperatura e do tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos das linhagens selecionadas.

A partir dos dados contidos na tabela 6 e ilustrados na figura 2, pôde-se observar que para a levedura *Candida fabianii* a proporção relativa dos ácidos graxos palmítico, palmitoléico, esteárico e linoléico diminui com o aumento do tempo de cultivo ao passo que a proporção relativa de ácido oléico aumenta com os diferentes tratamentos. Enquanto que o teor do ácido linolênico não sofre alteração significativa na proporção relativa frente aos diferentes tratamentos.

A partir dos dados contidos na tabela 7 e ilustrado na figura 3, pôde-se observar que para a levedura *Trichosporon brassicae* a proporção relativa de ácido palmítico e esteárico diminui com o aumento do tempo de cultivo. O ácido linolênico teve uma maior proporção relativa quando a levedura foi submetida às condições de tratamento  $T_2$  e não mostrou diferença significativas na sua proporção no tratamento  $T_1$  e  $T_3$ . No entanto, foi observada uma diminuição na proporção relativa dos ácidos linoléico e linolênico quando a levedura foi submetida ao tratamento  $T_3$ , provavelmente devido ao tempo de cultivo prolongado.

A proporção relativa de ácido oléico aumentou com o aumento da temperatura e tempo de cultivo quando as leveduras foram submetidas aos 3 tratamentos, enquanto que a proporção de ácido palmítico e esteárico diminuiu. Esses dados estão de acordo com RATLEGDE (1982) que observou que com a diminuição da temperatura há um aumento dos ácidos graxos insaturados, devido à ativação das enzimas dessaturases. No entanto, foi observada uma diminuição na proporção relativa dos ácidos linoléico e linolênico quando a levedura foi submetida ao tratamento  $T_3$ , provavelmente devido ao tempo de cultivo prolongado. O ácido oléico foi o ácido graxo encontrado em maior proporção relativa nas duas leveduras, quando submetidas aos três tratamentos.

Entretanto não há evidências claras de que o perfil cromatográfico dos ácidos graxos identificados para ambas as linhagens seja influenciado pela variação da temperatura e tempo de incubação nessas condições estudadas.

GRANGER *et al.* (1992) estudaram o efeito da temperatura na produção de lipídeos por uma levedura oleaginosa *Rhodotorula glutins* e observaram que a redução da temperatura de cultivo de 30°C para 25°C resultou numa diminuição do crescimento e na síntese de produtos, contudo o conteúdo de ácido linoléico e  $\alpha$ -linolênico foi provavelmente devido à ação das enzimas dessaturases, que mantêm constante a fluidez da membrana.

O conteúdo dos ácidos graxos insaturados e poliinsaturados nas células pode aumentar devido à mudanças na composição do meio e na temperatura de cultivo e que a idade da cultura também pode aumentar a quantidade desses ácidos graxos, pois a acumulação de lipídeos e o perfil de ácidos graxos resultam numa interação dinâmica entre cinética de crescimento e síntese de ácidos graxos.

HASSAN *et al.* (1994) estudaram a produção de lipídeos da levedura *Cryptococcus curvatus* em relação à composição do extrato lipídico usando como substrato fontes de carbono de baixo valor econômico. Foi verificado que o ácido oléico e o ácido palmítico estiveram sempre predominantes e aumentaram com o aumento do tempo de cultivo, indicando que os dois são produzidos para estocagem durante o processo de acumulação de lipídeos. Contudo, a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente linoléico e linolênico diminuíram com o aumento do tempo de cultivo.

Tabela 6 - Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura *Candida fabianii*.

		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Palmítico	(16:0)	14,5%	11%	9,5%
Palmitoléico	(16:1)	10,0%	7,2%	7,8%
Estearico	(18:0)	3,2%	3,0%	1,2%
Oléico	(18:1)	39,5%	31,8%	48,3%
Linoléico	(18:2)	22,2%	24,6%	18,8%
Linolênico	(18:3)	4,7%	5,8%	3,9%

T<sub>1</sub> (crescimento por 72h à 24°C), T<sub>2</sub> (crescimento por 24h à 24°C e 48h à 12°C) e

T<sub>3</sub> (crescimento por 72h à 24°C e 72h à 12°C)

Tabela 7 - Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura *Trichosporon brassicae*.

		T1	T2	T3
Palmítico	(16:0)	13,0%	13,5%	11,8%
Estearico	(18:0)	7,6%	3,8%	4,3%
Oléico	(18:1)	49,6%	37,4%	56,6%
Linoléico	(18:2)	17,0%	25,3%	18,0%
Linolênico	(18:3)	2,7%	4,7%	2,3%

T<sub>1</sub> (crescimento por 72h à 24°C), T<sub>2</sub> (crescimento por 24h à 24°C e 48h à 12°C) e

T<sub>3</sub> (crescimento por 72h à 24°C e 72h à 12°C)

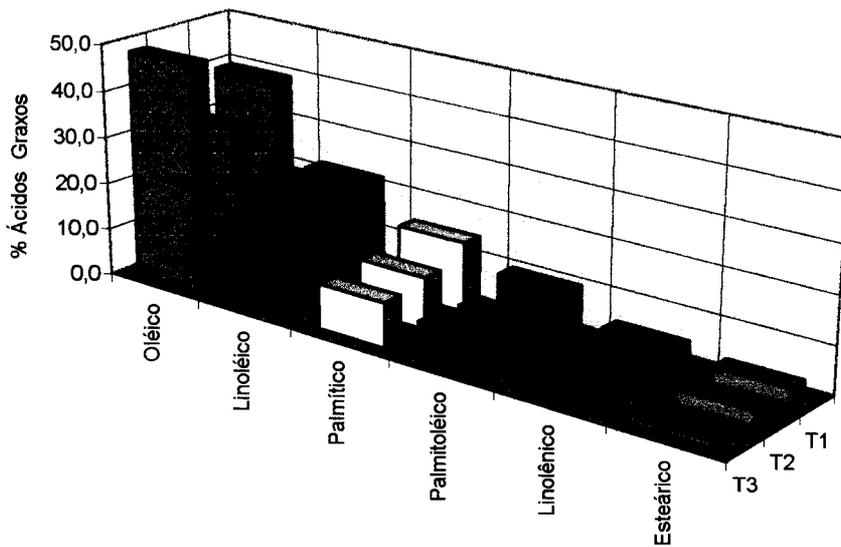


Fig.2 - Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura *Candida fabianii*.

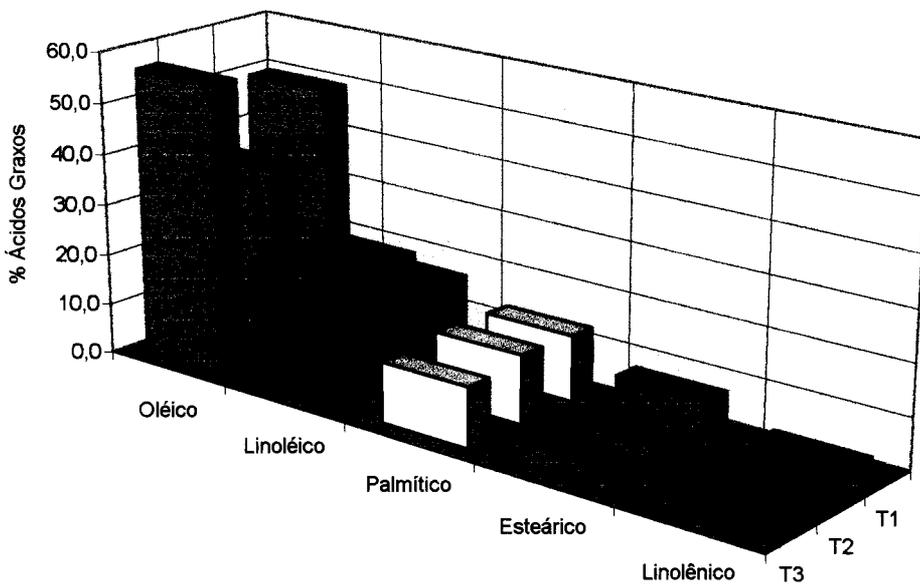


Fig.3 - Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura *Trichosporon brassicae*.

#### **4.7 - Efeito da composição do meio de cultura no perfil cromatográfico dos ácidos graxos.**

Observando a composição dos ácidos graxos da levedura *Candida fabianii* (tabela 8 e figuras 4 e 5) e da levedura *Trichosporon brassicae* (tabela 9 e figuras 6 e 7) em diferentes meios de cultivos, pode-se observar que, para ambas linhagens, os ácidos oléico, linoléico e palmítico foram encontrados em maior proporção relativa respectivamente. Apesar da variação nas quantidades de cada ácido graxo nos diferentes meios de crescimento, não há evidências claras de que o perfil cromatográfico dos ésteres de ácidos graxos para ambas as linhagens seja influenciado pela variação dos meios testados neste trabalho.

Foi escolhido, então, o meio ML<sub>4</sub> para continuidade dos estudos devido à facilidade na obtenção de seus componentes.

TAHOUN *et al.* (1987) verificaram que a composição do meio afeta a composição dos ácidos graxos dos triacilgliceróis celulares de algumas leveduras, mas que essas modificações estão relacionadas com as condições de nitrogênio e carbono limitante.

Os triacilgliceróis de leveduras crescidas em meio com carbono limitante contém quantidades elevadas de ácido oléico, linoléico e ácidos graxos insaturados enquanto que os triacilgliceróis de leveduras crescidas em meio com nitrogênio limitante possui os mesmos ácidos graxos em quantidades menores (RATLEDGE, 1982). Ou seja, as modificações na composição dos ácidos graxos de leveduras não está relacionado somente com a composição do meio de cultivo, mas principalmente, com as condições de cultivo nas quais os microrganismos são crescidos. Como por exemplo, temperatura, tempo, tipos de sistemas de cultivo, pH, aeração, fonte de carbono e nitrogênio, taxa C:N e a linhagem do microrganismo.

As condições de cultivo e composição do meio de cultura influenciam tanto na quantidade, quanto na composição de lipídeos de microrganismos. Como por exemplo, em cultivo em batelada a proporção dos ácidos graxos de lipídeos varia durante o curso de fermentação pois, a composição do meio é modificada por cada geração sucessiva de células, resultando num crescimento desbalanceado.

Com isso, pode-se concluir que, se esses parâmetros são controlados, a composição de ácidos graxos também é afetada por mudanças na taxa de crescimento do organismo e pela concentração de substrato no meio.

Usando um sistema de cultivo contínuo, onde se pode manter a taxa de crescimento do organismo constante, GOULET (1975), YOON & RHEE (1983) e GHOSE *et al.* (1987) observaram uma porcentagem de lipídeos na biomassa similar àquela encontrada em cultura em batelada.

As linhagens estudadas foram cultivadas usando diferentes concentrações de NaCl no meio de cultivo e foi observado que as leveduras *C.fabianii* e *T.brassicae* não tem seu perfil de ácidos graxos influenciado por este parâmetro.

No entanto, esse parâmetro tem influenciado a composição de ácidos graxos de algumas leveduras. O efeito do estresse salino na composição de ácidos graxos em diferentes linhagens de leveduras do gênero *Dipodascus* e *Dipodascopsis* foi estudado por SAJBIDOR *et al.* (1994). Eles observaram que o conteúdo de C18:2 aumentou em *D. reessi*, *D. tetrasperma* e em *D. australiensis*. Tanto o conteúdo de C18:1 quanto de C18:2 diminuíram para *D. tothii* e *D. aggregatus* com o aumento de C14:1 e C16:1. Na linhagem *D. uninucleata* não apresentou mudança significativa na composição de ácidos graxos. O NaCl inibiu a acumulação de lipídeos em todas as linhagens, com exceção da *D. aggregatus*.

Tabela 8 - Efeito da composição do meio de cultura na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura *Candida fabianii*.

		ML <sub>1</sub>	ML <sub>2</sub>	ML <sub>3</sub>	ML <sub>4</sub>
Palmítico	(16:0)	11%	12,0%	11,9%	13,8%
Palmitoléico	(16:1)	7,2%	8,3%	9,5%	8,9%
Estearico	(18:0)	3%	1,6%	2,0%	1,3%
Oléico	(18:1)	31,8%	41,0%	36,0%	33,7%
Linoléico	(18:2)	24,6%	17,0%	27,3%	24,4%
Linolênico	(18:3)	5,8%	6,8%	5,8%	8,3%

Tabela 9 - Efeito da temperatura e tempo de incubação na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura *Trichosporon brassicae*.

		ML <sub>1</sub>	ML <sub>2</sub>	ML <sub>3</sub>	ML <sub>4</sub>
Palmítico	(16:0)	9,3%	8,2%	12,8%	17,4%
Estearico	(18:0)	3,3%	4,8%	9,7%	11,8%
Oléico	(18:1)	36,1%	32,4%	41,8%	53,3%
Linoléico	(18:2)	13,7%	10,7%	13,5%	8,8%
Linolênico	(18:3)	4,7%	2,4%	3,0%	3,0%

Legenda referente às Tabelas 8 e 9:

- **ML<sub>1</sub>** : Glicose 4,0g;  $KH_2PO_4$  0,75g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,4g;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0,4g;  $NH_4NO_3$  0,285g; extrato de levedura 1,5g.

- **ML<sub>2</sub>** : Glicose 2,5g; extrato de levedura 1,0g;  $KH_2PO_4$  1,0g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,4g;  $(NH_4)_2SO_4$  1,0g; traços de minerais 10ml; solução de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (24g/l) 1ml. A solução de minerais foi composta de:  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  3,6g;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,75g;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,13g;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0,13g;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0,5g e  $(NH_4)_2MoO_7$  0,12g.

- **ML<sub>3</sub>** : Glicose 20g; peptona 10, extrato de levedura 5,0g, extrato de carne 2,5g e 1000ml de água destilada.

- **ML<sub>4</sub>** : Glicose 20g; peptona 10g, extrato de levedura 5,0g, extrato de carne 2,5g e 500ml de água destilada e 500ml de água do mar.

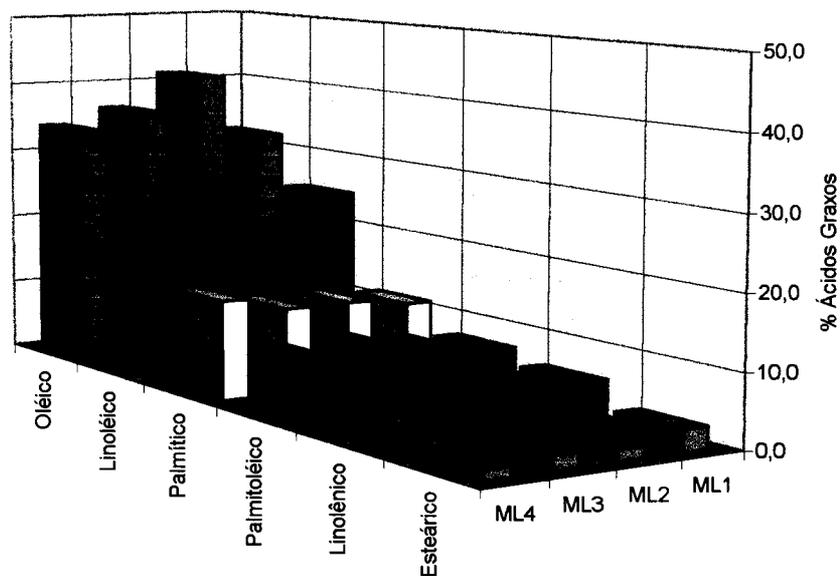


Fig.4 - Efeito da composição do meio de cultura na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura *Candida fabianii*.

