



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas-NUPEB
Laboratório de Biologia Celular e Molecular-LBCM



Filipe da Silva Siqueira

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS CAPAZES DE UTILIZAR O
GLICEROL BRUTO COMO FONTE DE CARBONO**

Ouro Preto-MG

2015

PPGBIOTEC

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia



Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas-NUPEB
Laboratório de Biologia Celular e Molecular-LBCM



Filipe da Silva Siqueira

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS CAPAZES DE UTILIZAR O
GLICEROL BRUTO COMO FONTE DE CARBONO**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão

CO-ORIENTADORA: Dr^a. Janaina Aparecida Teixeira

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de pós-graduação do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia Industrial.

Ouro Preto-MG

2015

S618b Siqueira, Filipe da Silva .
Bioprospecção de leveduras oleaginosas capazes de utilizar o glicerol bruto como fonte de carbono [manuscrito] / Filipe da Silva Siqueira. - 2015.
56f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão.
Coorientador: Prof. Dr. Janaina Aparecida Teixeira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB.
Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. Levedos. 2. Lipídeos. 3. Biodiesel . I. Brandão, Rogelio Lopes . II. Teixeira, Janaina Aparecida. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 602.3:582.282.23



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Bioprospecção de leveduras oleaginosas capazes de utilizar o glicerol bruto como fonte de carbono”

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de 2015, às 08h30min, no Auditório do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno **Filipe da Silva Siqueira**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão
Presidente

Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva
Examinadora (UFOP)

Prof. Dr. Luciano Gomes Fietto
Examinador (UFV)

DATA DA DEFESA: 11/02/2014



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MC – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: biotec@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/biotec

Dedicatória

Dedico à minha família: Mãe, irmãos e padrasto pelo incentivo e apoio em momentos difíceis. À minha esposa pelo amor, dedicação e compreensão ao longo de todos esses anos.

Agradecimentos

À UFOP, pelo ensino público de qualidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro deste projeto.

Ao prof. Dr. Rogelio Lopes Brandão pela orientação, confiança no meu trabalho e por me fornecer a oportunidade de fazer um mestrado.

Ao prof. Dr. Ieso Miranda de Castro pela disponibilidade e auxílio na execução deste projeto.

À minha co-orientadora Dr^a. Janaina Aparecida Teixeira pela co-orientação, amizade, companheirismo e dedicação para com a minha formação profissional e pessoal.

À técnica do laboratório, Zezé Trópia, por ser sempre solícita e disponível em auxiliar a todos do LBCM.

À minha mãe, Regina Teixeira, por ser meu exemplo de determinação e dedicação, sempre acreditando e me apoiando.

À minha avó Doralice Teixeira (*in memoriam*) por me ensinar a força das minhas origens.

À minha estimada esposa Juliene Soto Borges Siqueira pela compreensão, dedicação e por ser uma esposa companheira e voluntariosa.

Aos meus irmãos Fernando e Fabrício pela amizade e convívio.

Ao meu padrasto Gilberto pelo companheirismo e amizade.

Ao meu amigo Eduardo Perovano Santana pela amizade, ensinamentos e muitas risadas.

Aos amigos do LBCM: Ana Clara, Fábio, Diogo, Thalita, Margarete, Lorena, Bruna, Patrícia, Jessica, Taís, Maria, Fernanda Piló, Fernanda Godoy, Marcos, Débora, Heloá, Magalhães, Tiago, Edilene, Edmara, Miriam, Stefane, Márlea, Aureliano, Hygor, Simone, Gabriela, Ana Maria, Júlio Cezar, Ana Paula, Karoline, Gustavo, Luis, Lygia e Florência pela harmoniosa convivência e pelos bons momentos vivenciados.

À prof^a. Silvana pelo auxílio e disponibilização do laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos-LBTM.

Ao prof. Maurício Coutrim pelo auxílio e disponibilização do laboratório de Caracterização Molecular/Espectrometria de Massas.

Resumo

Bioprospecção de leveduras oleaginosas capazes de utilizar o glicerol bruto como fonte de carbono

Os biocombustíveis, bioetanol e biodiesel, estão entre as fontes de energia alternativas promissoras para reduzir a utilização dos combustíveis fósseis. O biodiesel é um éster metílico ou etílico obtido a partir da transesterificação de óleos vegetais na presença de um álcool. Esta reação gera como subproduto, o glicerol bruto (GB), que equivale a 10% de todo volume gerado. Uma alternativa para o consumo do GB é a sua utilização como fonte de carbono por micro-organismos oleaginosos. Os óleos estocados podem ser utilizados como uma fonte alternativa de óleos para produção do biodiesel. Os micro-organismos oleaginosos são capazes de acumular mais de 20% de sua biomassa em lipídeos e seus óleos apresentam estrutura química semelhante aos óleos vegetais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi selecionar leveduras capazes de metabolizar o glicerol bruto e estocá-lo na forma de lipídeos. Sessenta e três isolados de leveduras oriundas da produção de cachaça foram avaliados quanto à capacidade de crescer na presença de GB, como única fonte de carbono, e armazená-lo na forma de lipídeos. As leveduras foram inoculadas em meio mínimo Synthetic Defined (SD) contendo 10% de GB e incubadas a 23°C, durante um período de 48 horas. No ensaio colorimétrico com Sudan Black (corante lipofílico) as culturas foram fixadas em lâminas e analisadas em microscópio óptico. Vinte e cinco cepas foram selecionadas como leveduras capazes de armazenar lipídeos. Posteriormente, estas cepas foram submetidas a ensaio quantitativo utilizando o corante fluorescente Nile Red. Para isso, foram inoculadas em meio SD com 10% de GB, incubadas a 28°C, sob agitação de 180 RPM, por 48 horas e colocadas em solução Nile Red 0,1 mg/mL por 10 minutos. Seis leveduras apresentaram o dobro da acumulação de lipídeo em comparação a *Yarrowia lipolytica* (controle positivo). Estas cepas foram posteriormente submetidas à caracterização dos ácidos graxos produzidos, na cromatografia gasosa-*Flame Ionization Detector* (CG-FID). A cepa LBCM3 apresentou o maior conteúdo lipídico dentre as selecionadas com 36,60% de lipídeos. Além disso, esta foi a única cepa capaz de produzir simultaneamente os ácidos linoléico e linolênico, lipídeos estes importantes para produção de biodiesel. A cepa LBCM17 apresentou o segundo maior conteúdo lipídico com 27,90% de lipídeos totais. As cepas LBCM95 e LBCM98 exibiram 21,90%

e 2,17% de lipídeos totais, respectivamente. A LBCM1 apresentou o menor conteúdo lipídico com 0,22% de lipídeos totais.

Os resultados demonstram que as leveduras selecionadas são capazes de utilizar o GB como fonte de carbono e possuem potencial para aplicação na produção de biodiesel. As seis leveduras selecionadas na análise semi-quantitativa, segundo resultado do sequenciamento da região ITS5.8s, são *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: leveduras oleaginosas, lipídeos, biodiesel e glicerol bruto.

Abstract

Bioprospecting of the oleaginous yeast able to metabolize crude glycerol

The biofuels, bioethanol and biodiesel, are among the promising alternative energy sources to reduce the use of fossil fuels. Biodiesel is a methyl or ethyl ester obtained from the transesterification of vegetable oils in the presence of an alcohol. This reaction generates the crude glycerol (CG) as a by-product, which corresponds to 10% of all generated volume. An alternative to consumption of GB is its use as a carbon source for oleaginous microorganisms. These may be used as an alternative source of oils to produce biodiesel. The oleaginous microorganisms are able to accumulate more than 20% of their biomass into lipids and their oils present chemical structure similar to vegetable oils. Therefore, the objective of this work was to select yeast capable of metabolizing the crude glycerol and store it in the form of lipids. Sixty-three yeast strains derived from the cachaça production were evaluated for the ability to grow in the presence of GB, as the only source of carbon and store it in the form of lipids. The strains were inoculated in a minimal SD medium containing GB 10% and incubated at 23°C for a period of 48 hours. The cultures were fixed on slides and analyzed by light microscopy after colorimetric assay with Sudan Black (lipophilic dye). Twenty five strains were selected as yeasts that can store lipids. Subsequently, these strains were subjected to quantitative assay using Nile Red fluorescent dye. To this, were inoculated into Synthetic Defined (SD) medium with GB 10% were incubated at 28°C under agitation of 180 RPM for 48 hours and placed in Nile Red solution 0.1 mg/ml for 10 minutes. Six strains showed twice the accumulation of lipids in comparison to *Yarrowia lipolytica* (positive control). These strains subsequently underwent characterization of fatty acids produced in the gas chromatography- Flame Ionization Detector (GC-FID). The LBCM3 strain showed the highest lipid content with 36,60 % of lipids. Moreover, this was the only strain able to produce both linoleic and linolenic acids which are important lipids for biodiesel production. The LBCM17 strains exhibited the second highest lipid content with 27,90 % of total lipids. The LBCM95 strains and 98 exhibited 21,90 % and 2,17 % of total lipids respectively. The LBCM1 presented the lowest lipid content with 0,22% of total lipids. The results showed that the selected strains are able to utilize GB as a source of carbon and have potential for use in the production of biodiesel. Six yeasts selected in the semi -quantitative analysis, according to results of sequencing ITS5.8s region, are *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: oleaginous yeast, lipids and biodiesel.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVO GERAL.....	25
3.1. Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. Cepas de leveduras utilizadas.....	27
4.2. Meio de cultivo.....	29
4.2.1. Meio YP.....	29
4.2.2. Meio definido sintético (SD).....	29
4.3. Condições de crescimento.....	29
4.4. Protocolo de pré-tratamento do glicerol bruto.....	30
4.5. Bioprospecção de leveduras oleaginosas.....	30
4.5.1. Análise qualitativa-Sudan Black.....	30
4.5.2. Análise semi-quantitativa-Nile Red.....	31
4.6. Identificação da(s) levedura(s) selecionada(s).....	31
4.6.1. Extração de DNA genômico de levedura	31
4.6.2. Amplificação da região ITS-5.8S	32
4.7. Caracterização de lipídeos produzidos pelas cepas selecionadas.....	33
4.7.1. Extração de lipídeos.....	33
4.7.2. Transesterificação dos lipídeos extraídos.....	33
4.7.3. Caracterização dos lipídeos.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Bioprospecção de leveduras oleaginosas.....	35
5.1.1. Análise qualitativa-Sudan Black.....	35
5.1.2. Análise semi-quantitativa-Nile Red.....	36
5.2. Identificação da(s) levedura(s) selecionada(s) pela amplificação da região ITS-5.8S.....	38
5.3. Caracterização de lipídeos produzidos pelas leveduras selecionadas.....	38
5.4. Concentração de lipídeos produzidos pelas cepas selecionadas.....	39
6. CONCLUSÕES.....	46
7. PERSPECTIVAS.....	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

Lista de abreviaturas

B5: 5% de biodiesel ao diesel comercial

CG-FID: *Gas Chromatography- Flame Ionization Detector*

CLs :Corpos lipídicos

C/N: Relação carbono/nitrogênio

DAG: Diacilglicerol

DMSO: dimetilsulfóxido

FAME: *Fatty Acid Methyl Esters*

GB: Glicerol Bruto

ITS: *Internal Transcribed Spacer region*

mg/mL: miligramas por mililitros

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

SD: Meio mínimo sintético

NR: Nile Red

YPD: Yeast Peptone Dextrose

TAG: Triacilglicerol

URL: Unidade Relativa de Luminescência

Lista de figuras

Figura 1: Reação de transesterificação dos óleos ou gorduras com o metanol no processo industrial de produção do biodiesel.....	12
Figura 2: a) Fórmula da estrutura do glicerol. b) Glicerol bruto após tratamento com ácido clorídrico concentrado para purificação.....	13
Figura 3: Tipos de transporte de assimilação do glicerol pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Vias metabólicas em que o glicerol está envolvido.....	14
Figura 4: Vias metabólicas do glicerol e seus respectivos bioprodutos.....	15
Figura 5: Via metabólica da conversão do glicerol em lipídeos.....	19
Figura 6: Representação do efeito das diferentes relações C/N e do seu impacto na acumulação de lipídeos.....	20
Figura 7: Esquema do controle de acumulação de lipídeos na levedura <i>Yarrowia lipolytica</i>	21
Figura 8: Delineamento experimental.....	24
Figura 9: Análise qualitativa da acumulação de lipídeos corados com Sudan Black. Registro fotográfico das seis cepas que apresentaram melhores perfis de acumulação de lipídeos no Sudan Black.....	34
Figura 10: Análise semi-quantitativa da acumulação de lipídeos. As cepas <i>Yarrowia lipolytica</i> (positivo) e a cepa BY4741(negativo) foram utilizadas como controle.....	36
Figura 11: Amplificação da região ITS-5.8S das vinte e cinco cepas selecionadas na análise qualitativa.....	38
Figura 12: Quantificação dos lipídeos produzidos pelas cepas selecionadas na análise análise semi-quantitativa.....	40

Lista de tabelas

TABELA 1: Produtos obtidos a partir do glicerol.....	17
TABELA 2: Cepas de leveduras selecionadas por crescerem em meio contendo glicerol 10%, metanol 12% ou etanol 12%.....	25
TABELA 3: Caracterização do perfil de ácidos graxos produzidos pelas cepas selecionadas, utilizando cromatografia gasosa (GC-FID).....	38
TABELA 4: Concentração em porcentagem de lipídeos estocados pelas cepas selecionadas.....	42

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de energia atualmente tornou-se uma grande prioridade, impulsionada fortemente pelas políticas de redução da poluição e a necessidade de encontrar formas de energia alternativas que possam substituir a limitada matriz energética mundial dos combustíveis fósseis (BILGEN *et al*, 2008). Este cenário tem estimulado a produção e o consumo mundial de energias renováveis, dentre elas destacam-se o emprego dos biocombustíveis, sendo o etanol e o biodiesel as formas mais promissoras (SILVA *et al*, 2009).