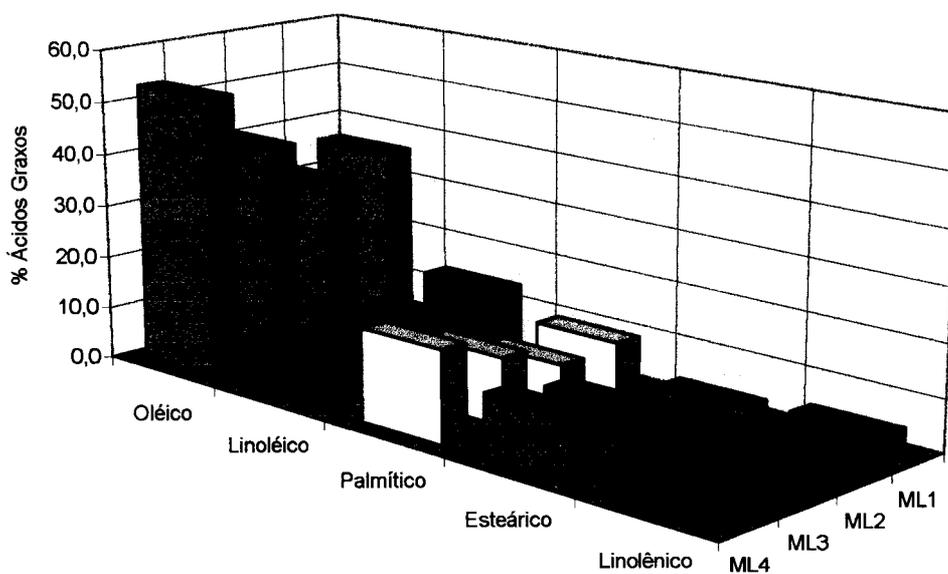
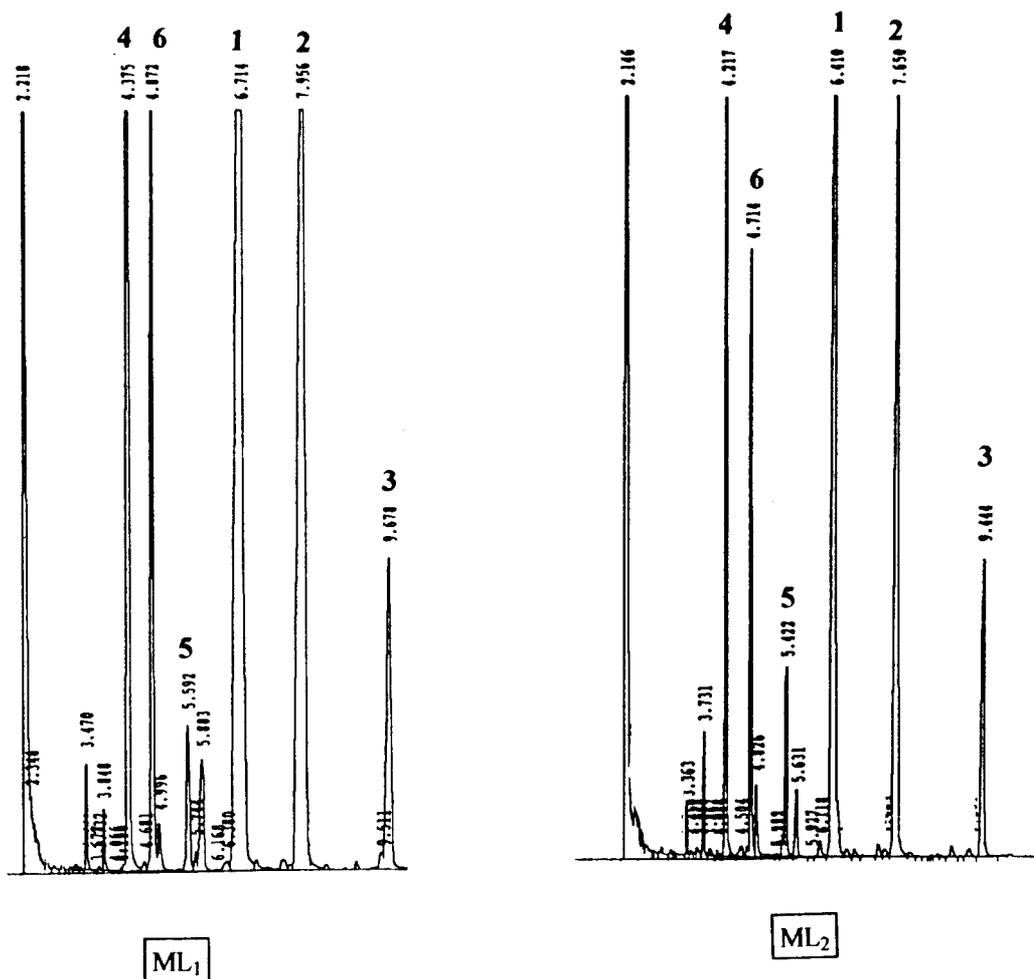


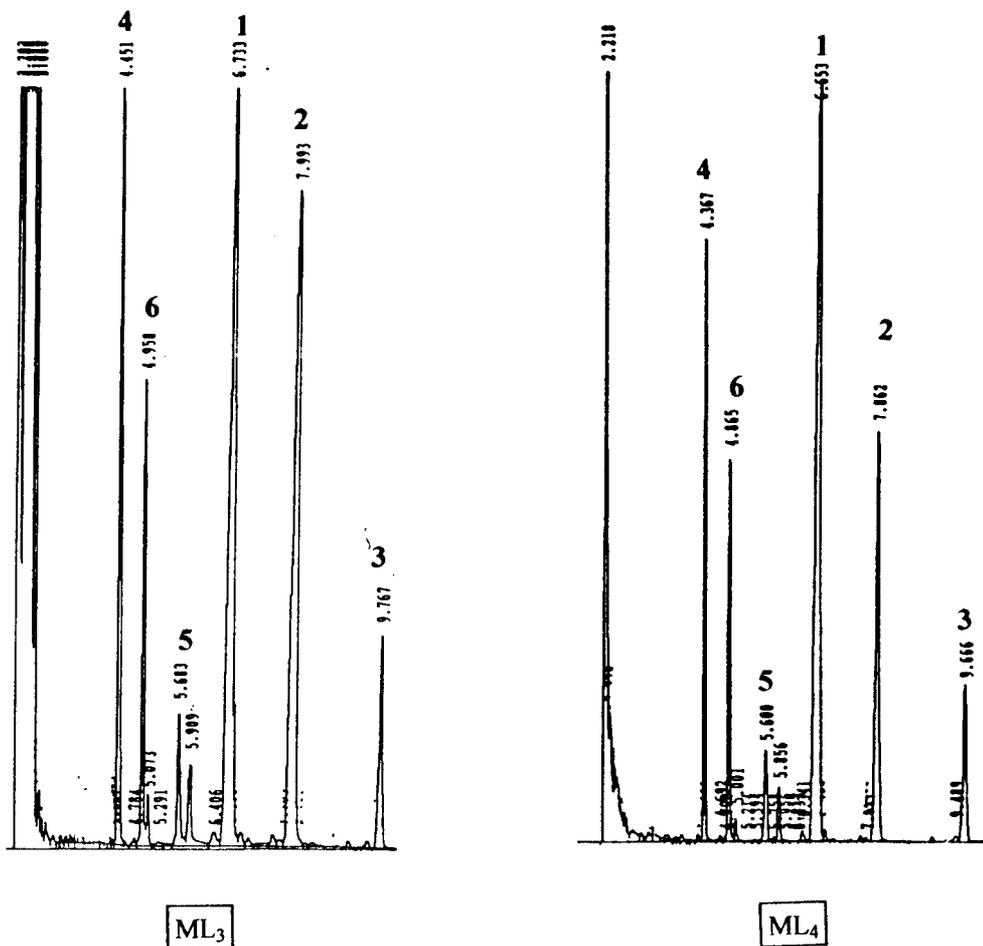
Fig.6 - Efeito da composição do meio de cultura na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura *Trichosporon brassicae*.



**Legenda:**

1. Ácido oléico
2. Ácido linoléico
3. Ácido linolênico
4. Ácido palmítico
5. Ácido estereárico
6. Ácido palmitoléico

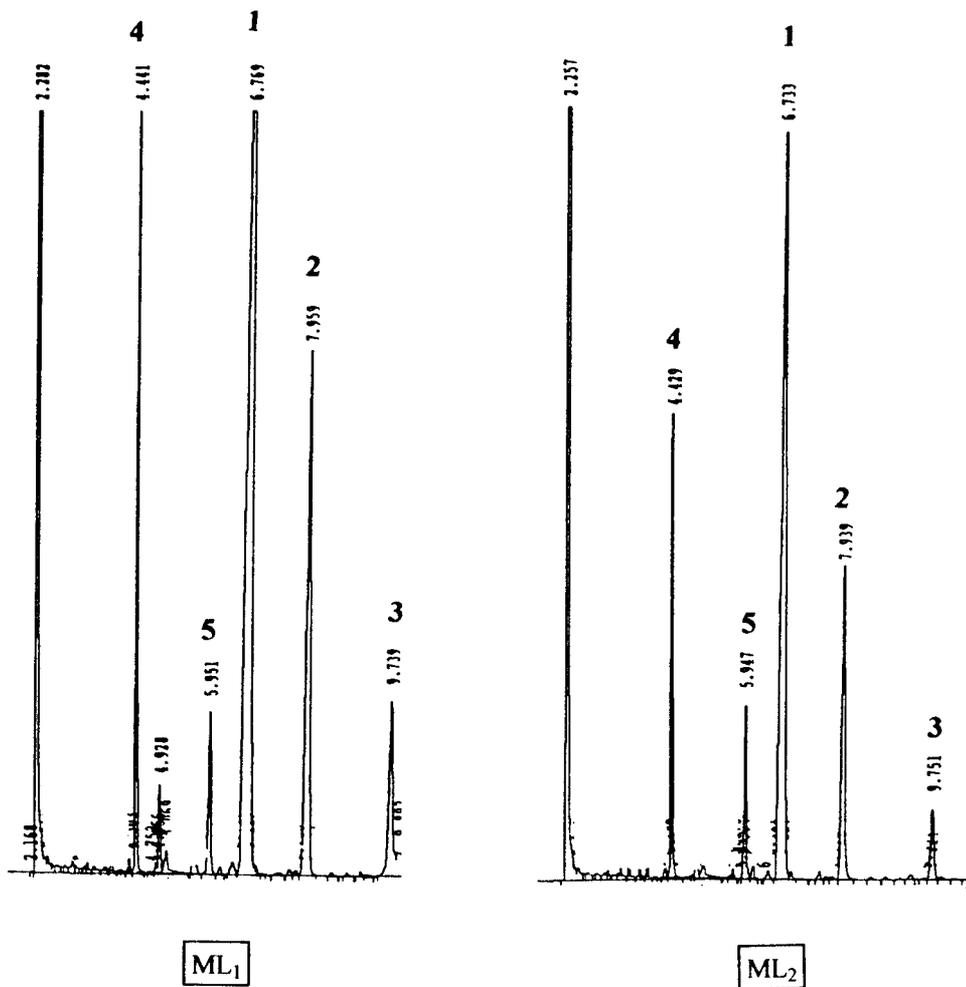
Fig. 5a - Composição de ácidos graxos da linhagem *Candida fabianii* obtida por cromatografia gasosa, em diferentes condições de incubação.



**Legenda:**

1. Ácido oléico
2. Ácido linoléico
3. Ácido linolênico
4. Ácido palmítico
5. Ácido estereárico
6. Ácido palmitoléico

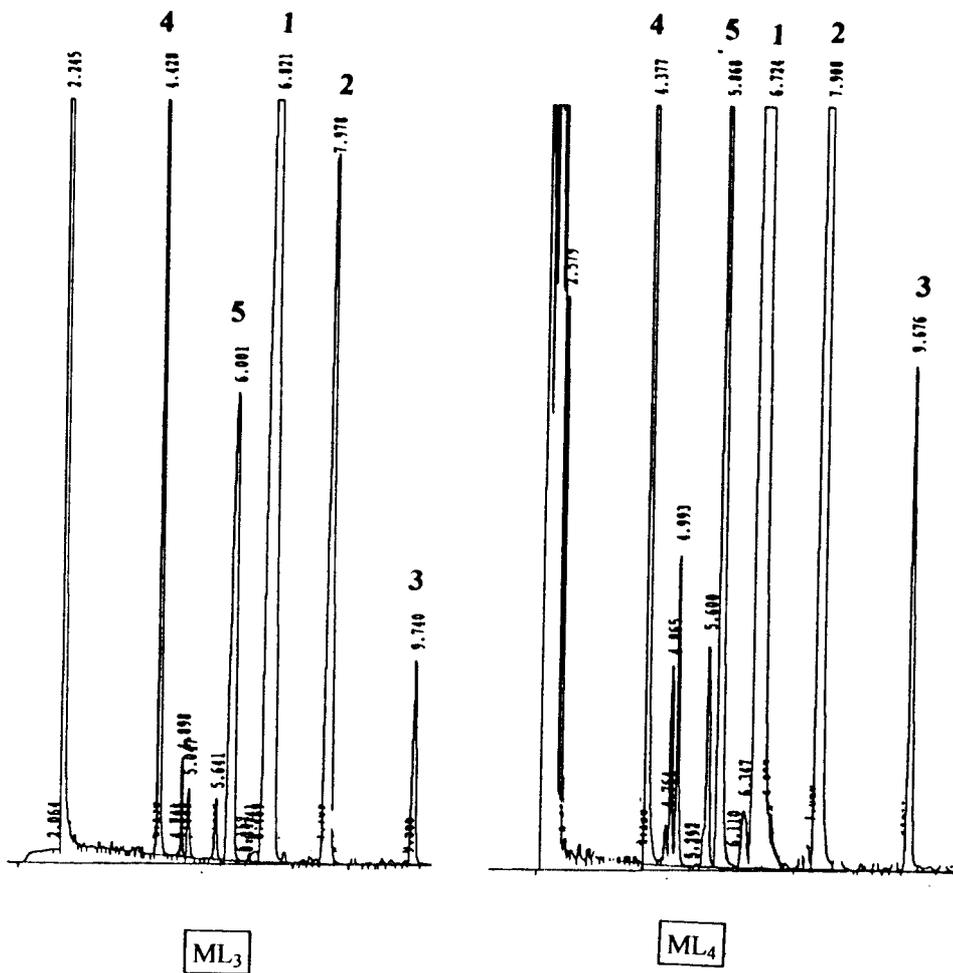
Fig. 5b - Composição de ácidos graxos da linhagem *Candida fabianii* obtida por cromatografia gasosa, em diferentes condições de incubação.



**Legenda:**

1. Ácido oléico
2. Ácido linoléico
3. Ácido linolênico
4. Ácido palmítico
5. Ácido estereárico

Fig. 7a - Composição de ácidos graxos da linhagem *Trichosporon brassicae* obtida por cromatografia gasosa, em diferentes condições de incubação.



**Legenda:**

1. Ácido oléico
2. Ácido linoléico
3. Ácido linolênico
4. Ácido palmítico
5. Ácido estereárico

Fig. 7b - Composição de ácidos graxos da linhagem *Trichosporon brassicae* obtida por cromatografia gasosa, em diferentes condições de incubação.

#### 4.8 - Estudo da curva de crescimento das linhagens selecionadas

A figura 8 representa a curva de crescimento da levedura *Candida fabianii*. Esta curva mostra que o máximo de biomassa seca é obtido a partir de 20 horas de fermentação e que após esse período a concentração de biomassa seca permaneceu constante no meio.

A figura 9 representa a curva de crescimento da levedura *Trichosporon brassicae*. Esta curva mostra que o máximo de biomassa seca é obtido a partir de 72 horas de fermentação e que após esse período a concentração de biomassa seca permaneceu constante no meio.

Portanto, o tempo de fermentação adotado em todos os experimentos foi de 72 horas, visto que este é o tempo mínimo comum no processo fermentativo de ambas as leveduras em que foi atingido o máximo de biomassa seca.

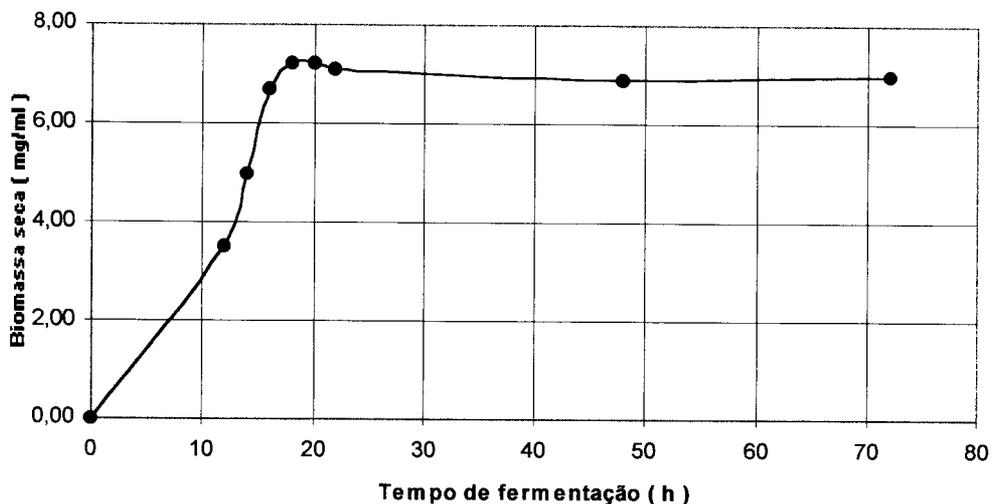


Fig.8 - Estudo da Influência do tempo de fermentação na concentração de biomassa seca por *Candida fabianii*.

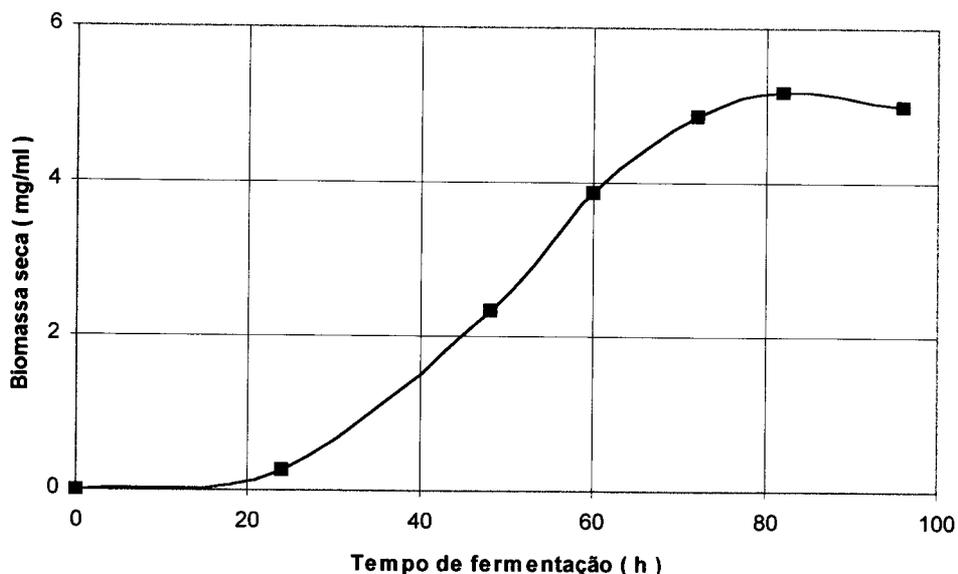


Fig.9 - Estudo da Influência do tempo de fermentação na concentração de biomassa seca por *Trichosporon brassicae*.

#### 4.9 Estudo da influência de diferentes fontes de carbono no perfil cromatográfico dos ácidos graxos.

O perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura *C.fabianii* foi estudado utilizando-se diferentes fontes de carbono. A partir dos dados contidos na tabela 10 e ilustrados na figura 10 pôde-se analisar a porcentagem relativa de cada ácido graxo em cada fonte de carbono testada.

Pôde-se observar que o ácido oléico foi o ácido graxo encontrado em maior proporção relativa em todas as fontes de carbono testadas, mas apresentou diferença significativa na proporção relativa com a variação da fonte de carbono. Quando utilizou-se glicose e xilose esse ácido apresentou maior proporção relativa do que quando utilizou-se galactose e sacarose, onde houve uma diminuição de 30% na quantidade, resultando numa menor proporção relativa dentre as fontes testadas.

O ácido linoléico apresentou uma grande variação na proporção relativa quando houve mudança na fonte de carbono. Utilizando-se sacarose, maltose e galactose esse ácido foi encontrado como o segundo ácido graxo mais

abundante nessa linhagem. No entanto, foi encontrado em menor proporção relativa quando utilizou-se xilose e glicose, havendo uma diminuição de 64% na proporção relativa nessas condições testadas.

Observando o comportamento do ácido palmítico em relação às diferentes fontes de carbono pôde-se observar que a maior proporção relativa desse ácido graxo foi encontrado quando se utilizou glicose e lactose. Utilizando-se xilose, sacarose, maltose, frutose e galactose esse ácido graxo teve uma diminuição de aproximadamente 30%. Esse ácido graxo foi encontrado como o segundo ácido graxo de maior proporção relativa quando se utilizou glicose, xilose, lactose e frutose.

O ácido esteárico apresentou uma significativa variação na sua proporção relativa quando houve mudança na fonte de carbono. Esse ácido graxo foi encontrado em maior proporção relativa quando glicose e lactose foram utilizadas como fonte de carbono e uma menor proporção utilizando-se maltose. Não houve diferenças significativas na proporção quando se usou galactose, sacarose, xilose e frutose.

O ácido linolênico foi o ácido graxo encontrado em menor proporção relativa em todas as fontes de carbono testadas, com exceção da maltose, na qual não foi encontrado esse ácido graxo.

O perfil cromatográfico dos ácidos graxos da levedura *T. brassicae* foi estudado utilizando-se diferentes fontes de carbono. A partir dos dados contidos na tabela 11 e ilustrados na figura 11 pôde-se analisar a porcentagem relativa de cada ácido graxo em cada fonte de carbono testada.

O ácido oléico foi o ácido graxo encontrado em maior proporção relativa. Utilizando-se glicose, xilose e maltose, esse ácido graxo apresentou maior proporção relativa em relação às outras fontes testadas, e uma menor proporção quando se utilizou galactose como fonte de carbono.

O ácido linoléico foi o segundo ácido graxo encontrado em maior proporção relativa quando foram utilizadas galactose, maltose e sacarose e o quarto ácido graxo quando foi usada glicose.

O ácido palmítico apresentou uma maior proporção relativa quando foi usada a glicose e numa menor proporção quando se usou galactose. Esse ácido graxo não apresentou diferenças significativas na proporção relativa quando foram utilizadas as demais fontes de carbono testadas.

O ácido esteárico foi o segundo ácido graxo encontrado em maior proporção relativa quando foi utilizada glicose como fonte de carbono e não foi encontrado quando usou-se galactose. Esse ácido graxo apresentou uma grande variação na proporção relativa frente às fontes de carbono testadas.

O ácido linolênico foi detectado apenas quando se usou glicose como fonte de carbono.

Tanto para *C. fabianii* como para a *T. brassicae* o ácido oléico foi o ácido graxo encontrado em maior proporção relativa em todas as fontes de carbono testadas. A fig. 12 compara a influência das diferentes fontes de carbono na proporção de ácido oléico, para as duas leveduras. Foi possível observar que independente da fonte de carbono utilizada a proporção de ácido oléico para *Trichosporon brassicae* é sempre maior em relação à *Candida fabianii*.

YOON *et al.* (1982) estudaram a influência de oito fontes de carbono (glicose, sacarose, maltose, xilose, celobiose, lactose e arroz cru) na produção de lipídeos de uma levedura oleaginosa *Rhodotorula gracilis*. Foi usado como fonte de nitrogênio, sulfato de amônio. Eles observaram que dentre as fontes testadas foi em glicose que a levedura apresentou uma maior porcentagem de lipídeos. No meio contendo sacarose, maltose, xilose e celobiose, essa levedura também se mostrou eficiente na produção de lipídeos.

EVANS & RATLEDGE (1983), compararam o crescimento da levedura *Candida curvata* em diferentes fontes de carbono: sacarose, lactose, glicose, xilose e etanol. Eles observaram que a fonte de carbono mais eficiente foi a lactose, sendo que a proporção relativa dos ácidos graxos majoritários foi: ácido oléico (44%), ácido palmítico (36%), ácido esteárico (13%) e ácido linoléico (6%).

TURCOTE & KOSARIC (1989) estudaram o efeito das fontes de carbono glicose, sacarose e galactose na produção de lipídeos da levedura *Rhodospiridium toruloides*. Eles observaram que em todas as fontes testadas houve uma variação similar no C16:0, C18:0 e C18:1. Contudo, C18:2 variou de 5

para 28%. Não foi encontrado C18:3 quando as células foram crescidas na presença de frutose.

Um dos parâmetros que exerce maior influência no conteúdo e composição de ácidos graxos de microrganismo é a fonte de carbono. Embora os microrganismos possam usar uma variedade de substratos com diferentes fontes de carbono, poucos trabalhos têm sido feitos em relação à utilização de diversos tipos de substratos e sua influência na alteração do crescimento de microrganismos.

A produção de uma tonelada de lipídeo requer aproximadamente cinco toneladas de fonte de carbono e isso significa elevados custos de produção (RATLEDGE, 1982). A disponibilidade de fontes de carbono de baixo custo viabilizará alternativas de produção de substitutos de óleos comestíveis especiais de alto custo como, por exemplo, a manteiga de cacau.

Tendo isso em vista, há a necessidade de se testar vários microrganismos, em diversas condições experimentais com o objetivo de encontrar a combinação certa do material experimental e a produção de lipídeos.

Tabela 10 - Influência de diferentes fontes de carbono na composição de ácidos graxos produzidos por *Candida fabianii*.

	% Ácidos Graxos					
	Palmítico	Estearico	Oléico	Linoléico	Palmitoléico	Linolênico
Lactose	20	11	55	13	8,9	1,2
Xilose	17	10	62	9	11	4,3
Glicose	22	16	62	9	13,8	3,8
Sacarose	17	8	47	25	14	4,2
Maltose	16	4	56	21	18	0
Frutose	17	9	48	17	11,9	3,9
Galactose	16	7	44	23	10	3,3

Tabela 11 - Influência de diferentes fontes de carbono na composição de ácidos graxos produzidos por *Trichosporon brassicae*.

	% Ácidos Graxos			
	Palmitico	Estearico	Oléico	Linoléico
Lactose	20	11	55	13
Xilose	17	10	62	9
Glicose	22	16	61	9
Sacarose	17	8	47	25
Maltose	16	4	56	21
Frutose	17	9	48	17
Galactose	16	7	44	23

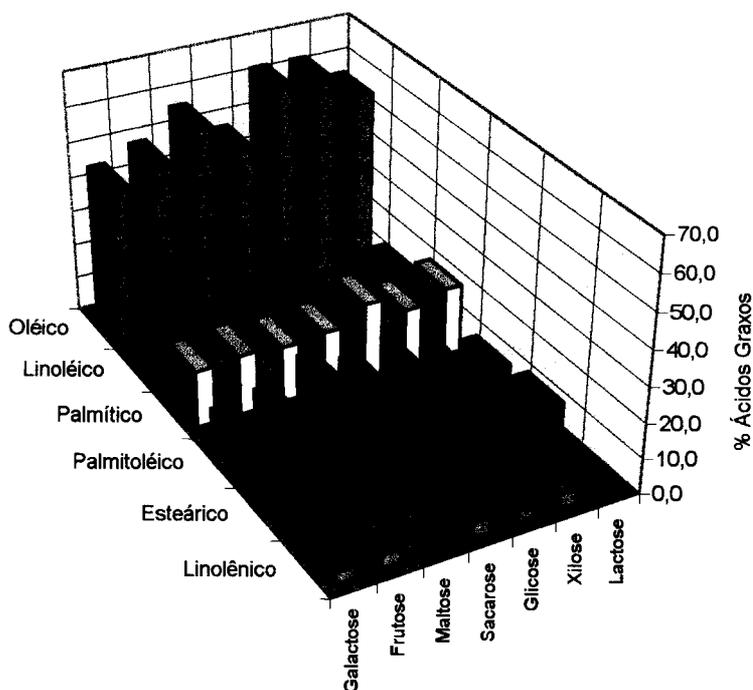


Fig. 10 - Estudo da influência de diferentes fontes de carbono na composição de ácidos graxos produzidos por *Candida fabianii*

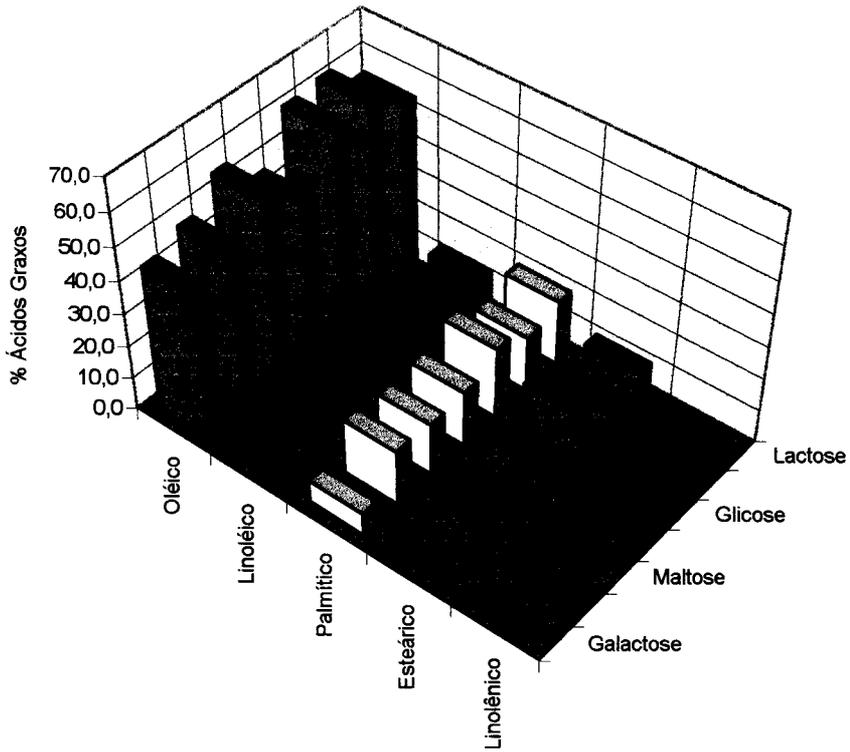


Fig. 11 - Estudo da influência de diferentes fontes de carbono no conteúdo de ácidos graxos produzidos por *Trichosporon brassicae*.