O biodiesel possui características físicas semelhantes as do óleo diesel, podendo, portanto, ser empregado em motores a diesel sem a necessidade de adaptações (CASTRO *et al*, 2004). O biodiesel caracteriza-se por ser obtido a partir de matérias-primas ricas em ácidos graxos. A produção de biodiesel está significativamente acelerada no Brasil, desde que o governo estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao combustível de petróleo mediante a lei 11097/2005. Em 2013, a quantidade de biodiesel a ser adicionado alcançou 5 % do volume total de diesel utilizado (ANP, 2014).

Estima-se que com o incremento do volume de biodiesel, ocorrerá também um aumento na produção do glicerol bruto, pois, este é um subproduto gerado na fabricação industrial do biodiesel que equivale a proximadamente a dez por cento de todo volume gerado. A produção de glicerol bruto aumentou de 83 para 330 milhões L/ano até o ano 2010 (ANP, 2014). Estes valores demonstram a necessidade de se buscar alternativas para o consumo ou reutilização industrial do glicerol bruto. Visando amplificar a aplicabilidade econômica deste subproduto, haja vista, que a rentabilidade de diversos processos químicos depende em parte, da venda dos subprodutos, permitindo assim a redução dos custos de produção e conseqüentemente, do preço final do produto.

Dessa forma, existe um grande interesse na purificação do glicerol bruto ou no seu reaproveitamento direto e sem tratamento, o que proporcionará maior competitividade ao processo de produção do biodiesel, frente à outras matrizes energéticas. Permitindo assim, que este se torne um combustível crescente no mercado de biocombustíveis.

Os processos industriais atuais de produção do biodiesel centram-se na reação de transesterificação, conforme Figura 1. Os óleos vegetais ou gordura animal ao reagirem com um monoalcoól (etanol ou metanol) na presença de um catalisador

(hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio) são esterificados, produzindo ésteres metílicos ou etílicos e gera como subproduto o glicerol bruto, que corresponde a dez por cento de todo o produto gerado na produção do biodiesel (PAPANIKOLAOU *et al*,2002; BORSCHIVER, 2006).

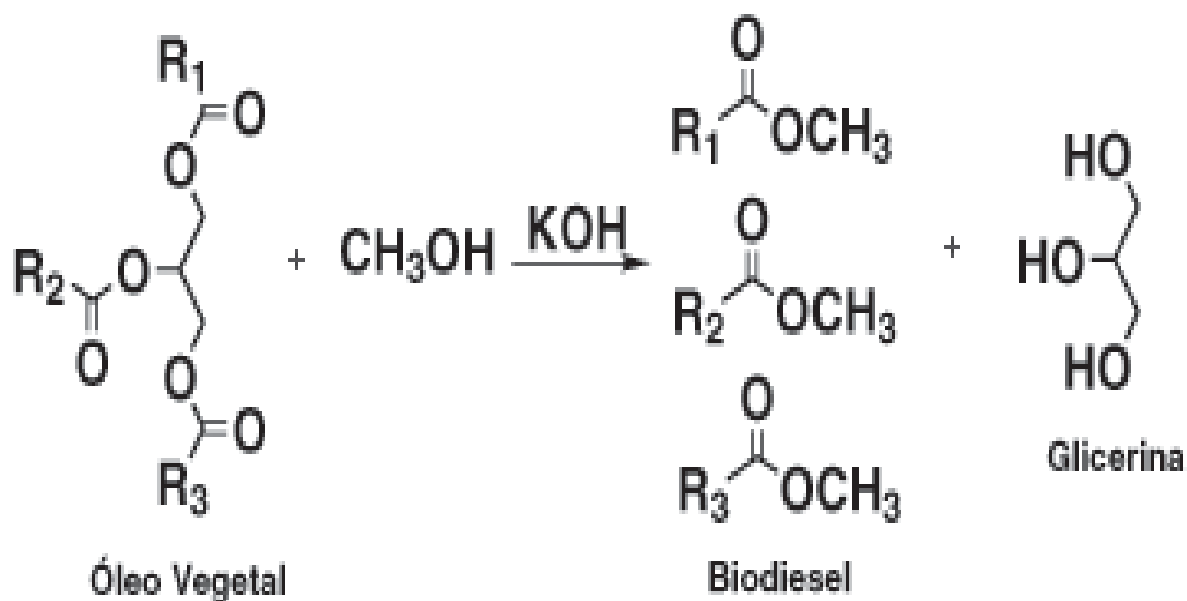


Figura 1: Reação de transesterificação dos óleos ou gorduras com o metanol no processo industrial de produção do biodiesel. Fonte: PAPANIKOLAOU *et al*, 2002.

O glicerol ou 1,2,3-propanotriol é um álcool que se apresenta como um líquido viscoso, inodoro e com sabor doce (ZAVARIZE, 2012). A estrutura química do glicerol está representada na Figura 2a. Em leveduras, o glicerol é largamente produzido em razão do aumento da osmolaridade do meio extracelular para regulação osmótica (WANG *et al*, 2001). Em sua forma pura, o glicerol possui diversas aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e química. Isto se deve as características de não toxicidade e ausência de cor e odor do glicerol puro (BASTIANI, 2014). Entretanto, o glicerol oriundo da reação de transesterificação dos triglicerídeos para produção de biodiesel, denominado glicerol bruto, apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual (Figura 2b). Os processos envolvidos na purificação do glicerol bruto incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para a remoção principalmente de K^+ e Na^+ utilizados como catalisadores. No entanto, os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel (YANG *et al*, 2001).

Estas impurezas culminam por conferir ao glicerol bruto baixa aplicabilidade no mercado e, conseqüentemente, pequena absorção pelas indústrias, resultando no descarte incorreto deste resíduo que geralmente é feito nos rios ou córregos ou mesmo através da queima deste subproduto (ZAVARIZE *et al*, 2012). Além disso, estudos anteriores demonstraram que a queima do glicerol bruto produz a cloreína um composto químico cancerígeno, bem como, o descarte incorreto do glicerol bruto pode gerar futuros problemas ambientais (DUARTE, 2011).

Assim sendo, fazem-se necessárias estratégias e pesquisas científicas que visem incrementar a absorção mercadológica do glicerol bruto, tendo como objetivo o auxílio na sustentabilidade econômica da indústria do biodiesel e, conseqüentemente, na contribuição de políticas que incentivem a produção e utilização de biocombustíveis.

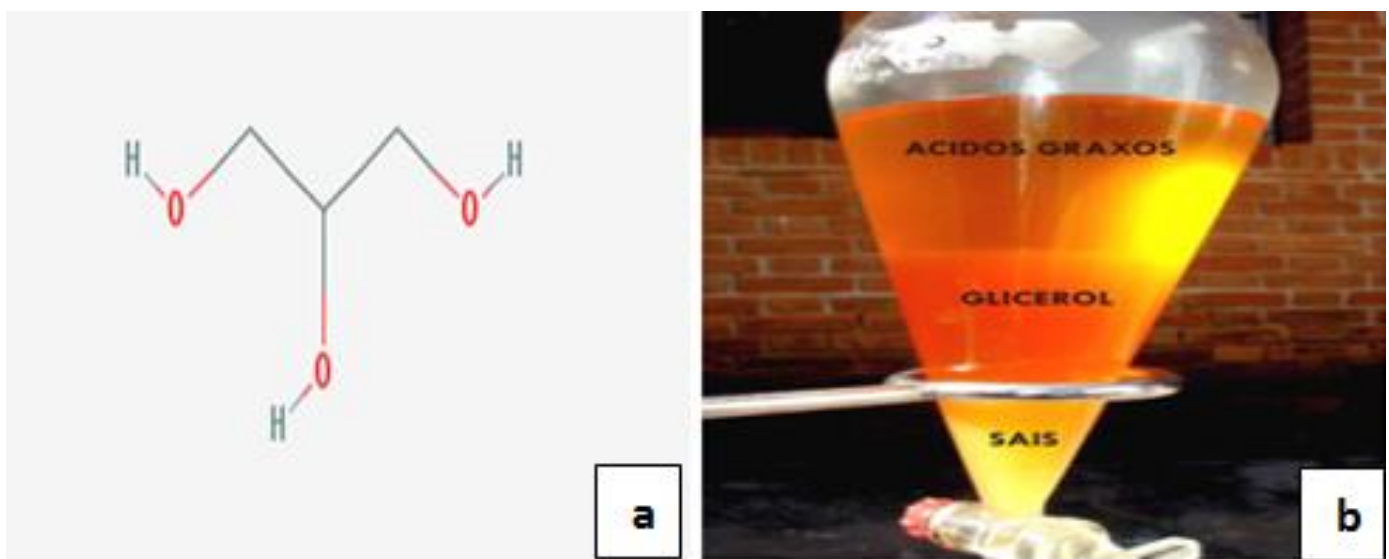


Figura 2: a) Fórmula da estrutura do glicerol. b) Glicerol bruto após tratamento com ácido clorídrico concentrado para purificação. Fonte: ZAVARIZE *et al*, 2012

O glicerol é uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas ou anaeróbicas para obtenção de energia, atuando também como regulador do potencial redox e na reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (DILLIS *et al*, 1980). Diversos estudos, especialmente os que empregam bactérias, tem demonstrado a capacidade dos micro-organismos em assimilar o glicerol e gerar compostos de interesse industrial, tais como, polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (PAPANIKOLAOU *et al*, 2002; ITO *et al*, 2005; CHENG *et al*, 2007).

A primeira etapa do metabolismo do glicerol compreende sua entrada na célula. Majoritariamente em micro-organismos, o glicerol é assimilado por transporte passivo ou transporte ativo através da membrana citoplasmática (LAGES *et al*, 1999). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estudos realizados anteriormente apontaram a existência de uma permease denominada FPS1, específica para o transporte passivo de glicerol (Figura 3) (Luyten *et al*, 2005 e GANCEDO *et al*, 1968)

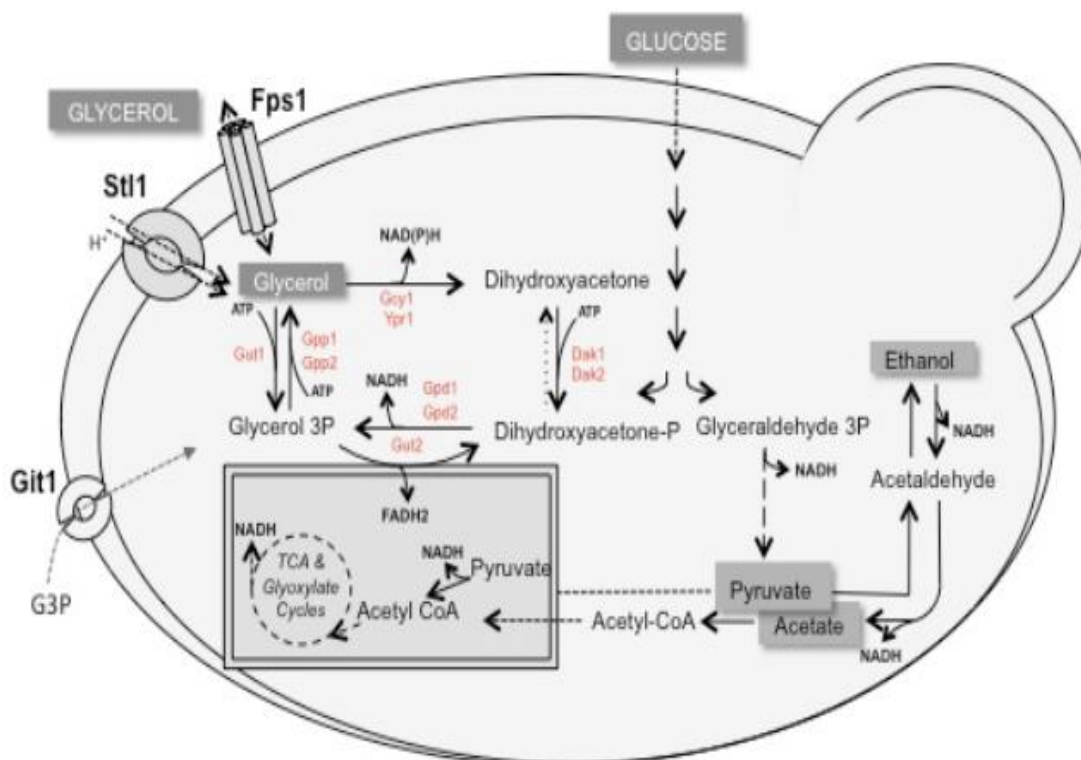


Figura 3: Tipos de transporte e assimilação do glicerol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Vias metabólicas em que o glicerol está envolvido. Fonte: LUYTEN *et al*, 1995.