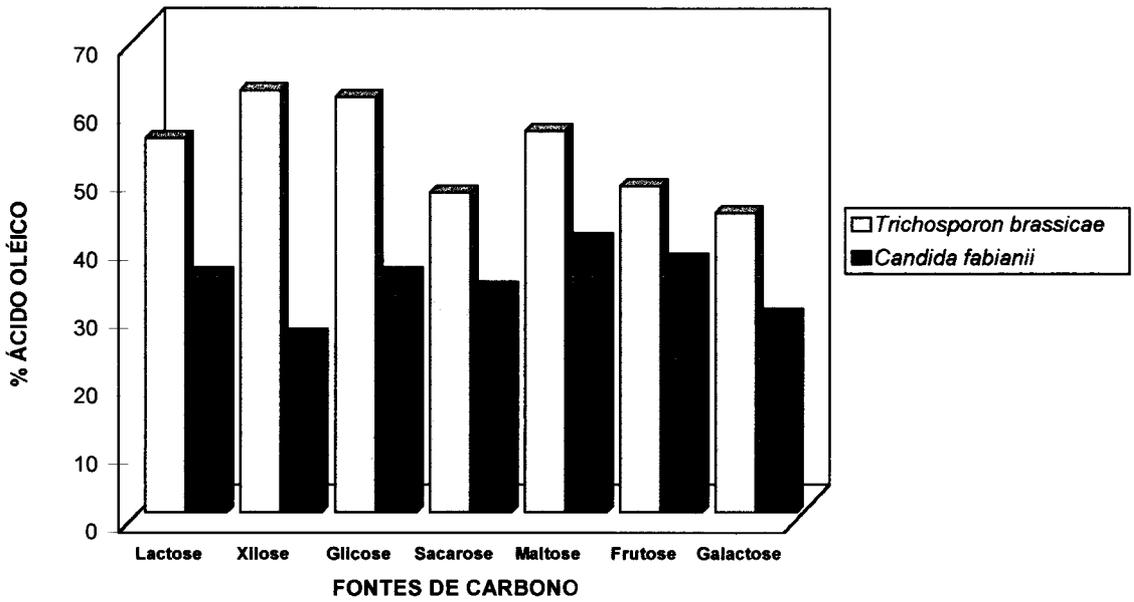


Fig. 12 - Estudo Comparativo da Influência de diferentes fontes de carbono no conteúdo de ácido oléico.

#### 4.10 Estudo da influência de diferentes fontes de carbono na obtenção de lipídeos totais, biomassa seca e porcentagem de lipídeos na biomassa seca.

A partir da figura 13 pôde-se observar que, para *Candida fabianii*, as maiores concentrações de lipídeos foram observadas quando maltose e galactose foram utilizadas como fonte de carbono. Ao passo que para *Trichosporon brassicae* as melhores fontes foram maltose e glicose.

Em relação a produção de biomassa seca a galactose e a lactose foram as melhores fontes de carbono para a levedura *Candida fabianii*, não ocorrendo diferenças significativas entre ambas. Maltose e glicose, respectivamente, promoveram uma maior produção de biomassa pela linhagem *Trichosporon brassicae*. A fig. 14 ilustra esses resultados.

Foi analisada a porcentagem de lipídeos em relação à biomassa seca. De acordo com a Ffg.15, para *Candida fabianii*, a maior porcentagem foi obtida quando se utilizou frutose e xilose, não ocorrendo diferenças significativas entre ambas. No caso da *Trichosporon brassicae*, não houve diferenças significativas entre as diferentes fontes de carbono testadas.

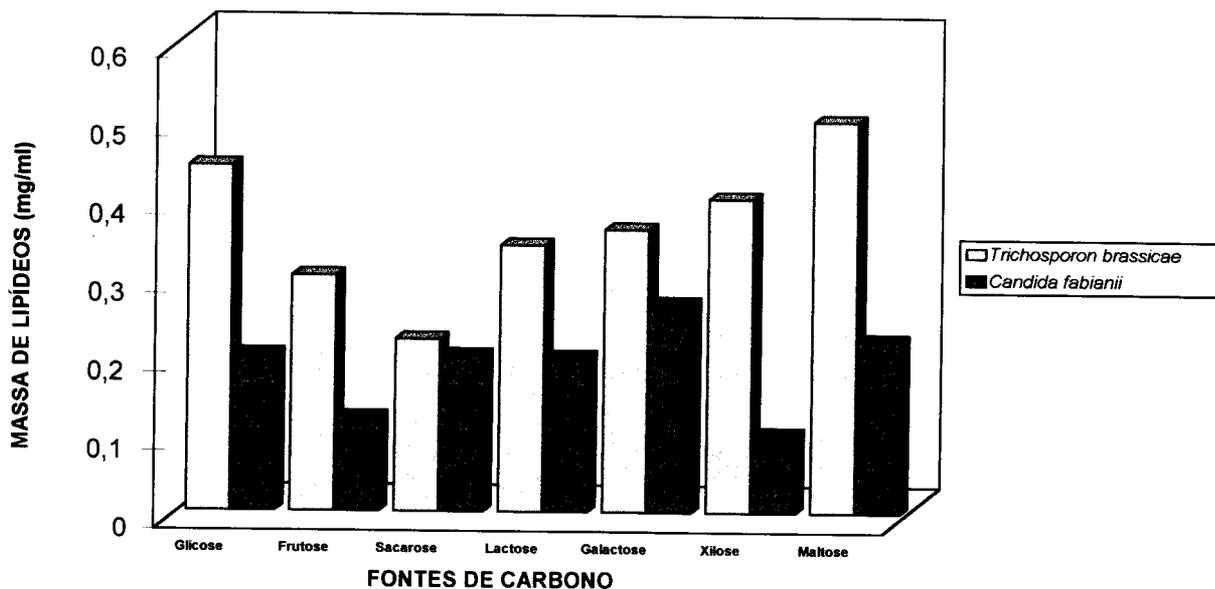


Fig.13 - Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de carbono na produção de lipídeos

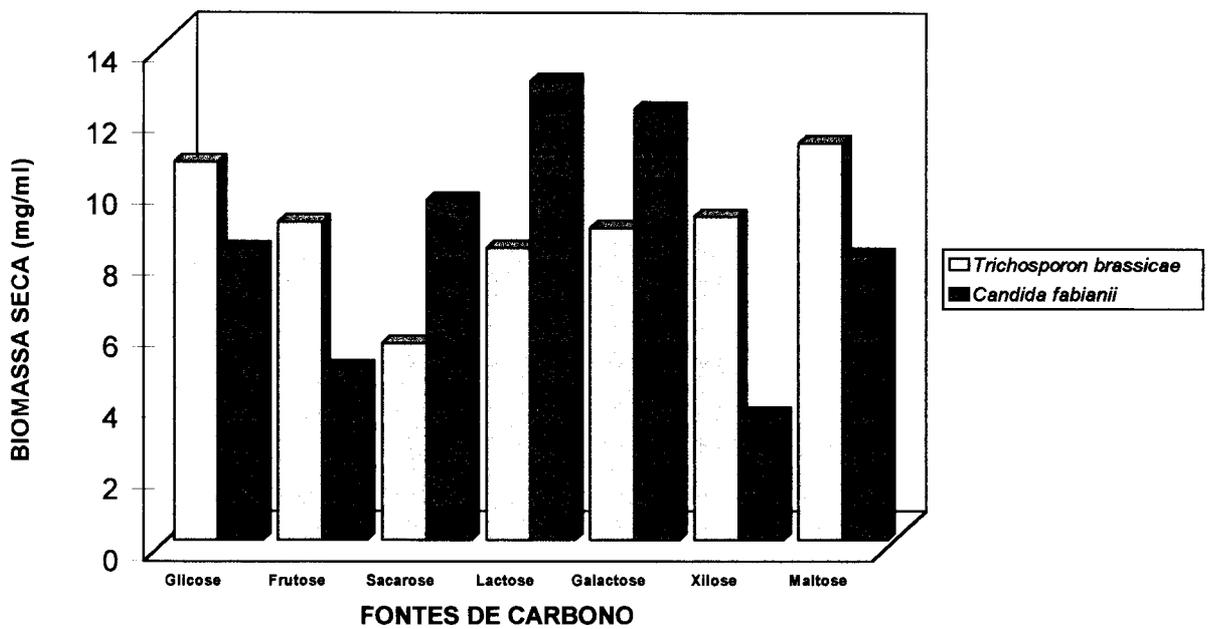


Fig. 14 - Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de carbono na produção de biomassa

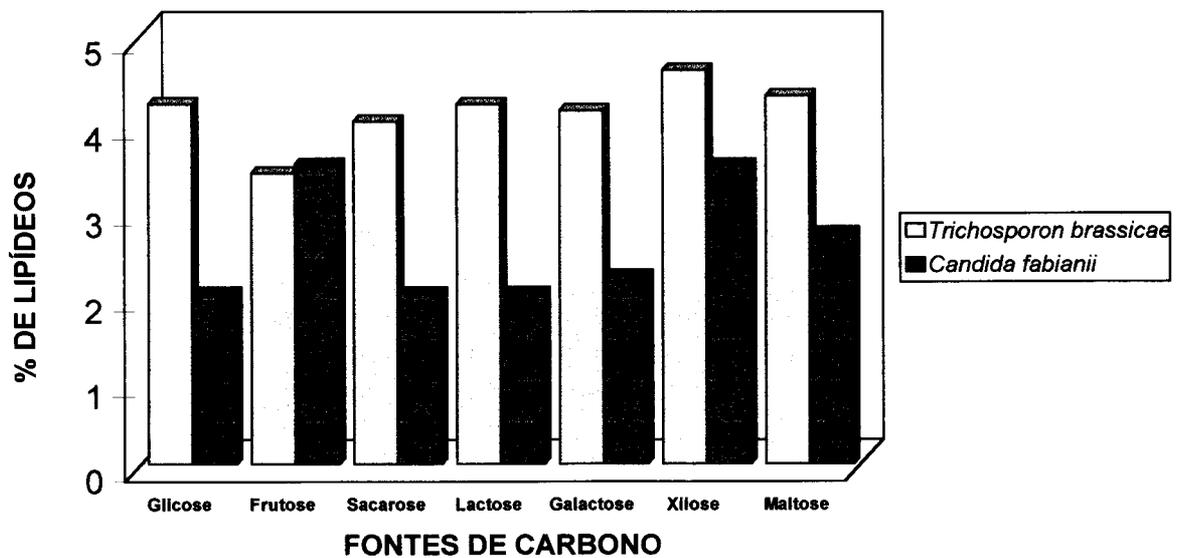


Fig. 15 - Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de carbono na % de lipídeos na biomassa seca.

#### **4.11 Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos.**

Analisando a composição de ácidos graxos da levedura *Candida fabianii* em relação as diferentes fontes de nitrogênio testadas, de acordo com os dados da tabela 12 e ilustrados na figura 16, não houve mudança significativa na proporção relativa do ácido palmítico em todas as fontes de nitrogênio testadas. O ácido palmitoléico apresentou uma maior proporção relativa quando foi usado extrato de levedura mais peptona e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio e uma menor proporção nas outras fontes testadas, sem diferenças significativas. O ácido esteárico teve uma menor proporção relativa quando foi usado extrato de levedura mais peptona e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fontes de nitrogênio, e uma maior proporção nas demais fontes de nitrogênio testadas, sem diferenças significativas entre elas. O ácido oléico foi o ácido graxo encontrado em maior proporção em todas as fontes de nitrogênio utilizadas, no entanto esse ácido apresentou uma variação na proporção relativa frente às diferentes fontes de nitrogênio testadas.

A proporção relativa de ácido linoléico encontrada foi bastante variável, apresentando maior proporção quando foi utilizado extrato de levedura e peptona conjuntamente. Esse ácido graxo foi encontrado em menor proporção relativa em todas as fontes testadas.

Analisando a composição de ácidos graxos da levedura *Trichosporon brassicae* em relação as diferentes fontes de nitrogênio, de acordo com os dados da tabela 13 e ilustrados na figura 17, a proporção relativa de ácido palmítico não apresentou variação significativa nas fontes de nitrogênio testadas. Utilizando-se uréia como fonte de nitrogênio foi encontrado que os ácidos esteárico e oléico apresentaram uma menor proporção relativa, enquanto que o ácido linoléico apresentou comportamento contrário. Foi encontrado ácido linolênico apenas quando foi usado extrato de levedura com peptona como fontes de nitrogênio.

Não houve diferença significativa no perfil cromatográfico dos ácidos graxos analisados em todas as fontes de nitrogênio testadas.

O ácido oléico foi o ácido graxo encontrado em maior proporção em todas as fontes de nitrogênio testadas, tanto para *C. fabianii* como para a *T. brassicae*. A fig. 18 compara a influência das diferentes fontes de nitrogênio na proporção de ácido oléico, para as duas leveduras. Foi possível observar que, independente da fonte utilizada, a proporção de ácido oléico para *Trichosporon brassicae* é sempre maior em relação à *Candida fabianii*.

Tabela 12 - Influência de diferentes fontes de nitrogênio na composição de ácidos graxos produzidos por *Candida fabianii*.

	% Ácidos Graxos					
	Palmítico	Estearico	Oléico	Linoléico	Palmitoléic o	Linolênic o
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19	5,8	40	18	12	2,6
KNO <sub>3</sub>	21	10	42	11	6	3,1
URÉIA	16	10	45	19	7,8	2,1
PEPLEV	16	4,3	31	27	14	3,5
NaNO <sub>3</sub>	20	10	40	12	8	2
NH <sub>4</sub> Cl	19	9,8	33	14,2	11	2,5

Tabela 13 - Influência de diferentes fontes de nitrogênio na composição de ácidos graxos produzidos por *Trichosporon brassicae*.