Em termos genéticos foram descritos quatro genes responsáveis pela assimilação e regulação do conteúdo intracelular de glicerol, são eles: *GUT1*, *GUT2*, *STL1* e *GIT1* (HOLST *et al*, 2000) e *FPS1* (LUYTEN *et al*, 1995). Estes genes estão, respectivamente, relacionados com a fosforilação do glicerol em glicerol-3-fosfato e o transporte facilitado, sendo o Fps1p uma permease de glicerol de ação passiva e o Stl1p um transportador ativo de glicerol de ação simporte glicerol/H⁺, ambos são expressos de acordo com os estímulos recebidos pela célula, por exemplo, estresse osmótico. Contudo, os mecanismos de transporte ativo (dependente de ATP) simporte glicerol/H⁺ e simporte glicerol/Na⁺, têm sido descritos em diversas espécies de leveduras entre elas *Debaryomyces hansenii*, *Pichia sorbitophila*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces rouxii*. Uma vez presente no meio intracelular o glicerol pode ser fosforilado a glicerol-3-fosfato (G3P) ou convertido em dihidroxiacetona. Esta é, posteriormente, fosforilada em dihidroxiacetona fosfato com a produção de um NADH. Outra via alternativa para a obtenção de dihidroxiacetona fosfato e pela oxidação do glicerol-3-fosfato, produzido na célula, na qual ocorre a produção de uma molécula FADH₂. Tanto o NADH quanto o FADH₂, ambos produzidos na via metabólica do glicerol, são direcionados a mitocôndria para o ciclo do triácido carboxílico, no qual ocorre a produção de ATP e a reciclagem dos transportadores de elétrons, conforme Figura 3 (LAGES *et al*, 1999).

Portanto, estes micro-organismos têm atraído atenção por possuírem potencial por metabolizarem o glicerol bruto, oriundo da produção do biodiesel (SILVA *et al*, 2009). Dentre os micro-organismos capazes de metabolizar o glicerol destacam-se: entre os fungos leveduriformes, as do gênero *Candida* e *Saccharomyces* (ARRUDA *et al*, 2006); e entre as bactérias, a espécie *Clostridium pasteurianum* (ARRUDA *et al*, 2006). Existem disponíveis na literatura científica diversos trabalhos que empregam o glicerol como substrato alternativo para os micro-organismos, tendo como objetivo a geração de produtos de interesse industrial, conforme Figura 4 e Tabela 1 (PAPANIKOLAOU *et al*, 2003). Dentre os bioprodutos de interesse industrial gerados a partir do glicerol, pode-se citar o ácido cítrico, o etanol, ácido acético, 1,3-propanodiol, dentre outros. Conforme Figura 4.

A maioria destes bioprodutos são produzidos a partir da dihidroxiacetona que é gerada pela reação de oxidação do glicerol-3-fosfato, com geração de um FADH₂. A geração destes bioprodutos esta envolvida, portanto, com a via glicolítica dos micro-organismos mencionados e com o equilíbrio redox da célula (PAPANIKOLAOU *et al*, 2008).

Um dos bioprodutos gerado na via metabólica do glicerol de interesse industrial são os lipídeos. Estes lipídeos são produzidos por micro-organismos que são considerados uma fonte alternativa de óleos e, principalmente, de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs).

PUFAs são compostos orgânicos alifáticos com função ácida e que apresentam mais de uma ligação dupla na cadeia (AFONSO e MAROTO, 2000; CORDEIRO,1997). Ácidos graxos de cadeia curta (C14:0 e C12:0) e cadeia longa (C20:0 e C22:0) são produzidos em pequenas quantidades. Entre os PUFAs muitos são conhecidos como essências na dieta normal para prevenção de doenças relacionadas a nutrição. Os principais PUFAs produzidos são ácido linoléico, α -linoléico, γ -linoléico e araquidônico (ALONSO e MAROTO, 2000 e CORDEIRO,1997).

Os lipídeos produzidos pelos micro-organismos são gerados a partir do acetil-CoA , produzido na mitocôndria pela descarboxilação oxidativa do piruvato na via glicolítica, o acetil-CoA é inicialmente ativado em acil-CoA e posteriormente fixado a malonil-CoA que é usado na síntese de ácidos graxos. Estes lípídeos são estocados na forma de TAG dentro dos corpos Lipídicos, conforme Figura 5 (WANG *et al*, 2001).

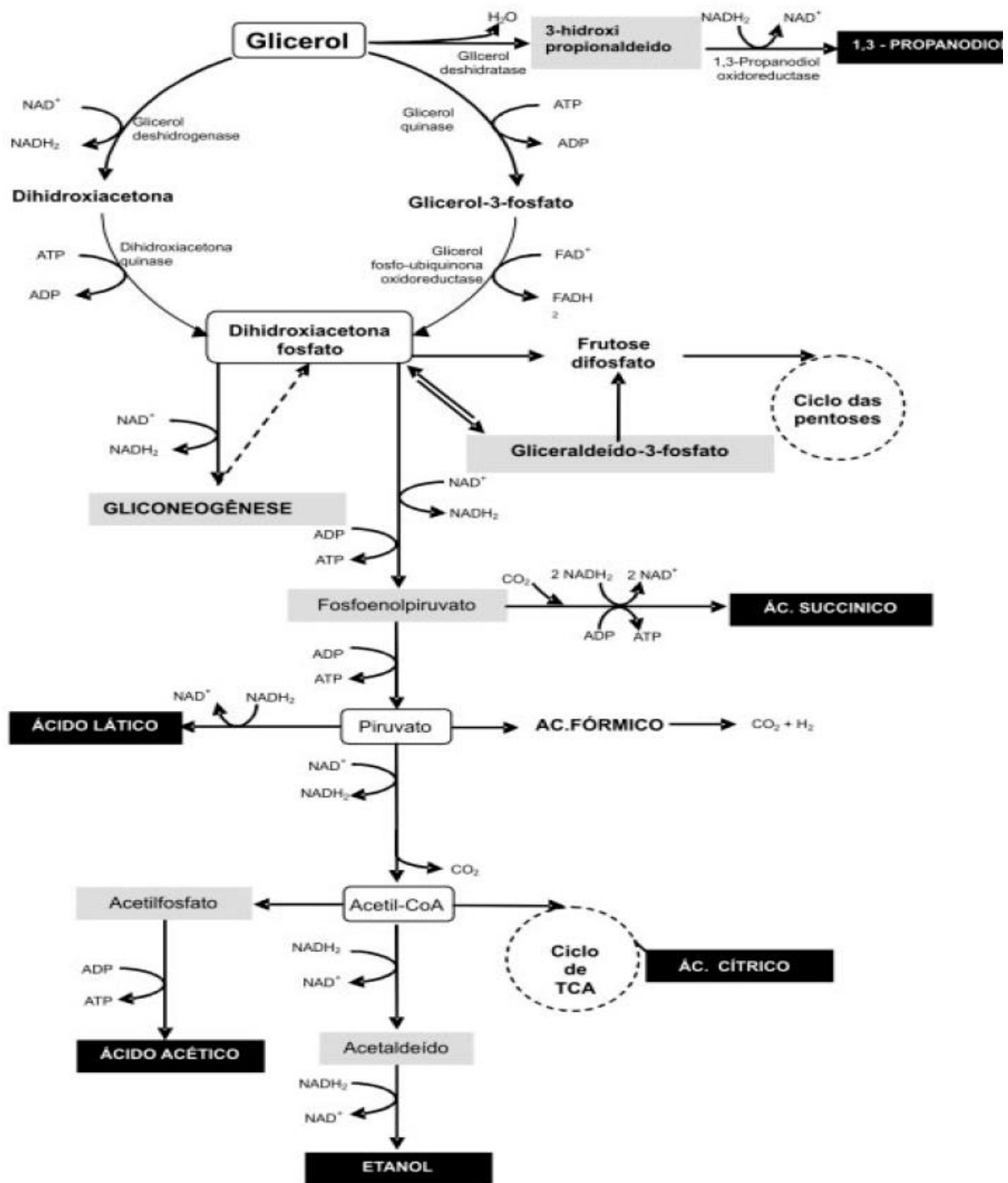


Figura 4: Vias metabólicas do glicerol e seus respectivos bioprodutos.

Fonte: PAPANIKOLAOU *et al*, 2008.

Lipídeos microbianos apresentam um potencial de aplicabilidade no mercado nutracêutico e farmacêutico, e de ingredientes para alimentos (LEWIS *et al*, 2000). Em estudos realizados anteriormente, pesquisadores tentaram isolar e otimizar a produção destes lipídeos por cepas oleaginosas. Contudo, o alto custo de produção confere uma barreira a sua comercialização (RATLEDGE, 2004). Visando reduzir este custo, subprodutos industriais têm sido usados como meio de cultivo para micro-organismos oleaginosos. Dentre os subprodutos empregados nos últimos anos destaca-se o glicerol bruto (PENG e CHEN, 2008).

Tabela 1: Produtos obtidos a partir do glicerol.

Produto	Referências
1,3 propanodiol	PAPANIKOLAOU <i>et al</i> , 2008; PAPANIKOLAOU e AGGELIS 2003; XIU <i>et al</i> , 2004.
Lipídeo	EASTERLING <i>et al</i> , 2009; MEESTERS <i>et al</i> , 1996; PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002.
Hidrogênio	ITO <i>et al</i> , 2005.
Ácido cítrico	PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2003; LEVINSON <i>et al</i> , 2007.
β-caroteno	MANTZOURIDOU <i>et al</i> , 2008.

Em leveduras e bactérias tem-se observado que o acúmulo de lipídeos ocorre em condições de estresse, por exemplo, quando existe alta relação carbono:nitrogênio no meio de cultivo (MURPHY, 1991). A capacidade de acumular óleos pelos micro-organismos tem sido descrita, principalmente, em fungos, embora, alguns trabalhos tenham demonstrado a capacidade de algumas bactérias acumularem óleos e, também, a elevada capacidade das algas de estocarem lipídeos (RATLEDGE, 2005).

As leveduras classificadas como oleaginosas são micro-organismos unicelulares capazes de estocarem mais de vinte por cento do total da sua biomassa

em lipídeos. Além dos lipídeos constituintes da membrana citoplasmática, estes micro-organismos estocam lipídeos na forma de triacilgliceróis (TAG) (GILL *et al*, 1977). Estes lipídeos estocados podem vir a contribuir para produção de óleos, visto que, sua estrutura química é muito semelhante aos óleos de origem vegetal que são usados como matéria prima na produção do biodiesel. Além disso, os micro-organismos oleaginosos possuem elevada capacidade de converter diversas matérias-primas em produtos de interesse industrial, tais como, óleos, etanol e ácido cítrico (RATLEDGE, 1994).

AGELIS e colaboradores (2002) demonstraram que a levedura *Yarrowia lipolytica* é uma levedura promissora para produção de lipídeos a partir de diversas fontes de carbono, bem como, as leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces* para as quais foram reportados acúmulos de lipídeos que ultrapassam os trinta por cento da biomassa (PAPANIKOLAOU *et al*, 2002).

EASTERLING e colaboradores demonstraram um acúmulo de trinta e oito por cento da biomassa em lipídeo para a levedura *Rhodotorula glutinis* utilizando o glicerol como substrato, e o estudo do perfil dos lipídeos produzidos mostrou a predominância do ácido graxo esteárico (EASTERLING *et al*, 2009). Segundo MEESTERS e colaboradores (1996) leveduras oleaginosas apresentam a capacidade de crescer em glicerol com curto período de geração e pouca exigência nutricional.

Diversos fatores, tais como: 1- a composição do meio:, fonte de carbono, fonte de nitrogênio e relação C/N; 2 - a aeração; bem como, 3 - as condições do meio (pH e temperatura) influenciam no crescimento celular e no acúmulo de lipídeos por micro-organismos oleaginosos (PAPANIKOLAOU *et al*, 2003). O perfil característico da acumulação de lipídeos em micro-organismos oleaginosos ocorre quando o nitrogênio do meio é esgotado. O meio de cultivo deve ser formulado com uma relação C/N >1 para garantir que o nitrogênio seja todo consumido, enquanto, outros nutrientes, incluindo o carbono, permaneçam em excesso no meio de cultivo. A limitação de nitrogênio tem sido utilizada para criar um ambiente favorável à acumulação de lipídeos (MEESTERS *et al*, 1996).

FAKAS e colaboradores (2009), estudando o comportamento bioquímico dos fungos oleaginosos *Cunninghamella echinulata* e *Mortierella isabelina* cultivados em glicerol bruto e puro, observaram que após aproximadamente 50 horas de inoculação, a fonte de nitrogênio foi consumida do meio de cultivo, o que resultou em um aumento da produção de lipídeos, e também, em altas relações C/N. O acúmulo de lipídeos foi

maior, atingindo 53,2% (3,3 g/L), a uma relação C/N de 285, durante 264 horas de fermentação para a levedura *Mortierella isabelina*.

Durante a produção celular a concentração de nitrogênio e carbono é mantida na mesma proporção no meio de cultivo. Esta fase de comportamento balanceado do crescimento continua até a máxima densidade celular, que é alcançada antes da fase de início do acúmulo de lipídeos (RATLEDGE, 2005). Os lipídeos intracelulares são produtos que estão disponíveis em uma grande quantidade de células microbianas e que podem chegar até 65% da biomassa seca em algumas espécies de leveduras (CORDEIRO, 1997).

Em geral, no que se refere ao glicerol como fonte de carbono, quando este está disponível no meio de cultivo, ele sofre a ação das enzimas glicerol quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase. O produto gerado pela glicerol-quinase, glicerol-3-fosfato, pode ser utilizado como precursor para a biossíntese de lipídeos ou para a conversão em dihidroxiacetona fosfato. Este, por sua vez, também é transformada em glicerol-3-fosfato pela enzima triose fosfato isomerase no centro da via metabólica ou pode servir como substrato para a síntese de outros metabólitos. Estas reações formam o piruvato que é convertido a acetil-coa, que reage com o oxaloacetato produz malonil-coa e, em seguida, em ácido graxo que é um precursor para a síntese de lipídeos, estes lipídeos são estocados na forma de lipídeos neutros, tais como, o triacilglicerol (TAG) nas inclusões citoplasmáticas denominadas corpos lipídicos (CLs), conforme via metabólica descrita na Figura 5 (WANG *et al*, 2001).

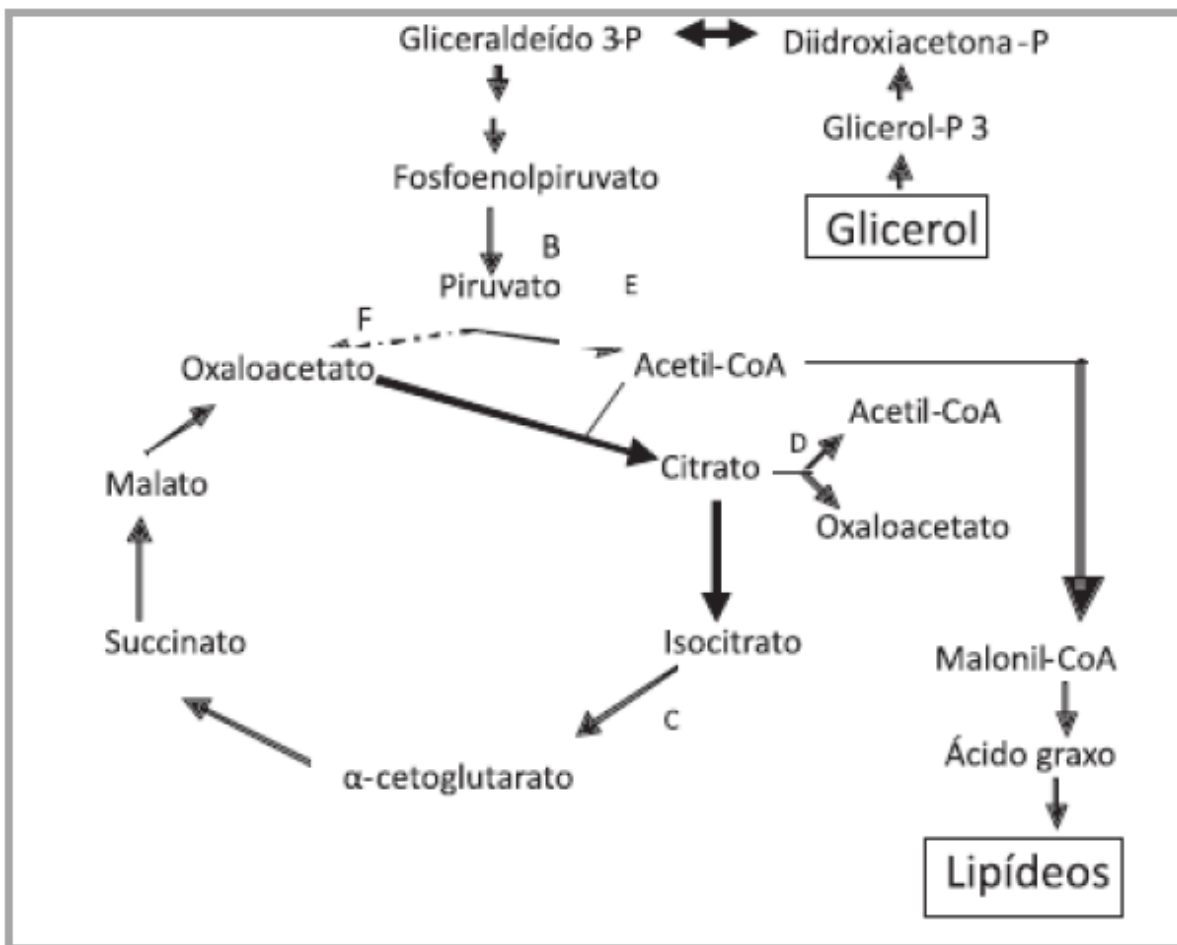


Figura 5: Via metabólica da conversão do glicerol em lipídeos. Fonte:WANG *et al*, 2001.

Conforme mencionado anteriormente, o acúmulo de lipídeos em leveduras oleaginosas depende principalmente das condições limitantes de nutrientes. Quando o carbono está presente em excesso no meio, a limitação de outros nutrientes impede as células de se reproduzirem, e desse modo, o excesso de carbono é convertido em triacilglicerol (PAPANIKOLAOU *et al*, 2007). Em estudos anteriores, nos quais avaliaram-se a limitação de fósforo, magnésio, zinco, chumbo ou ferro, foi reportado a acumulação de lipídeos nas leveduras oleaginosas (HALL e RATLEDGE, 1977; BEOPOULOS, 2009). Contudo, a limitação de nutriente no meio com altas concentrações de carbono é a forma mais eficiente para induzir acumulação de lipídeos, levando aos maiores valores de rendimento lipídico (HALL e RATLEDGE, 2001).

A relação C/N apropriada para acumulação de lipídeos é essencial para maximizar a produção de lipídeos, por isso, vários estudos objetivaram determinar matematicamente a composição ideal dos meios de cultura para maximizar a lipogênese, conforme Figura 6, sendo a maioria dos estudos feitos com as leveduras oleaginosas *Y. lipolytica* e *R. Glutinis*. Em sua maioria, estes trabalhos utilizam fontes inorgânicas de nitrogênio, tais como, o sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) em razões de C/N geralmente iguais ou superiores a 3. Razões de $\text{C/N} < 3$ tem se mostrado ineficientes na indução da acumulação de lipídeos intracelulares, Conforme Figura 6 (HALL e RATLEDGE, 1977).

Trabalhos recentes, no campo da biotecnologia de biocombustíveis, visam realizar modificações genéticas em leveduras oleaginosas objetivando otimizar a capacidade destes micro-organismos em estocar lipídeos (ATHANASIOS, 2008). Os trabalhos concentram-se na manipulação da expressão de genes envolvidos na biossíntese de lipídeos, por exemplo, a super expressão de genes que codificam enzimas da via lipogênica, como a enzima acetil-CoA-carboxilase (ACC) e/ou a deleção de genes que codificam enzimas envolvidas com a mobilização e β -oxidação dos lipídeos respectivamente genes *TGL3*, *TGL4*, *POX1*, *POX2*, *POX6*, conforme Figura 7 (ROSSI *et al*, 2010).

Estudos realizados com a levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica*, visando o aumento da acumulação de lipídeos, sobreexpressaram os genes *LRO1* e *DGA1* ambos envolvidos na conversão de DAG em Triacilglicerol, conforme Figura 7. A *Y.Lipolytica* sobreexpressando os genes referidos acima exibiu um aumento de acerca do dobro do valor de lipídeos estocados se comparado a linhagem selvagem, (MLÍCKOVÁ *et al*, 2004).

Porém, estas construções genéticas são feitas geralmente em cepas de *S. cerevisiae* por ser um organismo modelo e que possui o genoma completamente sequenciado. Embora seja uma espécie classificada como não oleaginosa, sendo seus valores de conteúdo lipídico inferiores se comparados às espécies, *Y. lipolytica* e *R. glutinis* (CAZETTA e CELLIGOI, 2005).

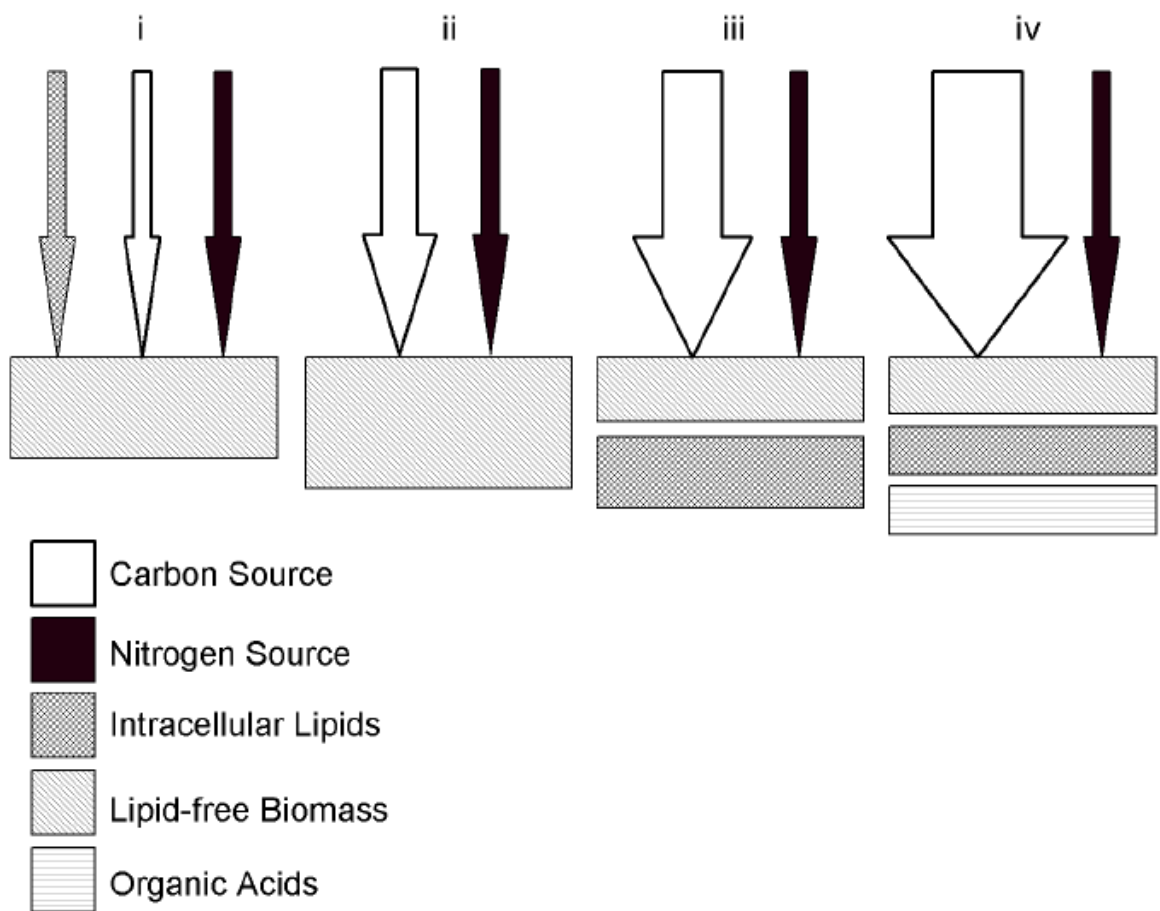


Figura 6: Representação do efeito das diferentes relações C/N e do seu impacto na acumulação de lipídeos. Sendo i C/N=1 (concentrações iguais de carbono e nitrogênio); ii C/N=2, iii C/N=3; e iv C/N =4 (adaptado de BEOUPOLOS, 2009).