	% Ácidos Graxos			
	Palmitico	Estearico	Oléico	Linoléico
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17	13	51	15
KNO <sub>3</sub>	16	13	56	13
URÉIA	21	8	35	25
PEPLEV	22	15	53	9
NaNO <sub>3</sub>	18	13	56	12
NH <sub>4</sub> Cl	19	15	53	11

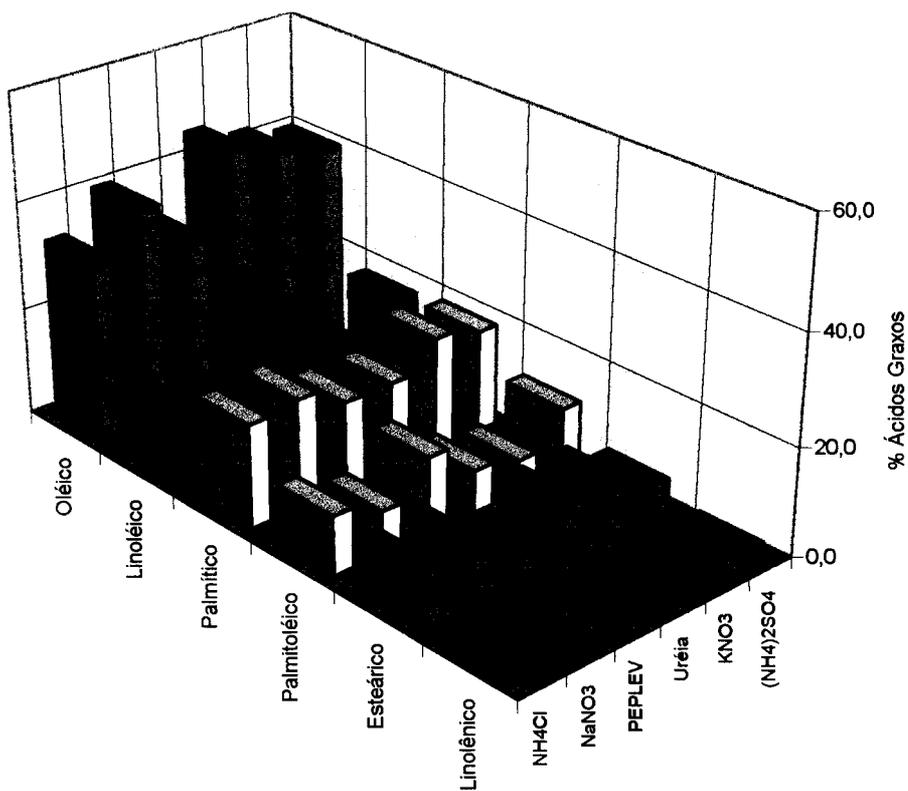


Fig. 16 - Estudo da Influência de diferentes fontes de nitrogênio na composição de ácidos graxos produzidos por *Cândida fabianii*

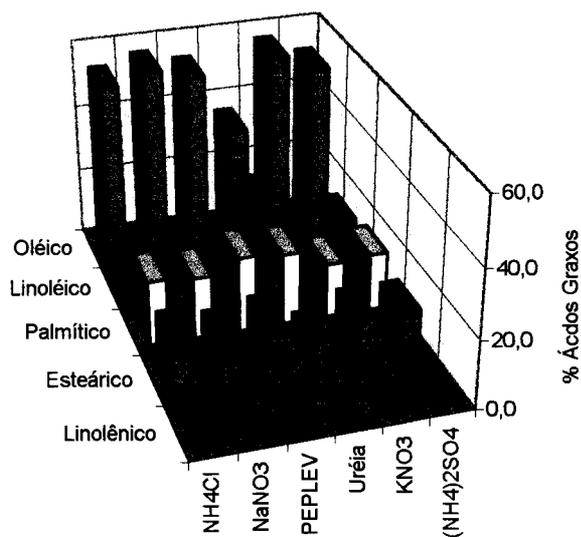


Fig. 17 - Estudo da Influência de diferentes fontes de nitrogênio na composição de ácidos graxos produzidos por *Trichosporon brassicae*

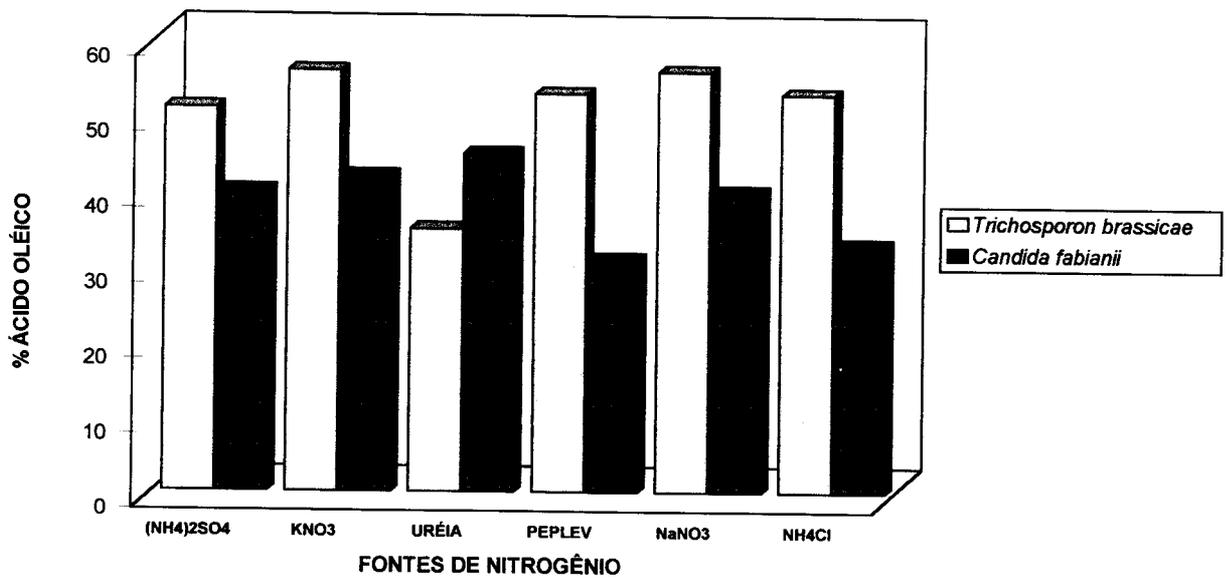


Fig. 18 - Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na composição de ácido oléico.

#### 4.12 Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na obtenção de lipídeos totais, biomassa seca e porcentagem de lipídeos na biomassa seca.

A partir da figura 19 podemos observar que, para *Candida fabianii*, não é possível avaliar a massa de lipídeos nas condições testadas uma vez que, com exceção do extrato de levedura e peptona, a taxa de crescimento da levedura foi desprezível para as diferentes fontes de nitrogênio testadas. Apesar da levedura *Trichosporon brassicae* ter crescido em todas as fontes de nitrogênio usadas, ela apresentou um maior conteúdo de lipídeos quando foi usado extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio.

Em relação a produção de biomassa seca para a levedura *Candida fabianii*, não foi possível avaliar a produção de biomassa nas condições testadas devido ao pouco crescimento dessa levedura nas fontes de nitrogênio usadas, com exceção do extrato de levedura e peptona onde o crescimento dessa levedura foi satisfatório. A levedura *Trichosporon brassicae* apresentou uma maior quantidade de biomassa quando foi usado extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio e teve uma menor produção quando foi usado uréia, não apresentando diferença significativa nas demais fontes usadas. A figura 20 ilustra esses resultados.

De acordo com a figura 21, para *Candida fabianii*, não foi possível avaliar a porcentagem de lipídeos na biomassa seca nas condições testadas devido ao pouco crescimento dessa levedura nas fontes de nitrogênio usadas, com exceção do extrato de levedura e peptona onde o crescimento dessa levedura foi satisfatório.

No caso da levedura *Trichosporon brassicae*, foi encontrado uma maior porcentagem de lipídeos em relação à biomassa seca quando foi usado uréia como fonte de nitrogênio. Essa grande diferença na porcentagem de lipídeos em relação à biomassa seca foi devido ao pouco crescimento dessa levedura em uréia. Não houve diferença significativa entre as outras fontes de nitrogênio testadas.

YOON *et al.* (1982), estudaram o efeito de várias fontes de nitrogênio na produção de lipídeos da levedura *Rhodotorula gracilis* NRRLY-1091. Entre as fontes de nitrogênio testadas, extrato de levedura, peptona,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , asparagina e  $\text{KNO}_3$  foram as melhores fontes de nitrogênio em termos de conteúdo de lipídeos e produção de lipídeos (g lipídeos/ g nitrogênio).

EVANS & RATLEDGE (1984) estudaram o efeito da fonte de nitrogênio na levedura *Rhodospiridium toruloides* CBS 14 com relação à produção de lipídeos e concluíram que o acúmulo de lipídeos foi maior quando utilizou-se fonte de nitrogênio orgânica do que quando essa levedura foi crescida na presença de nitrogênio inorgânico ou em misturas do tipo orgânico e inorgânico.

Os resultados encontrados para as leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae* estão de acordo com JACOB (1988), que estudando quatro espécies de leveduras do gênero *Rhodotorula* conclui que usando extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânico houve um alto percentual de lipídeos e a sua ausência causa uma diminuição na sua biomassa.

Baseados em estudos fermentativos, usando leveduras oleaginosas, pesquisadores formularam uma hipótese de que a produção de lipídeos é influenciada pelos produtos do meio e isso é resultante da estimulação direta pelos compostos nitrogenados, pois a concentração intracelular de  $\text{NH}_4^+$  é considerada um fator regulador durante os estágios iniciais da biossíntese de lipídeos (TURCOTTE & KOSARIC, 1989).

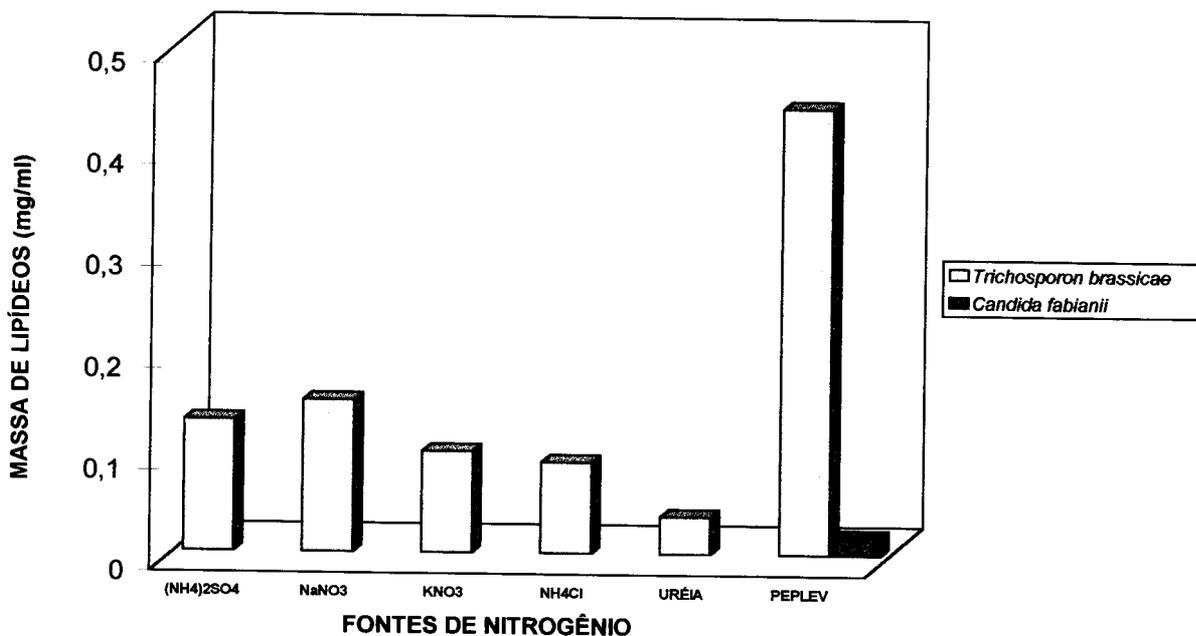


Fig. 19- Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de lipídeos.

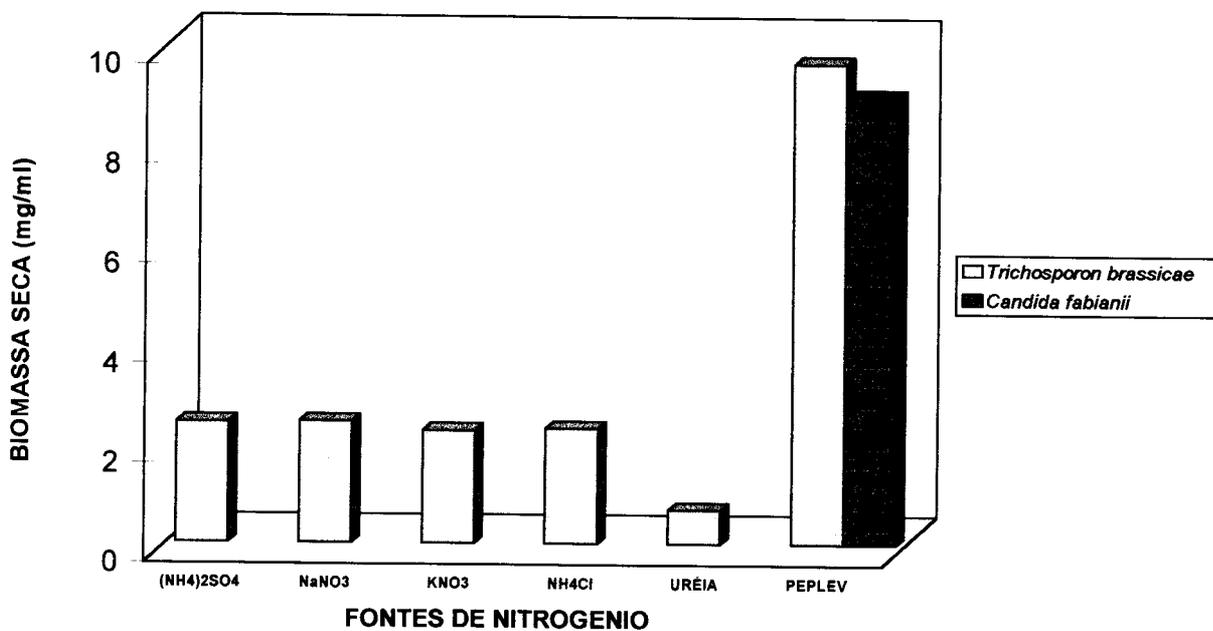


Fig. 20 - Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de biomassa.

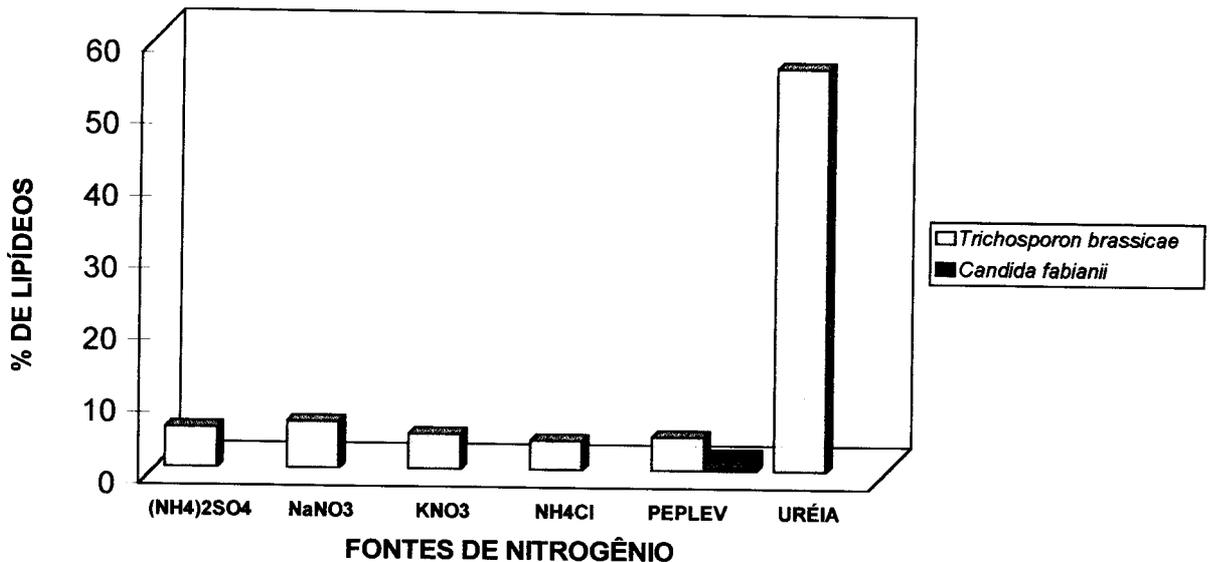


Fig. 21 - Estudo comparativo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na % de lipídeos na biomassa seca.

#### 4.13 Estudo da influência de diferentes taxas C:N (carbono:nitrogênio) na obtenção do perfil cromatográfico dos ácidos graxos.

A partir dos dados contidos na tabela 14 e ilustrados na figura 22 podemos observar que, para *Candida fabianii*, a proporção relativa do ácido palmítico e linoléico apresenta comportamento inverso à medida que há modificação na taxa C:N. O ácido palmitoléico apresentou uma maior proporção relativa quando a taxa C:N foi 4. O ácido esteárico e o ácido oléico apresentaram uma menor proporção relativa quando foram usadas taxas C:N 10 e 4. A maior proporção relativa de ácido linoléico foi encontrada quando foram usadas taxas C:N 4 e 20. O ácido linolênico foi encontrado em menor proporção relativa em todas as taxas C:N testadas sem diferença significativa entre elas.