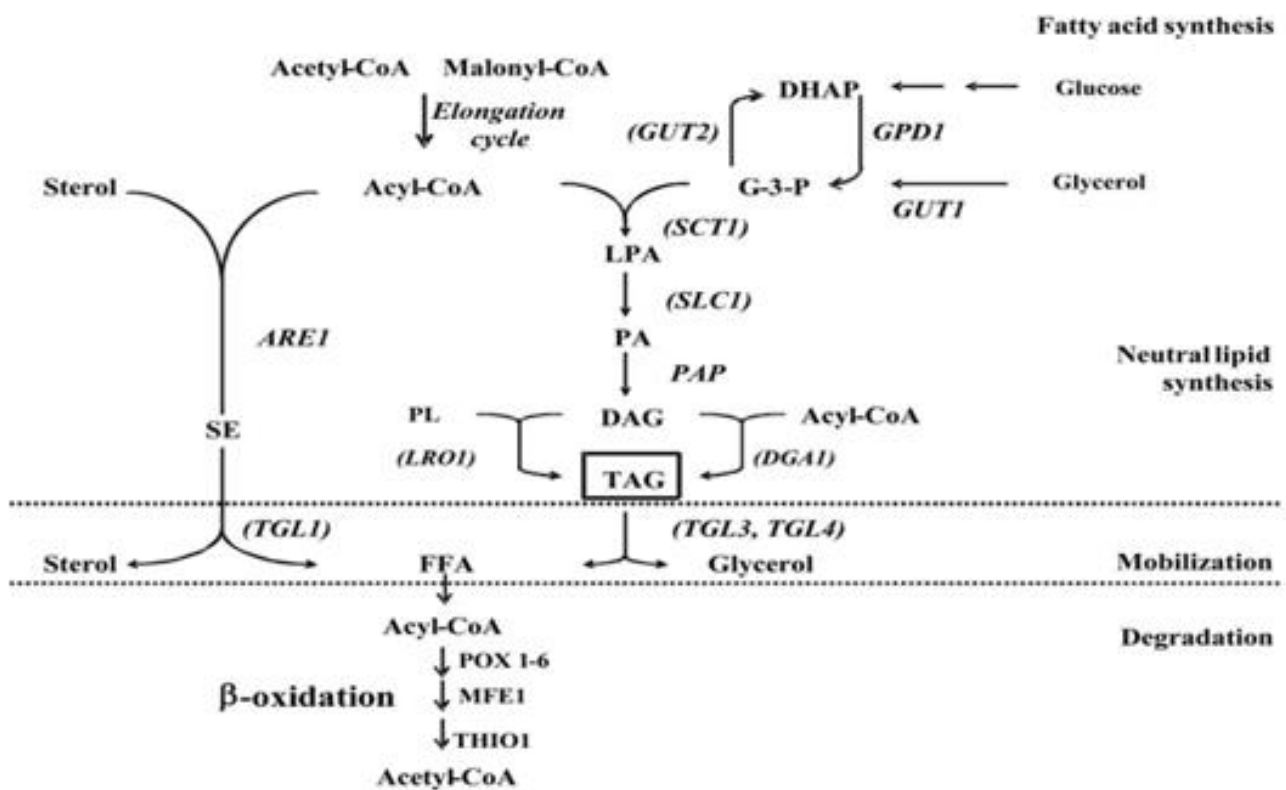


Figura 7: Via de biossíntese e β -oxidação de lipídeos na levedura *Y. lipolytica*. Conversão de glicose ou glicerol na síntese de ácidos graxos estocados na forma de TAG ou esteróis. Os lipídeos neutros estocados são β -oxidados a partir no peroxissomo pela ação das enzimas Pox1p e Pox2p expressas pelos genes *POX-1* e *POX-2*. Fonte:ATHANASIOS, 2008.

2. JUSTIFICATIVA

O crescente aumento da produção de biodiesel resulta, conseqüentemente, em um aumento na geração do subproduto, glicerol bruto (GB). Este apresenta baixo valor agregado de mercado e seu processo de purificação é oneroso para médios e pequenos produtores. Este cenário tem proporcionado o acúmulo do GB, o que pode levar a consideráveis impactos ambientais. Sendo assim, este projeto propõe uma alternativa para a utilização do GB a partir do seu emprego como fonte de carbono para as leveduras oleaginosas. Estas por sua vez, além de apresentarem capacidade de metabolizarem o GB, ao metabolizá-lo devem estocá-lo na forma de óleos com estrutura química semelhante aos óleos vegetais, os quais constituirão em fontes alternativas potenciais de matéria prima para produção do biodiesel.

3. OBJETIVO GERAL

- Selecionar linhagens de leveduras capazes de metabolizar o glicerol bruto e que apresentam elevada capacidade de acumulação de lipídeos.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de acumulação de lipídeos nas linhagens pertencentes às coleções existentes no LBCM;
- Identificar taxonomicamente a(s) levedura(s) selecionada(s);
- Caracterizar os lipídeos produzidos pelas leveduras selecionadas por meio da técnica de cromatografia gasosa (CG).

4. MATERIAL E MÉTODOS

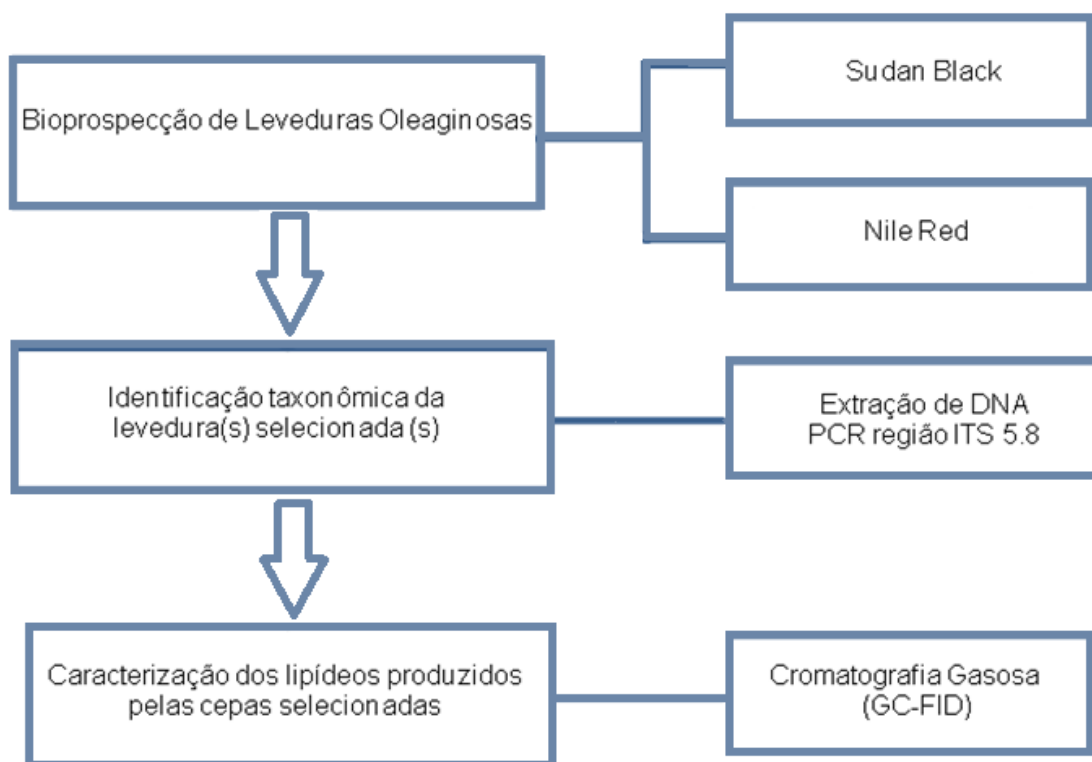


Figura 8: Delineamento experimental

4.1. Cepas de leveduras utilizadas

As cepas de leveduras utilizadas neste trabalho são pertencentes à coleção do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM). Esta coleção foi isolada de dornas de fermentação de cachaça conforme a metodologia descrita por VICENTE e colaboradores (2003). Destas, sessenta e três cepas foram selecionadas pela capacidade de crescerem em meios de cultivo contendo 10% de glicerol P.A, como única fonte de carbono; e na presença de 12% de metanol ou etanol (CONCEIÇÃO *et al*, 2015) Condições estas semelhantes às encontradas no glicerol bruto, resíduo industrial da produção do biodiesel.

A cepa laboratorial *S. cerevisiae* BY4741 foi utilizada como controle negativo; e a cepa *Y. lipolytica* NRRLY1095 foi utilizada como controle positivo nos experimentos de Sudan Black e Nile Red. As demais cepas utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Cepas de leveduras selecionadas por crescerem em meio contendo glicerol 10%, metanol 12% ou etanol 12%. Fonte: CONCEIÇÃO *et al*, 2015.

LBCM 00	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 01	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 03	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 05	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 08	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 09	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 14	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 15	<i>Pichia guilliermondii</i>	Coleção LBCM
LBCM 16	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 17	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 19	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 23	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 24	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 25	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 28	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 30	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 31	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 33	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 35	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 36	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 38	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 41	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 44	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 48	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 49	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 50	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 51	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 53	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 54	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 57	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 58	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 61	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 65	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 67	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 68	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 69	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 70	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 72	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 74	Não identificado	Coleção LBCM

LBCM75	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 77	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 78	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 79	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 80	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 81	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 82	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 86	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 89	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 90	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 92	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 93	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 95	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 96	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
LBCM 97	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 98	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 100	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 104	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 105	<i>Pichia anomala</i>	Coleção LBCM
LBCM 107	Não identificado	Coleção LBCM
LBCM 115	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção LBCM
NRRL Y 1095	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Cepa comercial CCT
BY4741	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coleção Euroscarf

4.2. Meios de cultivo

4.2.1. Meio YP

O meio líquido YP utilizado neste trabalho foi composto por extrato de levedura 1% (p/v) e peptona bacteriológica 2% (p/v), enquanto, o meio sólido houve acréscimo 1,5% (p/v) de ágar. A fonte de carbono é variável em concentração e tipo conforme o experimento, sendo esta autoclavada separadamente e acrescentada ao meio YP estéril.

4.2.2. Meio definido sintético (SD)

Os meios de cultivo líquidos e sólidos SD que foram utilizados são compostos por 0,67% (p/v) de base nitrogenada de leveduras sem aminoácidos e sem sulfato de amônio (YNB, Himedia), suplementado com os aminoácidos: arginina 20 mg/L, metionina 20 mg/L, tirosina 30 mg/L, isoleucina 30 mg/L, lisina 30 mg/L, fenilalanina 50 mg/L, triptofano 100 mg/L, histidina 100 mg/L, ácido glutâmico 100 mg/L, ácido aspártico 100 mg/L, valina 100 mg/L, treonina 200 mg/L, leucina 250 mg/L e serina 375 mg/L; e as bases nitrogenadas: adenina 50 mg/L e uracila 50 mg/L. O meio sólido foi acrescido de ágar 1,5% (p/v) e o pH ajustado com NaOH 3M para 6,5. Para o preparo do meio SD líquido, o valor de pH foi ajustado para 5,5. O glicerol bruto utilizado, como fonte de carbono, foi adicionado separadamente, em uma concentração final de 10% (v/v).

4.3. Condições de crescimento

As cepas utilizadas no ensaio colorimétrico do Sudan Black foram pré-inoculadas em meio YPD 2% e cresceram durante a noite. Após, as células foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e inoculadas em meio SD em uma concentração de $2,0 \times 10^8$ células/mL. A padronização se deu a partir da relação entre o valor da densidade óptica (DO_{600nm}) e da contagem de células. As condições de cultivo para indução de acumulação de lipídeos foram padronizadas de acordo com a literatura, sendo assim, as células foram inoculadas em meio SD contendo 10% de glicerol bruto, 0,25% de sulfato de amônio, C/N=40, pH 5,5 e incubadas a 23°C durante 48 horas na estufa AQUA LYTIC®. Após a incubação as células foram submetidas ao ensaio qualitativo utilizando para isso o corante lipofílico-Sudan Black

(KRAISINTU *et al*, 2010; KITCHA *et al*, 2011; ENSHAEIEH *et al*, 2013; SRIWONGCHAI *et al*, 2013).

4.4. Protocolo de pré-tratamento do glicerol bruto

O glicerol bruto (GB) utilizado neste trabalho foi gentilmente fornecido pelo Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) e este é um resíduo oriundo da produção do biodiesel, sendo este biodiesel produzido a partir de óleo de soja. O GB utilizado nos experimentos foi submetido a um pré-tratamento, a fim de remover possíveis contaminações bacterianas presentes no resíduo industrial, de acordo com Ferreira e colaboradores (2012). Foram pesados 44,51g de glicerol bruto que foi então homogeneizado com 7 g de H₂O (16 %) e 2,5 g de ácido acético (6 %). Posteriormente, a mistura foi aquecida a 70 °C durante 1 hora. Em seguida, a mistura foi deixada arrefecer a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Após os 15 minutos foram observados a formação de duas fases, sendo a fase superior desprezada com auxílio de uma pipeta Pasteur e a inferior centrifugada a 3750 RPM durante 20 minutos. Em seguida, o pH do GB foi ajustado para 5,5 com NaOH 5M e esterilizado por filtração em membrana Milipore 22 µm (Millex[®]-GV). Após esse pré-tratamento a concentração do glicerol bruto foi estimada a partir da equação subsequente:

$$Y=0,0023X+0,9939$$

Sendo o X a concentração do glicerol e Y a densidade do mesmo. A densidade foi obtida a partir da média da pesagem de 1 mL do GB, as amostras foram pesadas em triplicata.

4.5. Bioprospecção de leveduras oleaginosas

4.5.1. Análise qualitativa-Sudan Black

O experimento do Sudan Black foi realizado de acordo com OLIVEIRA (2010). Um esfregaço em lâmina foi realizado a partir de uma alíquota de 70 µL do inóculo crescido. O esfregaço foi submerso em uma solução de Sudan Black 0,3% e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Após, o esfregaço foi lavado com xilol para

remoção dos excessos do corante lipofílico. Em seguida foi lavado com água e seco em papel. Posteriormente, foi submerso em uma solução de safranina 0,5%, contra corante, e depois lavado com água novamente e seco por 10 segundos em estufa a 80°C. O esfregaço foi observado em microscópio óptico (objetiva de 100X) com auxílio do óleo de imersão e foi feito o registro fotográfico das cepas analisadas.

4.5.2. Análise semi-quantitativa-Nile Red

O experimento do Nile Red (NR) foi realizado em triplicata com as cepas selecionadas na etapa qualitativa (Sudan Black). Estas foram pré-inoculadas em meio YPD2% durante toda a noite e em seguida o número de células das cepas foi padronizado, conforme descrito no item 3.4. Estas foram então inoculadas em meio SD contendo glicerol bruto (GB) 10%, 0,25% de sulfato de amônio, C/N=40, incubadas a 28°C, sob agitação de 180 RPM durante 48 horas no Shaker agitador INNOVA 3000[®]. Após, os inóculos tiveram o número celular novamente padronizado e em seguida uma alíquota de 400 µL de cada inóculo foi adicionada em um microtubo de 1,5 mL contendo 500 µL de solução salina PBS pH 7,0 e 100 µL do corante lipofílico Nile Red 0,1mg/mL. Os microtubos foram homogeneizados com vortex e incubados na estufa a 30°C durante 10 minutos no escuro (WALBY *et al*, 2012).

Posteriormente, os microtubos foram novamente levados ao vortex para homogeneização e depois uma alíquota de 250 µL foi retirada dos microtubos e adicionada em uma microplaca de 96 poços preta (OptiPlate™-96F). A microplaca preta foi então analisada no leitor de microplacas VITOR X3, para realizar a leitura da fluorescência emitida pelo Nile Red. Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico Graph Pad Prism 5.0.

4.6. Identificação da(s) levedura(s) selecionada(s)

4.6.1. Extração de DNA genômico de levedura

As cepas de leveduras selecionadas na análise semi-quantitativa (Nile Red) foram identificadas com base na sequência da região ITS-5.8S. Para tanto, realizou-se o protocolo de extração de DNA genômico de levedura, como descrito a seguir.

As colônias de levedura foram ativadas em placa de Petri contendo YPD2% incubadas a 30°C durante 72 horas. Posteriormente, uma colônia isolada foi

transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio YPD2% e incubado a 30°C durante 24 horas. Após, foi transferido 1 mL do inóculo crescido para um microtubo e centrifugado a 3000g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas em água ultrapura e centrifugadas novamente por 2 minutos a 3000 x g. Então, as células foram ressuspensas em 200µL de tampão de estabilização (Sorbitol 1M; EDTA-Na₂ 2mM, pH 7,4) utilizando-se o vortex, adicionado 30µL de liticase (5U/L) e incubadas a 37°C por 60 minutos. Após o tempo de incubação, foi adicionado à mistura 200µL de tampão de lise (Tris-HCL 50mM; EDTA-Na₂ 0,1M, pH 7,5) com NaCl 5M, 10µL de SDS 10%, homogeneizada e incubada a 65°C por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 160 µL de acetato de potássio 5M ao microtubo, que foi invertido gentilmente 4 vezes e mantido a -20°C durante toda a noite. Os microtubos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Ao novo tubo foi adicionado um volume de isopropanol igual ao volume de sobrenadante e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Após o tempo de incubação, o microtubo foi centrifugado a 12.000 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA sedimentado foi lavado com etanol 70% (v/v). O sedimento formado foi seco a temperatura ambiente e foi ressuspenso em 30 µL de água ultrapura.

4.6.2. Amplificação da região ITS-5.8S

Para amplificar a região ITS (*Internal Transcribed spacer region*) correspondente à região intergênica do DNA ribossomal das leveduras, foram utilizados os dois oligonucleotídeos universais: ITS1 (5'GTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCGCTTATTGATATGC 3') conforme OLIVEIRA e colaboradores (2008). A reação foi realizada com um volume final de 25µL, a qual continha 1µL de DNA genômico (20µg/µL), 1 µL de cada oligonucleotídeo (concentração estoque 5 µM), 1,5µL de dNTP (2,5 mM cada), 5µL de tampão 5x (Promega), 16,8µL de água purificada (Sistema Mili-Q Milipore) e 0,2µL da Taq DNA polimerase 5u/µL (Promega). A reação de amplificação procedeu-se a uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida por 39 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Após o último ciclo, houve uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A análise do produto de amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) em tampão TAE

1X. O gel foi corado utilizando-se brometo de etídeo (1µg/mL) durante 30 minutos e a imagem foi digitalizada em um fotodocumentador (Alphalmager[®] mini).

4.7.Caracterização de lipídeos produzidos pelas cepas selecionadas

4.7.1. Extração dos lipídeos

Os lipídeos produzidos pelas cepas selecionadas na análise semi-quantitativa-Nile Red foram extraídos de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959), com modificação na etapa de lise, a qual foi realizada com auxílio de pérolas de vidro de 2 mm. As leveduras selecionadas foram cultivadas em meio mínimo SD contendo 10% de GB, incubadas a 28°C por 48h. Posteriormente, estas foram filtradas em membranas Millex[®] 0,22 µm e a biomassa foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e estocada a -80°C por 24h. Em seguida, a biomassa foi liofilizada, pesada e padronizada para 1g para a extração dos lipídeos. O liofilizado foi então transferido para um tudo de ensaio, a este foi adicionado 3 mL de uma solução de metanol:clorofórmio 2:1 e 0,2 g de pérolas de vidro (diâmetro de 2 mm). O tubo foi levado ao vortex durante 15 minutos com intervalos a cada minuto para refrigeração no gelo. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo e novamente foi adicionado 3 mL de uma solução de metanol:clorofórmio 2:1. A solução foi homogeneizada por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água destilada e 1,8 mL de clorofórmio, a solução foi homogeneizada por 5 minutos. Após, a solução foi submetida a uma centrifugação a 3750 RPM por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e a fase inferior foi transferida para um novo tudo. O solvente presente na solução foi seco a partir da utilização de N₂. Os lipídeos restantes no fundo do tubo foram dissolvidos em 200 µL de uma solução metanol:clorofórmio 1:1 (v/v).

4.7.2. Transesterificação dos lipídeos extraídos

Os lipídeos totais extraídos foram transesterificados em ácidos graxos metilados. Para tanto, os mesmos foram adicionados em um microtubo de 2 mL e foi adicionado uma solução de metanol:ácidoclorídrico:clorofórmio na proporção de 10:1:1 (v/v/v). Em seguida, a solução foi incubada a 90°C por 1 h. O precipitado resultante foi ressuscendido em 200 µL de hexano (LEWIS *et al*, 2000).

4.7.3. Caracterização dos lipídeos

Os ácidos graxos metilados foram caracterizados no CG (VARIAN 3800) equipado com *Flame Ionization Detector* (FID) e uma coluna de capilar de sílica Rtx5[®] (30m x 0,25 milímetros x 0,25 µm; Restek). As amostras foram aplicadas por injeção manual e as análises foram realizadas sob as seguintes condições: temperatura do injetor 240°C; temperatura do detector 240°C; temperatura inicial da coluna 140°C; rampa de temperatura, para 140°C por 20 min, 2,5°C / min até 220 °C, e 10 minutos a 220°C. A taxa de fluxo de gás foi de 1,2 mL / min, com uma razão de 1:10. O N₂ foi utilizado como gás de arraste. O volume de injeção foi de 2 µL. Foi utilizado como padrão para as análises o FAME Mix (C4-C28) Sigma .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Bioprospecção de leveduras oleaginosas

5.1.1. Análise qualitativa-Sudan Black

Sessenta e três isolados pertencentes à coleção do LBCM foram submetidos à análise qualitativa. Destes, vinte e cinco apresentaram uma coloração roxa/azul escura que se aproxima da coloração apresentada pelo controle positivo (*Yarrowia lipolytica*). Estes 25 isolados foram então selecionados para análise semi-quantitativa. A Figura 9 mostra a coloração obtida utilizando o corante lipofílico Sudan Black em seis isolados selecionados e os controles, positivo e negativo.

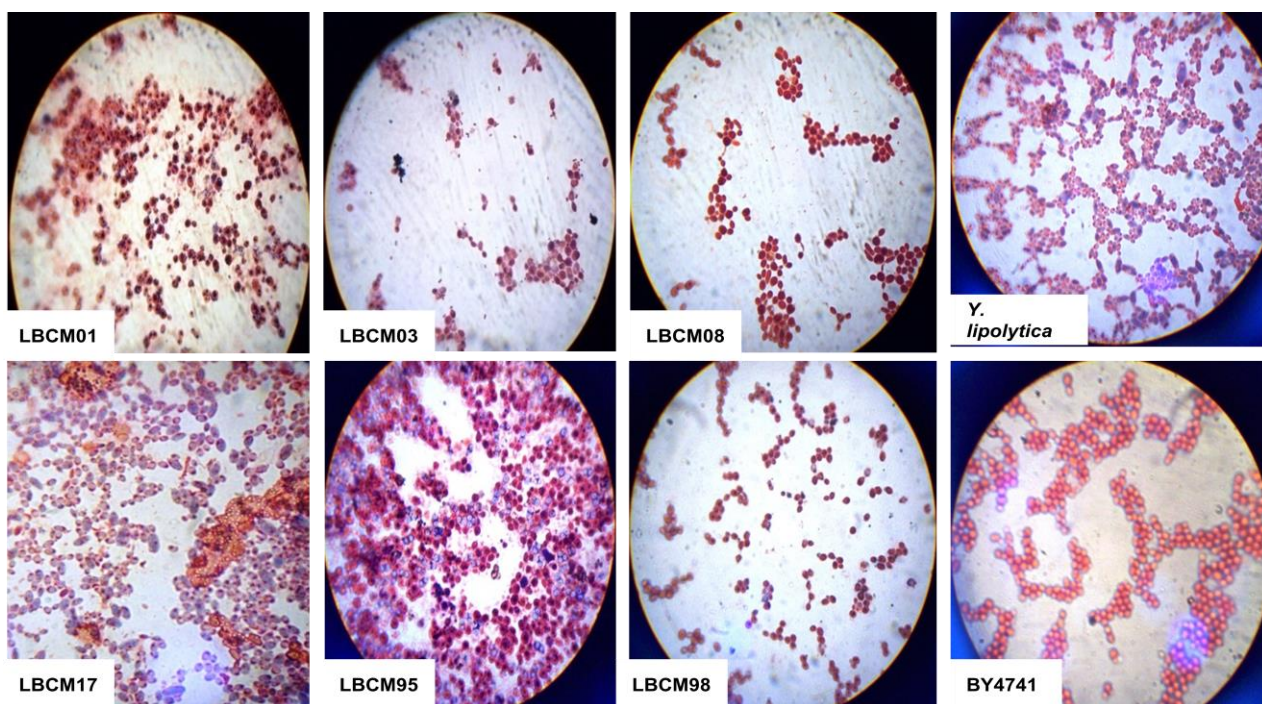


Figura 9: Análise qualitativa da acumulação de lipídeos de seis isolados de leveduras corados com Sudan Black. Registro fotográfico dos seis isolados que apresentaram melhores perfis de acumulação de lipídeos no Sudan Black. As cepas utilizadas como controle foram *Y.lipolytica* NRRLY1095 (positivo) e a *S.cerevisiae* cepa BY4741 (negativo).

O resultado obtido no experimento do Sudan Back evidencia, qualitativamente, a acumulação de lipídeos, isto porque, o corante lipofílico ao difundir-se a partir da membrana citoplasmática cora no citoplasma os corpos lipídicos (CLs), inclusões citoplasmáticas de estoque lipídico, em regiões escuras, conforme observado na Figura 9. Sendo assim, leveduras que não apresentarem os CLs não exibiram coloração roxa/azul escuro e apresentam-se coradas, conseqüentemente, de rosa claro devido à presença do contra corante safranina. Isto foi observado para a *S.cerevisiae* BY4741, uma cepa laboratorial utilizada como controle negativo.

Contudo, o corante Sudan Back embora seja lipofílico não é específico para corar os lipídeos não polares como os Triacilglicerois (TAG). Em leveduras oleaginosas o TAG é estocado nos CLs. Portanto, o Sudan Back marca tanto o TAG quanto os lipídeos estruturais, tais como, os fosfolipídeos. Assim sendo, faz-se necessário uma análise posterior específica para corar especificamente o TAG. Uma vez que, os ácidos graxos de interesse biotecnológico para produção do biodiesel localizam-se nos CLs (POLI *et al*, 2014).

5.1.2. Análise semi-quantitativa-Nile Red

Os vinte e cinco isolados selecionados na análise qualitativa foram posteriormente submetidas à análise semi-quantitativa a partir da utilização do corante Nile Red. O NR é um corante lipofílico específico para lipídeos não polares tais como o TAG, capaz de difundir-se pela membrana citoplasmática e corar de vermelho os corpos lipídicos. O NR quando excitado a 535nm emite uma fluorescência que pode ser detectada por leitores de fluorescência. Seis cepas apresentaram alta taxa de acumulação de lipídeos quando comparadas com a *Y. lipolytica* (controle positivo) (Figura 10).