O perfil cromatográfico dos ácidos graxos analisados nessa linhagem apresentou diferenças significativas em todas as taxas C:N testadas.

A partir dos dados contidos na tabela 15 e ilustrados na figura 23 podemos observar que, para *Trichosporon brassicae*, não houve diferença significativa entre as proporções de ácido palmítico observadas quando aplicadas diferentes taxas C:N. Não foi encontrada diferença significativa na proporção relativa de ácido esteárico, ácido oléico e ácido linoléico. A maior proporção relativa de ácido linolênico foi encontrada usando taxa C:N 4. Não foi detectada a presença de ácido linolênico quando foi usadas taxas C:N 10, 20, 80 e 100. Quando foram aplicadas taxas C:N 40 e 120 foram detectados baixos níveis desse ácido graxo, não apresentando diferença significativa na sua proporção nas outras taxas C:N testadas. Não houve diferença significativa no perfil cromatográfico dos ácidos graxos analisados em todas as taxas C:N testadas.

O ácido oléico foi o ácido graxo encontrado em maior proporção em todas as taxas C:N testadas, tanto para *C. fabianii* como para a *T. brassicae*. A fig. 24 compara a influência das diferentes taxas C:N na proporção de ácido oléico para as duas leveduras. Não houve diferença significativa na proporção de ácido oléico da levedura *T. brassicae*, enquanto que para a levedura *C. fabianii* houve uma menor quantidade quando foi usada taxa C:N igual a 10.

Foi possível observar que independente da taxa utilizada a proporção de ácido oléico para *Trichosporon brassicae* foi sempre maior em relação à *Candida fabianii*.

A levedura *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 estudada por TURCOTTE & KOSARIC (1988) apresentou uma variação no conteúdo de seus ácidos graxos em diferentes taxas C:N. O ácido oléico diminuiu com o aumento da taxa C:N, enquanto que a proporção de ácido palmítico e esteárico aumentou. Os ácidos graxos linoléico e linolênico não apresentaram variações significativas na proporção relativa.

Tabela 14 - Influência de diferentes taxa C:N na composição de ácidos graxos produzidos por *Candida fabianii*.

	% Ácidos Graxos					
	Palmitico	Esteárico	Oléico	Linoléico	Palmitoléico	Linolênico
4	15	3,8	33	21	9	3,4
10	11	2	25	17	7,2	3
20	15	7	42	22	6	3,9
40	19	11	43	15	5	1,9
80	22	12,8	49	11	3,6	1
100	23	11	46	9	5	1
120	21	13	43	9	5	0

Tabela 15 - Influência de diferentes taxas C:N na composição de ácidos graxos produzidos por *Trichosporon brassicae*.

	% Ácidos Graxos			
	Palmitico	Esteárico	Oléico	Linoléico
4	17	12	53	9
10	17	13	53	13
20	20	16	51	12
40	18	17	49	10
80	21	16	50	10
100	20	17	52	10
120	19	16	50	9

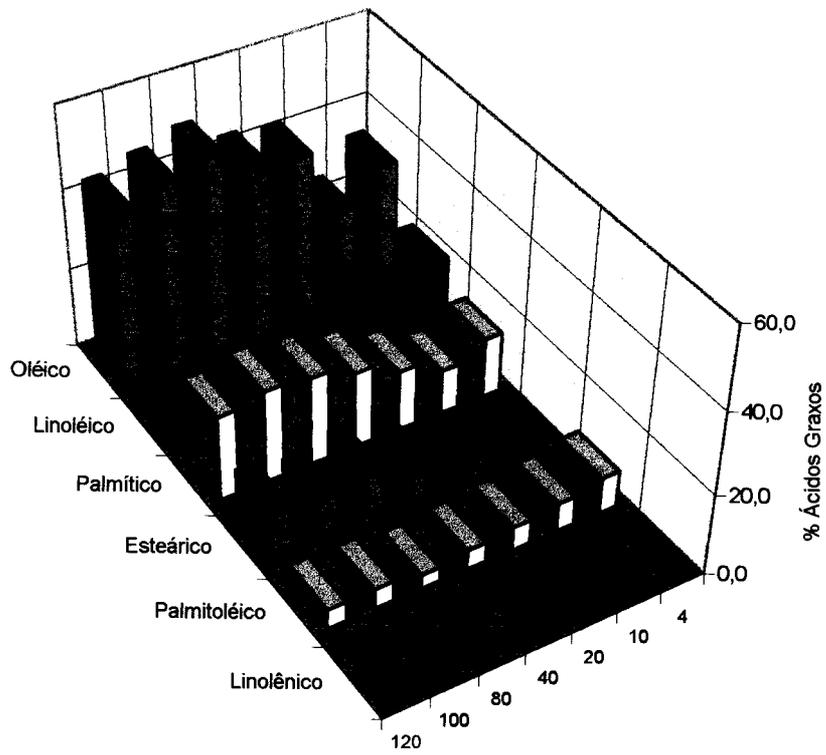


Fig. 22 - Estudo da influência de diferentes taxas C:N na composição de ácidos graxos produzidos por *Cândida fabianii*

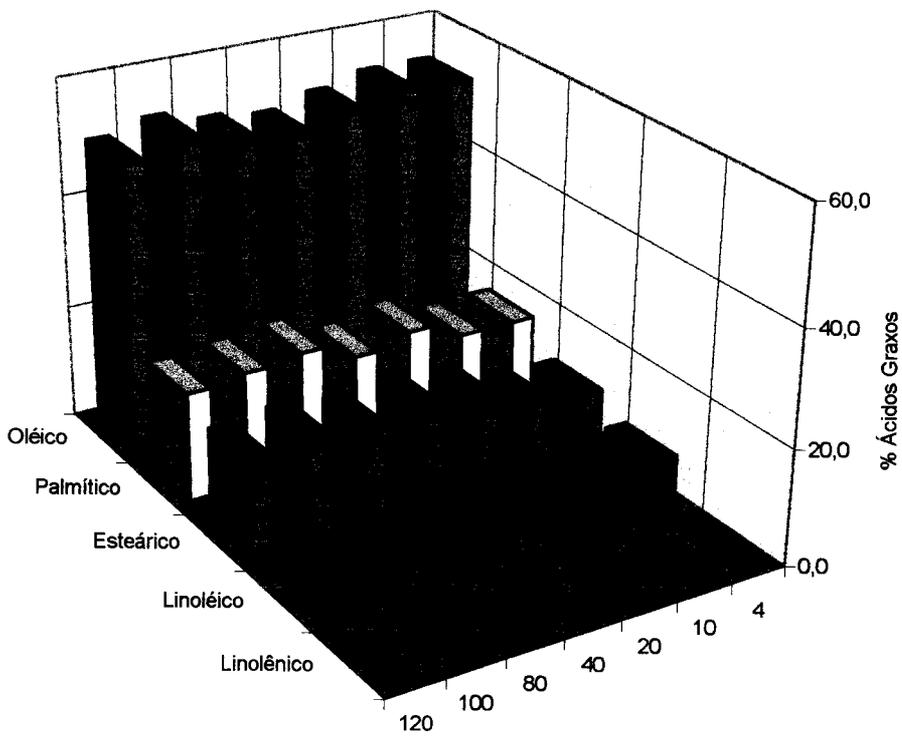


Fig. 23 - Estudo da influência de diferentes taxas C:N na composição de ácidos graxos produzidos por *Trichosporon brassicae*

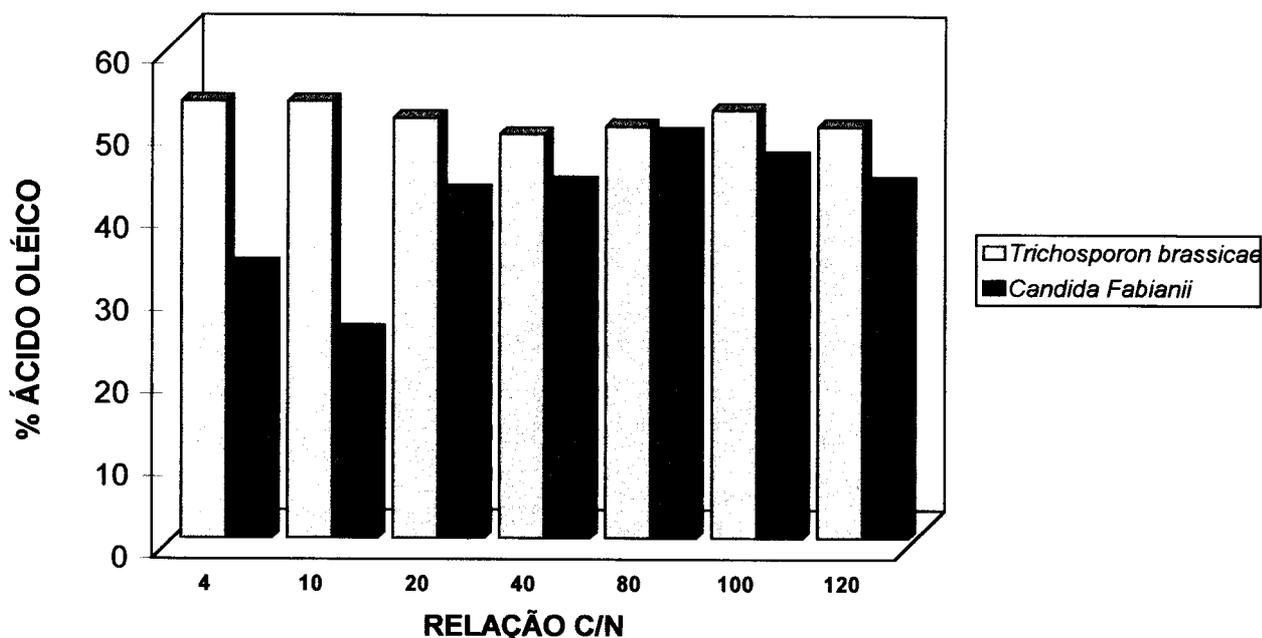


Fig. 24 - Estudo comparativo da influência de diferentes taxas C:N na composição de ácido oléico.

#### 4.14 Estudo da influência de diferentes taxas C:N (carbono:nitrogênio) na obtenção de lipídeos totais, biomassa seca e porcentagem de lipídeos na biomassa seca.

No que se refere a massa de lipídeos, podemos observar a partir da figura 25, que as leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae* apresentaram comportamento inverso. No caso da levedura *Candida fabianii*, o teor de lipídeos totais aumentou à medida que houve um aumento na taxa C:N. No caso da levedura *Trichosporon brassicae* à medida que a taxa C:N aumentou a massa de lipídeos dessa levedura diminuiu.

Em relação a produção de biomassa seca, tanto a levedura *Candida fabianii* quanto a levedura *Trichosporon brassicae* apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, à medida que a taxa C:N aumentou a biomassa seca diminuiu. O crescimento celular da levedura *Trichosporon brassicae* foi maior quando foram usadas taxas C:N 4 e 10 e caiu consideravelmente quando a taxa C:N aumentou. O crescimento celular da levedura *Candida fabianii* foi significativamente maior do que o da levedura *Trichosporon brassicae* quando a taxa C:N aumentou. A fig. 26 ilustra esses resultados.

A porcentagem de lipídeos em relação à biomassa seca foi semelhante para ambas as leveduras estudadas diante de alterações na taxa C:N. À medida que a taxa C:N aumenta a porcentagem de lipídeos em relação à biomassa seca aumenta. A levedura *Trichosporon brassicae* apresentou uma maior porcentagem de lipídeos do que a levedura *Candida fabianii* em todas as taxas C:N testadas com exceção da taxa C:N 120, que apresentou uma menor quantidade. A figura 27 ilustra esses resultados.

Os resultados encontrados por TURCOTTE & KOSARIC (1988) em *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 com relação ao conteúdo de lipídeos divergem dos resultados obtidos para *Candida fabianii* e estão de acordo com os resultados encontrados para *Trichosporon brassicae*. Essa levedura apresentou uma diminuição no conteúdo de lipídeos à medida que houve um aumento na taxa C:N.

GRANGER *et al.* (1988) estudaram a levedura *Rhodotorula glutinis* concluíram que a variação na taxa C:N aumentou a concentração final de biomassa sem lipídeos e diminuiu a produção de ácidos graxos, especialmente o ácido linolênico.

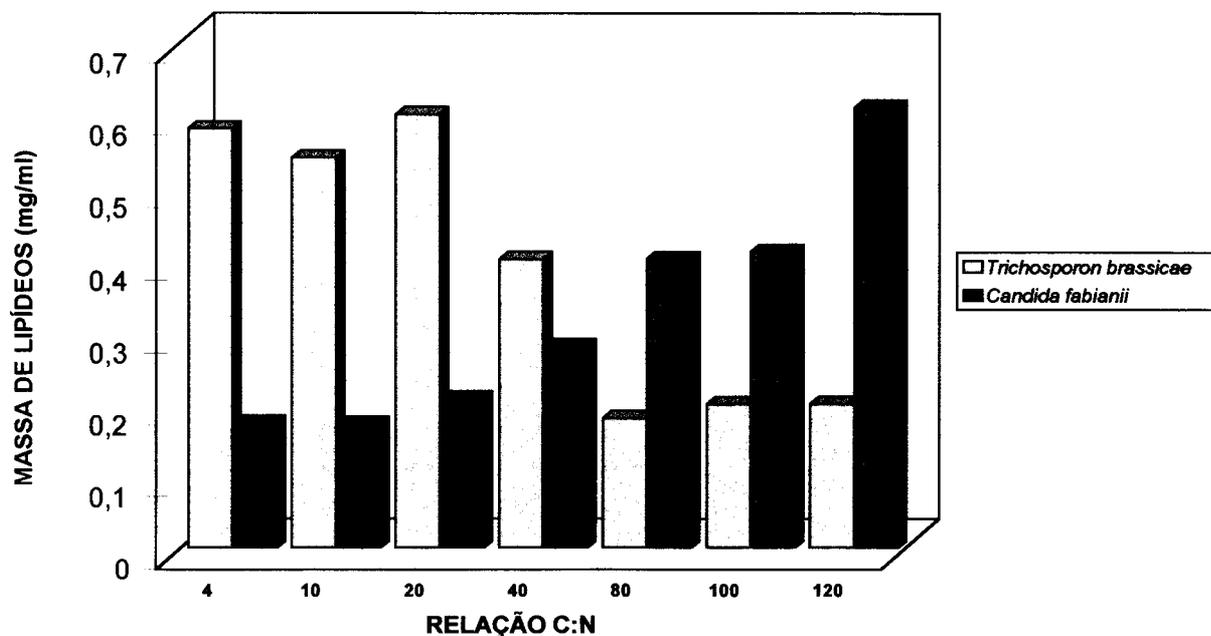


Fig. 25 - Estudo comparativo da influência de diferentes taxas C:N na produção de lipídeos.