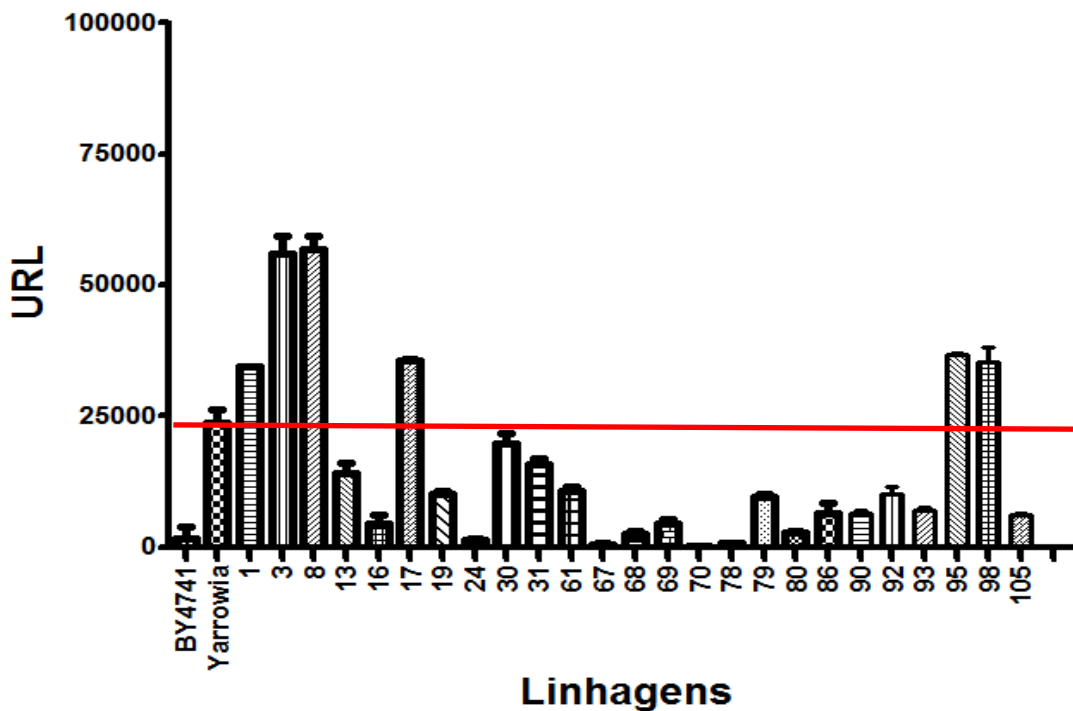


Figura 10: Análise semi-quantitativa da acumulação de lipídeos dos vinte e cinco isolados na análise qualitativa. A análise semi-quantitativa foi feita em triplicata utilizando as cepas *Y. lipolytica* NRRLY1095 (positivo) e a cepa BY4741(negativo) foram utilizadas como controle. A acumulação dos lipídeos estocados foi mensurada a partir da fluorescência emitida pelo corante Nile Red, em URL, utilizado para marcar os corpos lipídicos (CLs).

As leveduras 1, 3, 8, 17, 95 e 98 apresentaram valores de Unidade Relativa de Luminescência-URL superior a *Y. lipolytica* e este dado relaciona-se com a acumulação de TAG. Assim sendo, estes seis isolados apresentam uma alta acumulação de lipídeos. A *Y. lipolytica* é considerada o organismo modelo de acumulação de lipídeos na forma de corpos lipídicos. Este resultado corrobora o anterior obtido na análise qualitativa, pois, as mesmas leveduras que exibiram melhor perfil colorimétrico no Sudan Back também apresentaram os maiores valores de acumulação de TAG. Diversos trabalhos tem demonstrado a eficiência da técnica do NR na detecção e quantificação dos CLs em leveduras oleaginosas (PAPANIKOLAOU *et al*, 2004; ENSHAEIEH *et al*, 2013; POLI *et al*, 2015). O resultado obtido no Nile Red confirma este método como rápido e eficiente na determinação da acumulação de lipídeos intracelulares (WALBY *et al*, 2012).

5.2. Identificação da (s) levedura (s) selecionada (s) pela amplificação da região ITS-5.8S

O ITS-5.8S é uma região não traduzida que possui um papel crítico no desenvolvimento do RNAr funcional. Esta apresenta variações entre as espécies, por isso, é considerada uma região muito promissora na identificação de espécies (RODRIGUES, 2003).

As vinte e cinco leveduras submetidas à análise semi-quantitativa foram identificadas a partir da amplificação da região ITS-5.8S. Para tanto, foi realizada a extração de DNA destas leveduras e, posteriormente, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase-PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificar a região ITS-5.8S, nas condições descritas no 3.7.2.

O resultado obtido da amplificação da região ITS-5.8S demonstra que apenas a cepa LBCM 105 apresenta um perfil diferente das demais leveduras analisadas. As demais leveduras apresentaram um produto de amplificação de tamanho de pares de bases semelhante ao controle utilizado a *S. cerevisiae*, sugerindo que as leveduras podem ser *S. cerevisiae* (Figura 11). Em estudos anteriores do nosso laboratório, foi realizado a amplificação e sequenciamento da região ITS-5.8S da cepa LBCM105. O resultado apontou para 98% de identidade com a espécie *Pichia anomala* (CONCEIÇÃO *et al*, 2015). Posteriormente, as seis cepas que foram selecionadas na análise semi-quantitativa foram sequenciadas no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CBTE). O resultado do sequenciamento confirmou que estas são *S. cerevisiae*.

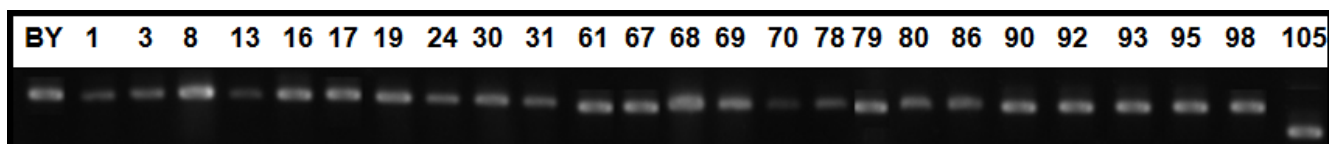


Figura 11: Amplificação da região ITS-5.8S das vinte e cinco leveduras selecionadas na análise qualitativa. Foi utilizada como controle a cepa laboratorial BY4741 (*Saccharomyces cerevisiae*).

5.3. Caracterização de lipídeos produzidos pelas leveduras selecionadas.

Para caracterizar se as seis leveduras isoladas são classificadas como leveduras oleaginosas foi verificado o percentual de acumulação de lipídeos em relação à biomassa, pois, é considerado organismo oleaginoso aquele que apresenta valor igual ou superior a vinte por cento de sua biomassa em lipídeos (ENSHAEIEH *et al*, 2013). Segundo dados da literatura, cinquenta e cinco por cento do conteúdo estocado nos corpos lipídicos é relativo ao TAG, outros trinta e cinco por cento refere-se aos ácidos graxos livres e os dez por cento restantes referem-se a outros lipídeos (MLÍCKOVÁ *et al*, 2004). Por isso, é necessário extrair e caracterizar o perfil de ácidos graxos das seis leveduras selecionadas. Para, posteriormente, verificar a potencial aplicabilidade destes óleos na produção do biodiesel, conforme Tabela 3.

Os lipídeos totais estocados pelas *Saccharomyces cerevisiae* LBCM1, 3, 8, 17, 95 e 98 selecionadas na análise semi-quantitativa, foram extraídos de acordo com o item 3.8.1. Posteriormente, estes foram transesterificados na presença de uma solução metanol:cloroformio:ácido clorídrico 10:1:1 (v/v/v) para formação de ésteres metílicos de ácidos graxos-FAME. Estes foram caracterizados no CG-FID a partir da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com os picos do padrão FAME Mix (C4-C28) Sigma[®]. A quantificação dos lipídeos acumulados foi feita a partir da comparação das áreas dos picos das amostras com o padrão.

A Tabela 3 mostra o perfil de ácidos graxos das cepas LBCM 1, 3, 8, 17, 95 e 98 selecionadas e a cepa LBCM 3 foi a que apresentou a maior diversidade lipídica, sendo capaz de produzir dez ácidos graxos dos quatorze presentes no padrão. Além disso, esta cepa foi a única das selecionadas capaz de produzir concomitantemente os ácidos linolênico e linoléico. A presença simultânea destes dois ácidos, nos corpos lipídicos, é essencial quando o objetivo é utilizar estes lipídeos como fonte alternativa de óleos para produção do biodiesel. Segundo PAPANIKOLAOU e AGELLIS(2011), os ácidos linolênico e linoléico estão presentes em óleos de soja e colza que são óleos comumente utilizados na indústria brasileira de produção do biodiesel.

Tabela 3: Caracterização do perfil de ácidos graxos, produzidos pelas cepas selecionadas, utilizando cromatografia gasosa (GC-FID). O símbolo (+) indica presença do respectivo ácido graxo na cepa analisada

Ácidos Graxos	Cepa 1	Cepa 3	Cepa 8	Cepa 17	Cepa 95	Cepa 98
Ácido araquidônico	+	+	+	+	+	+
Ácido behênico						
Ácido erúcico		+				
Ácido decanoato		+			+	+
Ácido linolênico	+	+	+	+	+	+
Ácido palmitoleico		+	+		+	+
Ácido esteárico						
Ácido palmítico		+	+		+	+
Ácido linoléico		+				
Ácido octanóico		+				
Ácido cis-9 oléico		+				
Ácido lignocérico						
Ácido láurico		+		+		
Ácido mirístico					+	

Contudo, outros ácidos graxos produzidos pelas cepas apresentam aplicabilidade nas indústrias, que não a produção de biodiesel, como os ácidos araquidônico e linolênico. Estes foram produzidos por todas as cepas e são considerados compostos nutracêuticos, isto é, que apresenta benefícios para saúde e/ou tratamento de doenças (DERNER *et al*, 2006; SILVEIRA, 2011).

Após caracterização dos lipídeos, estes foram quantificados a partir das áreas dos picos de cada amostras. Os dados foram coletados em triplicatas e analisados no programa Prism 5.0. As cepas *Y. lipolytica* e BY4741 foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente, conforme Figura 12. Dentre as cepas analisadas, a cepa LBCM 3 apresentou o maior conteúdo lipídico com valor de 0,366g de lipídeos totais. A cepa LBCM 17 apresentou o segundo maior conteúdo lipídico com valor de 0,279g de lipídeos totais, com acúmulo notável do ácido láurico 1,658mg/L. Este ácido possui aplicabilidade na indústria farmacêutica, pois é nutracêutico de ação anti-inflamatória (LASZLO, 2014).

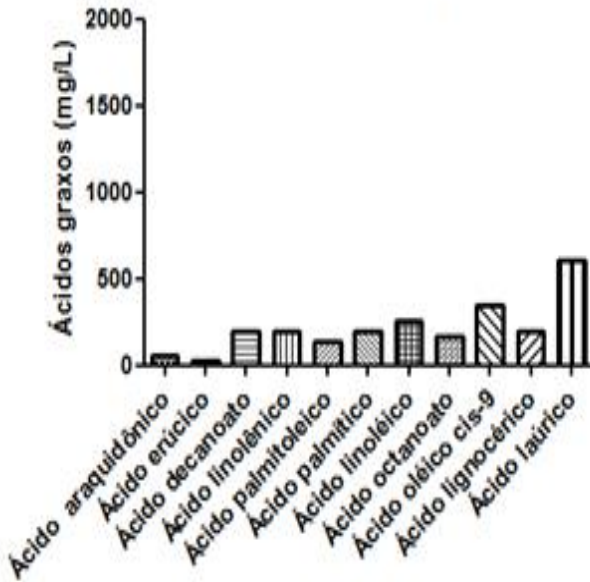
A cepa LBCM 8 apresentou conteúdo lipídico com valor de 0,210g de lipídeos totais. Com predomínio dos ácidos linolênico e palmítico ambos com aplicação na indústria farmacêutica (CURI,2011).

As cepas LBCM 95 e LBCM 98 exibiram valores de 0,219g e 0,0217g de lipídeos totais, respectivamente. E a cepa LBCM 1 exibiu o menor conteúdo lipídico, com 0,0022g de lipídeos totais. Sendo que, diversos ácidos graxos não foram detectados na cepa LBCM 1, conforme Tabela 3.

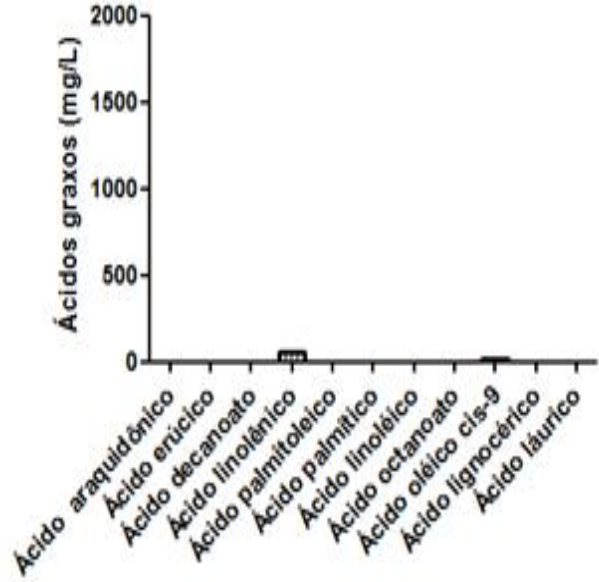
A *Y. lipolytica*, controle positivo, é organismo modelo de acumulação de lipídeos, apresentou valor de 0,611g de lipídeos totais. Com maior produção do ácido láurico. Na cepa BY4741, controle negativo, foi detectado apenas os ácidos oleico cis-9 e ácido linolênico totalizando 0,0021g de lipídeos totais.

O perfil e a quantidade de ácidos graxos produzidos por leveduras oleaginosas estão relacionados com as condições de cultivo. Entre elas, uma variação importante é a fonte de carbono utilizada, pois um mesmo micro-organismo pode apresentar distintos perfis de ácidos graxos em diferentes fontes de carbono (MURPHY, 1991).