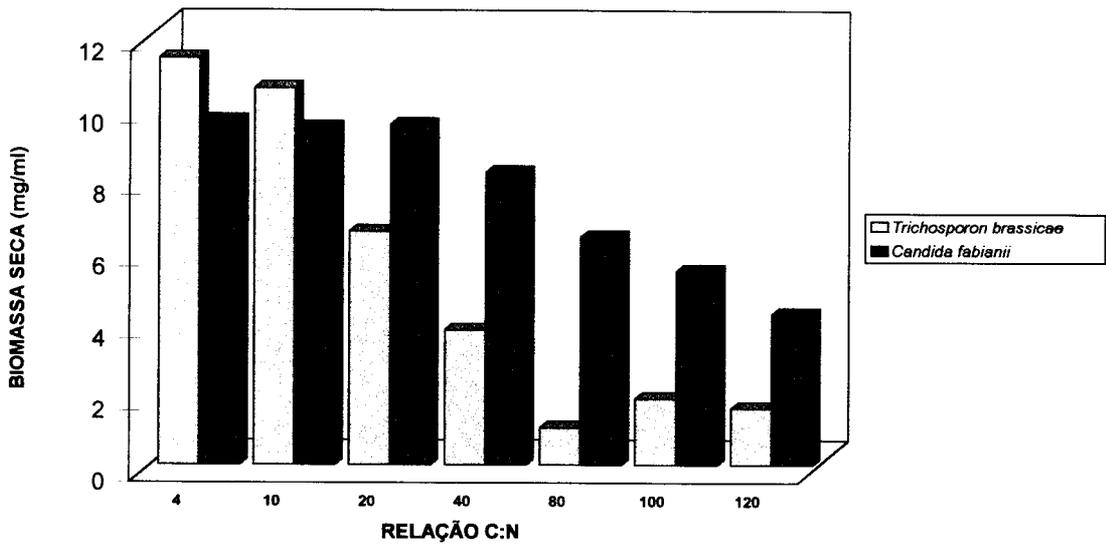


Fig. 26 - Estudo comparativo da influência de diferentes taxas C:N na produção de biomassa.

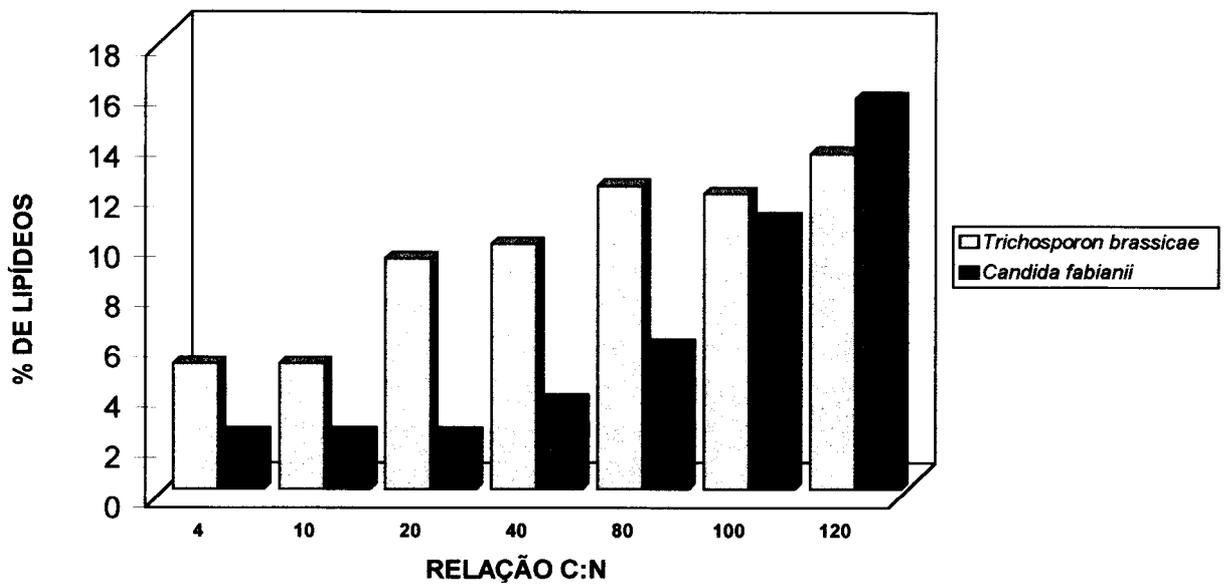


Fig. 27 - Estudo comparativo da influência de diferentes taxas C:N na porcentagem de lipídeos na biomassa seca.

#### 4.15 - Estudo da influência do tempo de crescimento no teor de lipídeos e no teor de glicose residual no meio de cultura

Observando as figuras 28 e 29 para *Candida fabianii* verifica-se que aproximadamente após 18 horas de fermentação ocorre um máximo de concentração de lipídeos no meio de cultura. Neste mesmo intervalo de tempo a glicose residual do meio foi esgotada. Pode-se observar então, que a concentração de lipídeos começa a cair uma vez que a fonte de carbono do meio se esgotou e a levedura passou a consumir as próprias reservas de carbono. Observa-se também que, a partir de aproximadamente 40 horas de fermentação a concentração de lipídeos total atingiu uma concentração mínima constante correspondente a concentração de lipídeo estrutural presente na levedura.

Observando as figuras 30 e 31 para *Trichosporon brassicae* verifica-se que aproximadamente após 125 horas de fermentação ocorre um máximo de concentração de lipídeos no meio de cultura. Neste mesmo intervalo de tempo a glicose residual do meio foi esgotada. Pode-se observar então, que a concentração de lipídeos começa a cair uma vez que a fonte de carbono do meio se esgotou e a levedura passou a consumir as próprias reservas de carbono. Observa-se que não foi atingido nesse experimento o patamar de mínima concentração constante correspondente a concentração de lipídeos estruturais.

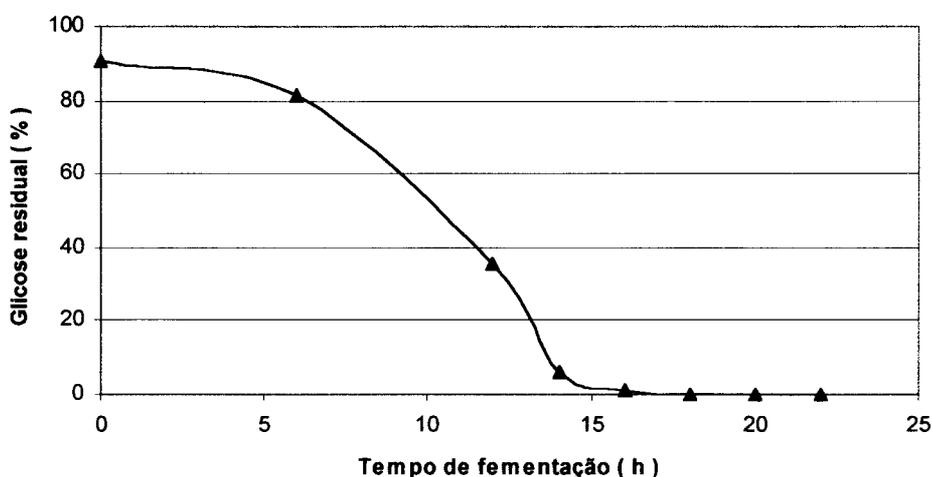


Fig. 28 - Estudo da influência do tempo de fermentação na concentração de glicose residual por *Candida fabianii*.

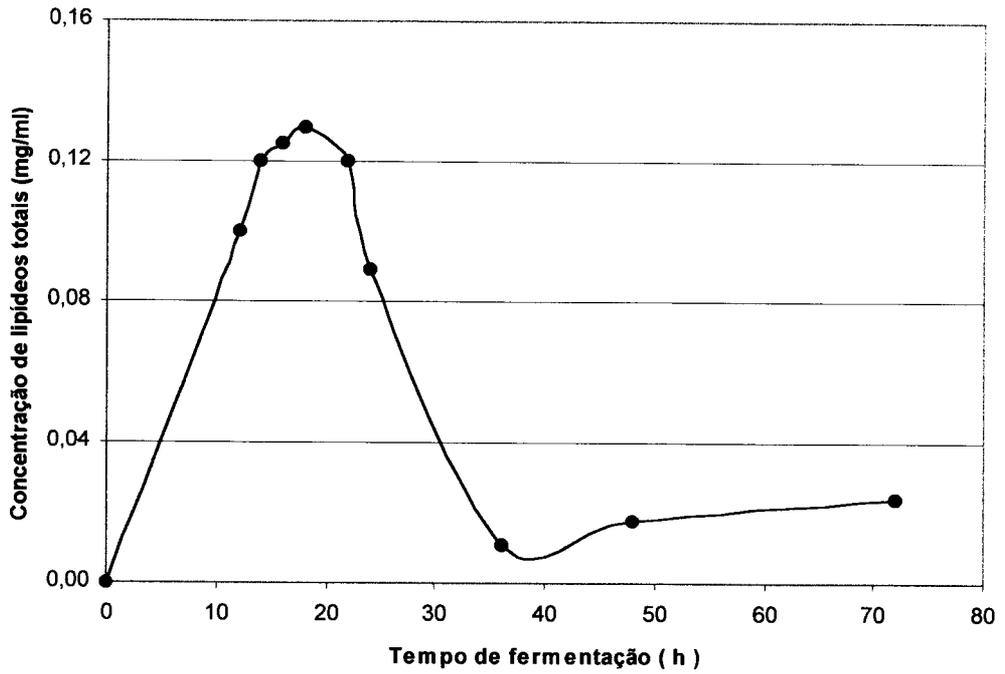


Fig. 29 - Estudo da Influência do tempo de fermentação na massa de lipídeos totais na levedura *Candida fabianii*.

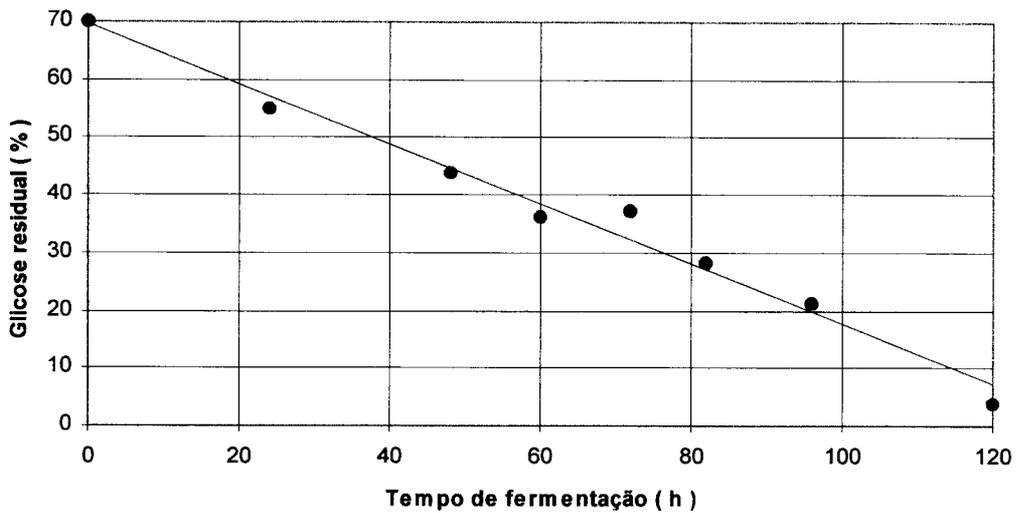


Fig. 30 - Estudo da influência do tempo de fermentação na concentração de glicose residual por *Trichosporon brassicae*.

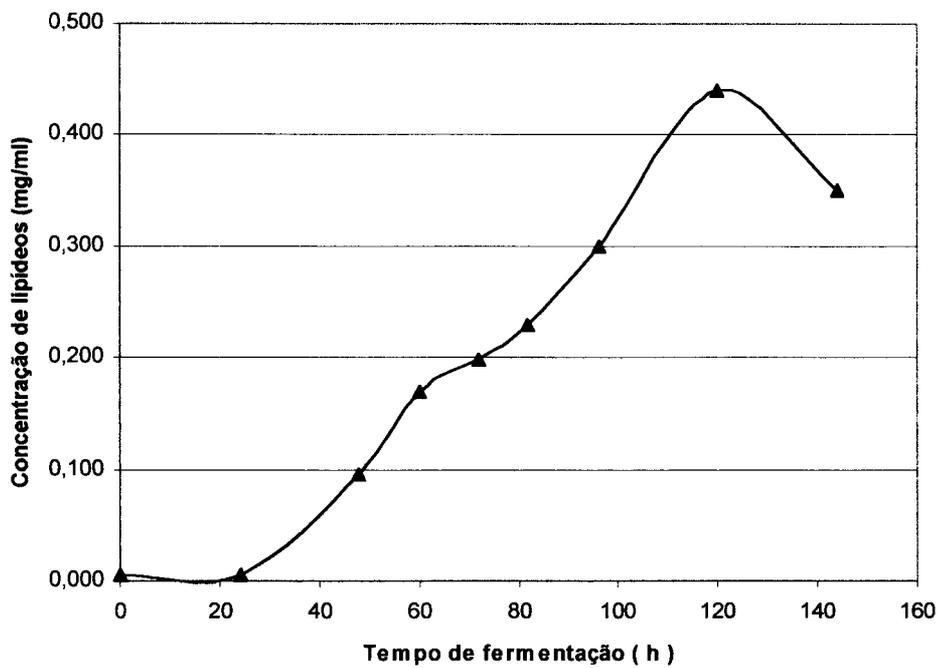


Fig. 31 - Estudo da influência do tempo de fermentação na massa de lipídeos totais pela levedura *Trichosporon brassicae*.

## 5. CONCLUSÕES

1-Foram selecionadas duas leveduras identificadas como *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae*, levando-se em consideração a composição e a proporção de ácidos graxos presentes em cada linhagem.

2-Os ácidos graxos identificados nas leveduras foram os ácidos oléico, linoléico, palmitoléico, palmítico, esteárico e linolênico para *Candida fabianii*. Para *Trichosporon brassicae* foram os seguintes: ácido oléico, palmítico, esteárico, linoléico e linolênico, em ordem decrescente de proporção.

3-A levedura *Candida fabianii* apresentou aproximadamente 9,22g/L de biomassa seca; 0,151g/L de lipídeos totais e 1,60% (p/p) de lipídeos totais na biomassa seca. A levedura *Trichosporon brassicae* apresentou 11,02g/L de biomassa seca, 0,52g/L de lipídeos totais e 4,8% (p/p) de lipídeos na biomassa seca.

4- A variação no tempo e temperatura de crescimento provocou mudanças no perfil cromatográfico tanto da levedura *Candida fabianii* quanto na levedura *Trichosporon brassicae*.

5-Embora o perfil cromatográfico da levedura *Candida fabianii* não tenha apresentado variação nos diferentes meios de cultivo, esse parâmetro influenciou significativamente apenas na proporção relativa de ácido linolênico. Enquanto que para a levedura *Trichosporon brassicae* houve uma variação significativa na proporção relativa dos ácidos graxos analisados nos diferentes meios de cultivo.

6-O máximo de biomassa seca da levedura *Candida fabianii* foi observado a partir de 20horas de fermentação, enquanto que a levedura *Trichosporon brassicae* atinge esse máximo a partir de 72horas.

7-O perfil cromatográfico das leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae* usando galactose, glicose, frutose, maltose, sacarose, xilose e lactose como fonte de carbono mostrou que o ácido oléico foi o ácido graxos encontrado em maior proporção relativa em todas as fontes de carbono testadas.

8-A levedura *Candida fabianii* apresentou maior concentração de massa de lipídeos, de biomassa seca e uma maior porcentagem de lipídeos na biomassa seca quando foi usada galactose, lactose e xilose respectivamente. A levedura *Trichosporon brassicae* apresentou maior concentração de massa de lipídeos e de biomassa seca quando foi usada maltose e uma maior porcentagem de lipídeos na biomassa seca quando foi usada xilose.

9-O perfil cromatográfico da levedura *Candida fabianii* apresentou variação significativa em relação a proporção dos ácidos graxos analisados usando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Uréia e extrato de levedura com peptona como fontes de nitrogênio. Para a levedura *Trichosporon brassicae* houve variação significativa em relação a proporção dos ácidos graxos analisados apenas quando foi usado uréia. O ácido oléico foi encontrado em maior proporção relativa em todas as fontes de nitrogênio testadas

10-Tanto a levedura *Candida fabianii* quanto a levedura *Trichosporon brassicae* apresentaram maior concentração de massa de lipídeos, uma maior concentração de biomassa seca e uma maior porcentagem de lipídeos na biomassa seca quando foi usada extrato de levedura com peptona conjuntamente.

11-A variação da taxa C:N influenciou significativamente no perfil cromatográfico da levedura *Candida fabianii*, principalmente em relação a variação na proporção relativa do ácido linoléico e do ácido palmítico que apresentou comportamento inverso. E a proporção relativa do ácido linolênico diminuiu com o aumento da taxa C:N. Não foi observado mudança significativa no perfil

cromatográfico da levedura *Trichosporon brassicae*. O ácido oléico foi encontrado em maior proporção relativa em todas as taxas C:N estudadas nas duas linhagens.

12-A massa de lipídeos da levedura *Candida fabianii* aumentou com o aumento na taxa C:N, enquanto que na levedura *Trichosporon brassicae* foi observado comportamento inverso. Com o aumento da taxa C:N a concentração de biomassa seca diminuiu e a porcentagem de lipídeos aumentou em ambas as linhagens.

13-A concentração máxima de lipídeos e a porcentagem mínima de glicose no meio para *Candida fabianii* foi observada com 18 e 15 horas de fermentação, respectivamente. E para *Trichosporon brassicae* ambas ocorrem com 120 horas.

14-Esses resultados obtidos reforçam a idéia de que cada microrganismo deve ser analisado separadamente e que dependendo do interesse, as condições de crescimento devem ser voltadas para um determinado ácido graxo individualmente. Cada parâmetro não pode ser avaliado separadamente, visto que eles estão interagindo entre si para a produção ou formação de uma substância desejada.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. AGUDO, L.C. Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37: 647-651, 1992.
2. AKIMOTO, M.; ISHII, YAMAGAKI, K.; OHTAGUCHI, K.; KOIDE, K.; YAZAWA, K. Production of eicosapentaenoic acid by a bacterium isolated from mackerel intestines. *Journal American Oil Chemistry Society* 67 (12): 911-915, 1990.
3. ALLEN, L.A.; BARNARD, N.H.; FLEMING, M.; HOLLIS, B. *Journal Applied Bacteriology* 27 (1): 27, 1964. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
4. ALVAREZ, R.M.; RODRIGUEZ, B.; ROMANO, J.M.; DÍAZ, A.; GÓMEZ, E.; MIRÓ, D.; NAVARRO, L.; SAURA, G.; GARCIA, J.L. Lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis* on sugar cane molasses in single-stage continuous culture. *World journal Microbiology & Biotechnology* 8: 214-215, 1992.
5. ATAMANYUK, D.I. & VAKAR, L.T. *Lipidy Gribov*: 98, 1975. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
6. BENDOVA, O.; RICHTER, V.; JANDEROVA, B.; HÁUSLER, J. Identification of industrial yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35: 810-812, 1991.

7. BLASIG, R.; HUTH, J.; FRANKE, P.; BORNELEIT, P.; SCHUNCK, W.H.; MÜLLER, H.G. Degradation of long-chain *n*-alkanes by the yeast *Candida maltosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31: 571-576, 1989.
8. BLIGH, E.G. and DYER, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and physiology* 37: 911-917, 1959.
9. BOTHA, A. & KOCK, J.L.F. Application of fatty acid profiles in the identification of yeasts. *International journal of Food Microbiology* 19: 39-51, 1993.
10. BOTHAM, P.A. & RATLEDGE, C. *Journal General Microbiology* 114: 361. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
11. CHOI, S.Y.; RYU, D.D.Y.; RHEE, J.S. Production of microbial lipid: effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnology and Bioengineering* 24: 1165-1172, 1982.
12. COUTO, M.M.B. & VELD, J.H.J.H. Influence of ethanol and temperature on the cellular fatty acid composition of *Zygosaccharomyces bailli* spoilage yeasts. *Journal of Applied bacteriology* 78: 327-334, 1995.
13. COCUCCI, M.C. BELLONI, G.; GIANANI, L. *Arch. Microbiology* 105: 17, 1975. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
14. COMBS, T.J.; GUARNERI, J.J.; PISANO, M.A. *Dev. Industrial microbiology* 21: 373, 1980. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.

15. DAVIES,R.J; HOLDSWORTH, J.E.; READER, S.L. The effect of low oxygen uptake rate on the fatty acid profile of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33: 569-573, 1990.
16. DELONG, E.F. & YAYANOS, A.A. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 730-737,1986. Citador por YANO, Y.; NAKAYAMA, A.; SAITO, H.; ISHIHARA,K. In Production of docosahexaenoic acid by marine bacteria isolated from deep sea fish. *Lipids*, 29(7). p. 528, 1994.
17. ENEBO,L.; ANDERSON, L.G.; LUNDIN,H. *Arch. Biochemical* 11: 383, 1946. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
18. EVANS, C.T. & RATLEDGE,C. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids* 18 (9), 1983.
19. EVANS, C.T. & RATLEDGE,C. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. *Lipids* 18 (9), 1983.
20. EVANS, C.T. & RATLEDGE, C. *Journal General Microbiology* 130: 1693, 1984. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
21. EVANS, C.T. & RATLEDGE, C. *Journal General Microbiology* 130: 1705, 1984. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
22. GÉLINAS, P; FISET, G.; WILLEMOT,C.; GOULET, J. Lipid content and cryotolerance of bakers'yeast in frozen doughs. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (2) : 463-468, 1991.

23. GELLERMAN, J. & SISTANLEY, G.H. *Biochim. Biophys. Acta* 573: 22-30, 1979. Citado por YAZAWA, K.; ARAKI, K.; OKAZAKI, N.; WATANABE, K.; ISHIKAWA, C.; INOUE, A. ; NUMAO, N.; KONDO, K. In Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *Journal Biochemistry* 103, p. 5, 1988.
24. 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* 2: 231-239, 1977.
25. GILL, C.O.; HALL, M.J.; RATLEDGE, C. *Applied and Environmental Microbiology* 33 (2): 231, 1977. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
26. GHOSE, T.K; CHOTANI, G.K; GHOSHI, P.; SAHAI, V. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 506: 459, 1987. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
27. GOULET J., 1975. Ph.D.Thesis, McGill University, Montreal, Canada. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
28. GRANGER, L.M.; PERLOT, P.; GOMA, G.; PAREILLEUX, A. Effect of various nutrient limitations on fatty acid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 784-789, 1993.
29. GRANGER, L.M.; PERLOT, P.; GOMA, G.; PAREILLEUX, A. Kinetics of growth and fatty acid production of *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37: 13-17, 1992.

30. GUARNERI, J.J.; COMBS, T.J.; PISANO, M.A. *Dev. Industrial Microbiology* 20: 641, 1987. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
31. HALL, M. & 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* 33 (3): 577-594, 1977.
32. HANSSON, L. & DOSTALEK, M. Effect of culture conditions on fatty acid composition in lipids produced by the yeast *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *Journal American Oil Chemistry Society* 63 (9): 1179-1184, 1986.
33. HASSAN, M.; BLANC, P.J.; PAREILLEUX, A.; GOMA, G. Production of single-cell oil from pricklypear juice fermentation by *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture. *World journal Microbiology & Biotechnology* 10: 534-537, 1994.
34. JACOB, Z. Selective medium for the production of lipids by *Rhodotorula gracilis* CFR-1. *Journal Food Science Technology* 6: 373-374.
35. JOHNSON, V.; SINGH, M.; YADAV, N.K. Transformation of vegetable oils by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Biotechnology Letters* 14 (9): 801-804, 1992.
36. JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V.S.; SISTA, V.R.; YADAV, N.K. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 382-384, 1992.

37. KATES, M. & BAXTER, R.M. *Can. Journal Biochemical Physiology* 40: 1213, 1962. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
38. KESSEL, R.H.J. *Journal Applied Bacteriology* 31: 220, 1968. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
39. KRYOLOVA, N.I.; DEDYUKHINA, E.G.; EROSHIN, V.K. Synthesis of lipids by the yeast *Cryptococcus albidus* during growth. *Prikladnaya Biokhimiya I Mikrobiologiya* 20 (6): 781-786, 1984.
40. LEGMANN, R.N. & MARGALITH, P. A comparative study of the lipid composition of yeasts with different fermentative capacities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26: 49-54, 1987.
41. METCLAFE, L. D. SCHMITZ, A. A. and PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chem.* 38(3) 514-515, 1966.
42. MISHRA,P. & KAUR,S. Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34: 697-702, 1991.
43. MISHRA,P. & PRASAD,R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30: 294-298, 1989.
44. MOON, N.J. & HAMMOND, E.G., *Journal American Oils Chemistry Society* 55(10): 683, 1978. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.

45. MORETON, R.S. Modification of fatty acid composition of lipid accumulating yeasts with cyclopropene fatty acid desaturase inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22: 41-45, 1985.
46. PAN, S.C.; ANDREASEN, A.A.; KOLACHOV, P. Arch. Biochemical 23: 419, 1949. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
47. PAN, J.G. & RHEE, J.S. Kinetic and energetic analyses of lipid accumulation in batch culture of *Rhodotorula glutinis*. *Journal Fermentation Technology* 64 (6): 557-560, 1986.
48. PAN, J.G; KWAK, M.Y; RHEE, J.S. High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen-enriched air. *Biotechnology Letters* 8 (10): 715-718, 1986.
49. PARK, W.S.; MURPHY, P.A.; GLATZ, B. A. Lipid metabolism and cell composition of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown at different carbon to nitrogen rations. *Can. J. Microbiology* 36: 319-326, 1990.
50. PIERRE GÉLINAS, GISÉLE FISET, CLAUDE WILLEMONT, and JACQUES GOULET. Lipid content and cryotolerance of bakers' yeast in frozen doughs. *Applied and Environmental Microbiology* 57(2): 463-68, 1991.
51. PITRYUK, I.A.; ZVYAGINTSEVA, I.S.; BAB'EVA, I.P. *Microbiology* 44 (5): 734, 1975. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
52. RATLEDGE, C. Microbial oils and fats : An assessment of their commercial potential . *Progress in Industrial Microbiology*, 16: 119-206, 1982.

53. RATLEDGE, C. Lipid biotechnology: a wonderland for the microbial physiologist. *Journal American Oil Chemistry Society* 64 (12): 1647-1657, 1987.
54. RATLEDGE, C. & HALL, M.J. *Applied and Environmental Microbiology* 34 (2): 230, 1977. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
55. ROLPH, C.E.; MORETON, R.S.; HARWOOD, J.L. Acyl lipid metabolism in the oleaginous yeast *Rhodotorula gracilis* (CBS 3042). *Lipids* 24 (8): 715-720, 1989.
56. SAJBIDOR, J.; LAMACKA, M.; BREIREROVA, E.; CHRASTINA, A.; POKREISZ, P.; CERTIK, M. Effect of salt stresses on fatty acid alterations in some strains of *Dipodascopsis* and *Dipodascus* spp. *World journal Microbiology & Biotechnology* 10: 184-186, 1994.
57. SHANTA, N.C. & ACKMAN, R.G. Silica gel thin-layer chromatographic method for concentration of longer-chain polyunsaturated fatty acids from food and marine lipids. *Can. Inst. Sci. Technol. J.* 24 (3/4): 156-160, 1991.
58. STEINBERG, M. & ORDAL, Z. *Journal Agric. Food. Chemistry* 2: 873, 1954. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
59. SUUTARI, M.; PRIHA, P.; LAAKSO, S. Temperature shifts in regulation of lipid accumulated by *Lipomyces starkeyi*. *Journal American Oil Chemistry Society* 70 (9): 891-893, 1993.
60. TAHOUN, M.K.; EL-MERHEB, Z.; SALAM, A.; YOUSSEF, A. Biomass and lipids from lactose or whey by *Trichosporon beigelli*. *Biotechnology and Bioengineering* 29: 358-360, 1987

61. THORPE, R.F. & RATLEDGE, C. *Journal general Microbiology* 78: 203, 1973.  
Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
62. THORPE,R.F. & RATLEDGE,C. Fatty acid distribution in triglycerides of yeasts grown on glucose or *n*-alkanes. *Journal of General Microbiology* 72: 151-163, 1972.
63. THORPE,R.F. & RATLEDGE, C. *Journal General Microbiology* 72: 151, 1972.  
Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
64. TURCOTE, G. & KOSARIC, N. The effect of C/N ratio on lipid production by *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788. *Biotechnology Letters* 2 (9): 637-642, 1989.
65. TURCOTE G. Ph.D. Thesis, The University of Western Ontario, London, Ontario, 1987. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
66. VOLFOVA, O. & PECKA, K. *Folia Microbiol.* 18, 1973. Citado por TURCOTTE & KOSARIC In Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, vol. 40, 1989.
67. WHITWORTH, D.A. & RATLEDGE,C. Na analisis of intermediary metabolism and its control in a fat-synthesizing yeast (*Candida 107*) growing on glucose or alkanes. *Journal of General Microbiology* 88 : 275-288, 1975.
68. WHITWORTH, D.A. & RATLEDGE,C. Microorganisms as a Potencial Source of Oils and Fats. *Process Biochemistry*, November, 1974.

69. WIRSEN,C.O.; JANNASCH, H.W.; WAKEHAM, S.G.; CANNEL, E.A. *Curr. Microbiol.* 14: 319-322. Citado por YAZAWA, K.; ARAKI, K.; OKAZAKI, N.; WATANABE,K.; ISHIKAWA,C.; INOUE, A. ; NUMAO, N.; KONDO,K. In Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *Journal Biochemistry* 103 p. 5-7, 1988.
70. YANO, Y.; NAKAYAMA, A.; SAITO, H.; ISHIHARA,K. Production of docosahexaenoic acid by marine bacteria isolated from deep sea fish. *Lipids*, 29(7): 527-528, 1994.
71. YAZAWA, K.; ARAKI, K.; OKAZAKI, N.; WATANABE,K.; ISHIKAWA,C.; INOUE, A. ; NUMAO, N.; KONDO,K. Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *Journal Biochemistry* 103: 5-7, 1988.
72. YKEMA,A.,BAKELS, R.H.A.; VERWOERT,I.I.G.S.;SMIT,H.; VERSEVELD, H.W. Growth yield, maintenance requirements, and lipid formation in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 1268-1276, 1989.
73. YKEMA, A.; VERBREE, E.C.; KATER, M.M.; SMIT, H. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in wheypermeate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29: 211-218, 1988.
74. YONGMANITCHAI,W. & WARD, O.P. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (2): 419-425, 1991.
75. YOON, S.H & RHEE, J.S. Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. *Journal American Oil Chemistry Society* 60 (7): 1281-1286, 1983.

76. YOON, S.H & RHEE, J.S. Quantitative physiology of *Rhodotorula glutins* for microbial lipid production. *Process Biochemistry* 10: 2-4, 1983.
77. YOON, S.H.; RHIM, J.W.; CHOI, S.Y.; RYU, D.D.Y.; RHEE, J.S. Effect of carbon and nitrogen sources on lipid production of *Rhodotorula gracilis*. *Journal Fermentation technology* 60 (3): 243-246, 1982.