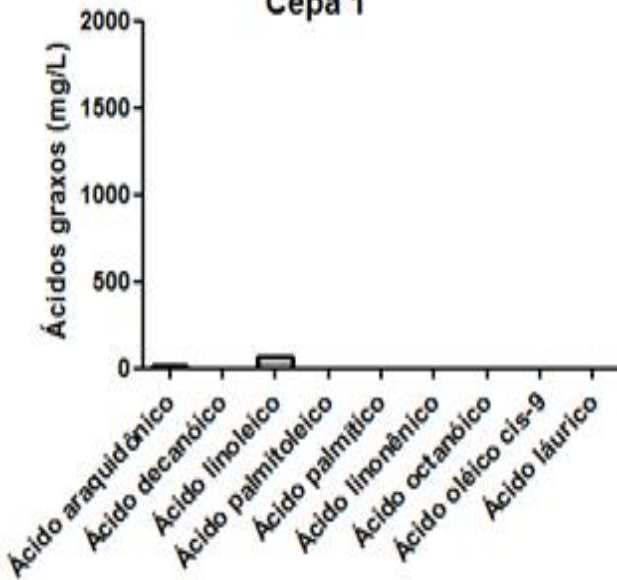
Yarrowia lipolytica



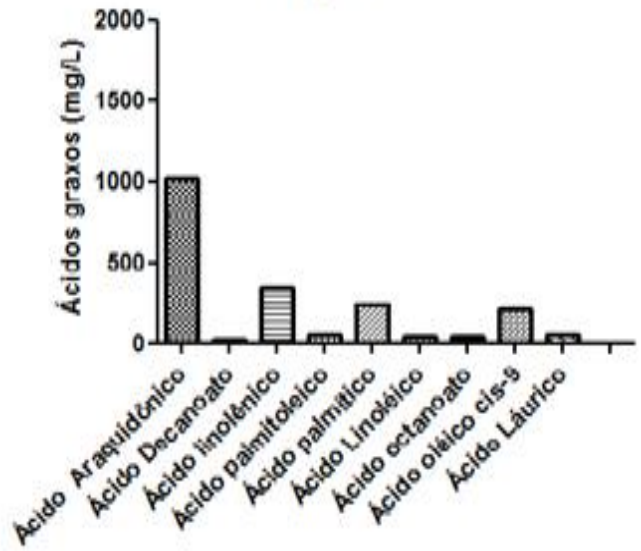
BY4741



Cepa 1



Cepa 3



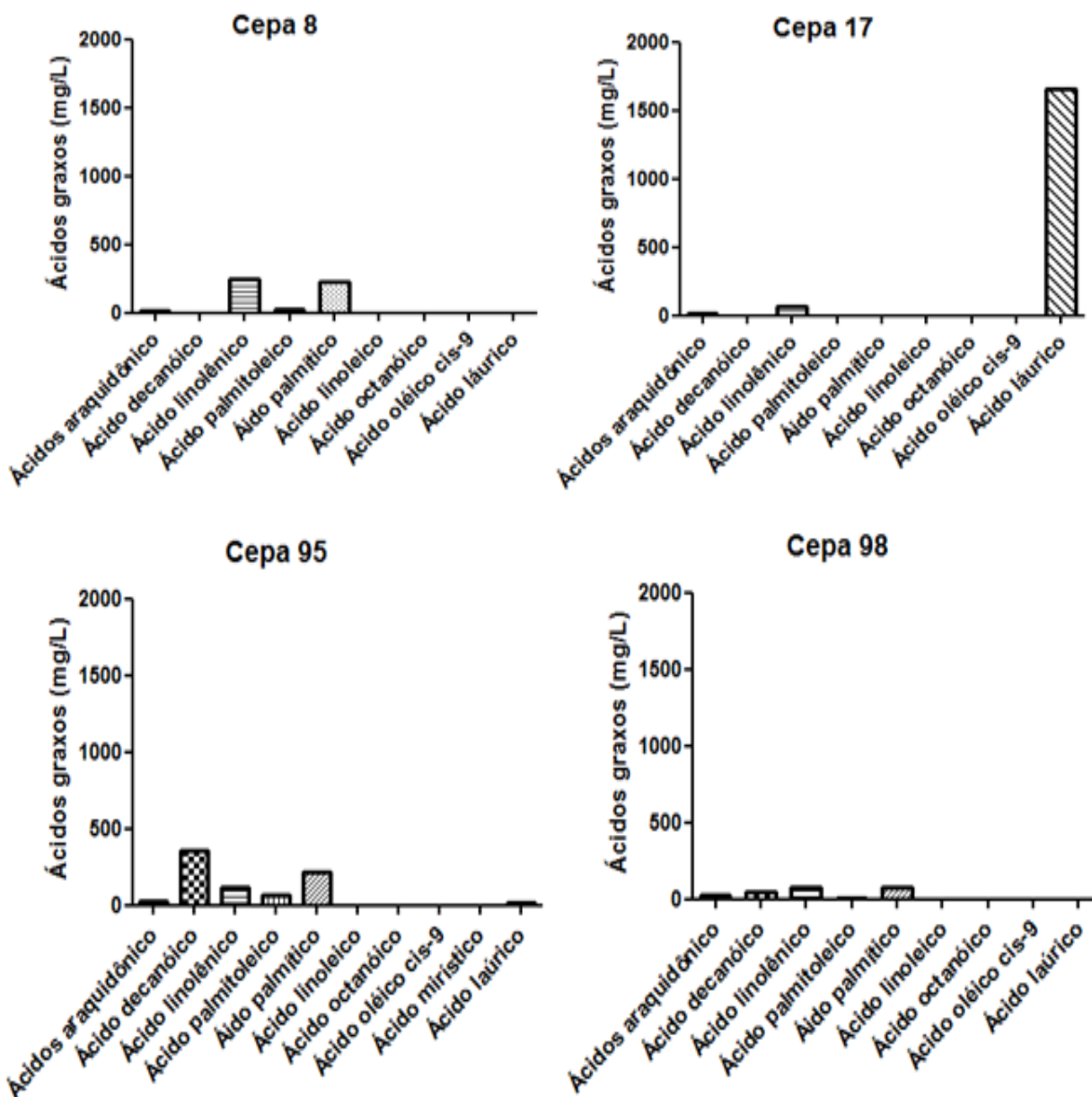


Figura 12: Quantificação dos lipídeos identificados nas cepas LBCM1, 3, 8, 17, 95 e 98 selecionadas na análise semi-quantitativa como acumuladoras de lipídeos.

5.4. Concentração de lipídeos produzidos pelas cepas selecionadas.

A classificação de um organismo como oleaginoso é dependente deste apresentar uma concentração igual ou superior a vinte por cento de sua biomassa em lipídeos estocados (PAPANIKOLAOU, 2003). Para tanto, é realizado um cálculo de lipídeos totais em porcentagem, em que considera-se a biomassa final na qual foram extraídos os lipídeos (CASTANHA, 2012). Equação:

$$\text{Lipídeos totais (LT) (\%)} = [\text{Massa total de lipídeos (g)} \times 100] / \text{biomassa (g)}$$

A biomassa final, da qual foram extraídos os lipídeos, foi padronizada para 1g, e a massa total de lipídeos estocados foi quantificada a partir da utilização CG-FID. Procedeu-se então o cálculo da concentração de lipídeos das cepas selecionadas, a fim de verificar se estas são leveduras oleaginosas. O resultado obtido dos cálculos está representado na Tabela 4.

Tabela 4: Concentração de lipídeos estocados pelas cepas selecionadas

Cepa	Identificação	Biomassa(g)	Massa de lipídeos totais(g)	LT(%)
NRRLY 1095	<i>Yarrowia lipolytica</i>	1	0,6110	61,10
BY4741	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,0021	00,21
LBCM 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,0022	00,22
LBCM 3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,3660	36,60
LBCM 8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,2100	21,00
LBCM 17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,2790	27,90
LBCM 95	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,2190	21,90
LBCM 98	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0,0217	02,17

As cepas 3, 8, 17 e 95 apresentaram valores superiores a vinte por cento de sua biomassa em lipídeos estocados. Portanto, são classificadas como leveduras oleaginosas. As cepas LBCM 1 e 98 não são classificadas como oleaginosas. A cepa LBCM 3 exibiu a maior porcentagem de acumulação de lipídeos cerca de 36,60%, seguida pela cepa LBCM 17 com 27,90%. Corroborando o resultado anterior da quantificação dos lipídeos, a cepa LBCM 1 apresentou o menor valor de lipídeos totais estocados. Os resultados obtidos na quantificação de lipídeos não corroboram o presente na literatura, pois em trabalhos anteriores cepas de *S. cerevisiae* foram descritas como não oleaginosas devido ao fato de apresentarem conteúdo lipídico inferior a vinte por cento (DUARTE *et al*, 2011; AMI *et al*, 2014).

Porém, as cepas de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho foram isoladas de dornas de alambiques de cachaça e, portanto, tendem a apresentarem uma maior robustez metabólica e plasticidade fenotípica que as cepas laboratoriais utilizadas na literatura (CONCEIÇÃO *et al*, 2015).

Uma vez que, estas leveduras foram isoladas em um ambiente com alta pressão seletiva imposta por fatores, tais como, pressão osmótica e altas concentrações de etanol, dentre outros. O acúmulo de lipídeos que ocorre usualmente em condições de estresse poderia conferir uma vantagem adaptativa a estas leveduras no que se refere ao processo competitivo.

Os lipídeos estocados pelas cepas selecionadas LBCM03; LBCM08; LBCM17; LBCM95 e LBCM98 foram sintetizados a partir da assimilação do glicerol bruto, presente no meio, que é internalizado pelo transportador ativo de glicerol, Stt1p. Uma vez presente no meio intracelular o glicerol é convertido a glicerol-3-fostado pela ação da enzima glicerol quinase. O glicerol-3-fosfato é convertido em ácido lisofosfatídico (LPA) pela enzima glicerol-3-fosfato aciltransferase, em seguida o LPA é acilado em ácido fosfatídico (PA). A enzima ácido fosfatídico fosfatase desfosforila PA produzindo diacilglicerol (DAG). Diacilglicerol aciltransferase é a enzima que catalisa a acilação de DAG em triacilglicerol (TAG). O TAG produzido é estocado nas inclusões citoplasmáticas denominadas corpos lipídicos (CLs). Conforme Figura 7. (ATHANASIOS, 2008).

6 CONCLUSÕES

Vinte e cinco leveduras pertencentes à coleção do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) são capazes de utilizar o glicerol bruto como única fonte de carbono e estocá-lo em lipídeos.

Os parâmetros de cultivo utilizados neste trabalho foram eficientes na indução da acumulação de lipídeos nas leveduras selecionadas.

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* LBCM 3, 8, 17, 95 apresentam elevada acumulação de lipídeos e podem ser denominadas leveduras oleaginosas. Estas cepas são, a partir dos resultados do sequenciamento da região ITS 5.8S, *Saccharomyces cerevisiae*. A concentração de lipídeos determinada a partir da análise de GC-FID sugere que as cepas LBCM1 e 98 não são oleaginosas.

A cepa LBCM 3 é a única capaz de produzir simultaneamente os ácidos graxos, linoléico e linolênico. E estes são desejáveis no processo de produção industrial do biodiesel. Portanto, os lipídeos estocados pela cepa LBCM 3 são potenciais fontes alternativas de óleos para produção do biodiesel.

7 PERSPECTIVAS

Otimizar as condições de cultivo que favoreçam o consumo de GB e induzam a eficiente acumulação de lipídeos nas cepas selecionadas.

Realizar estudos de genômica comparativa da cepa LBCM 3 com a *Yarrowia lipolytica* que é considerada um modelo de organismo oleaginoso.

Quantificar o consumo de glicerol bruto no HPLC e posteriormente realizar os cálculos de rendimento lipídico.

Caracterizar o glicerol bruto pré-tratado no HPLC.

Avaliar o crescimento das cepas LBCM01,03, 08, 17 ,95 e 98 em glicerol bruto não pré-tratado.

Avaliar o efeito de outras relações de C/N na indução da acumulação de lipídeos. Valores de C/N >40.

Realizar uma reação de PCR para verificar a possível amplificação do gene *ACL*, responsável pela síntese da enzima ATP: citrato liase, que é exclusiva de micro-organismos oleaginosos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGELIS, G.; SOURDIS, J. Prediction of lipid accumulation-degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 72, p. 159-165, 1997.

ALONSO, D.; MAROTO, F. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 481-497, 2000.

AMI,D;POSTERI,R; MEREGHETTI,P; PORRO,D; DOGLIA,S.M; BRANDUARDI,P. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Biotechnology for biofuels*. p 7-12. 2014.

ANP.Disponível em:<http://www.anp.gov.br>. Acessado em 12/02/2015 às 19:30. 2014.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Revista Analítica*, São Paulo, nº 26, p. 56-62, 2006.

ATHANASIOS.Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica* .*Microbial*. v 30.p 77-80. 2008.

BASTIANI,D.Determinação de dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido para sistemas contendo éster metílico de ácidos graxos, glicerina bruta e metanol. UFSC. 2014.

BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; JOUVE, C. M.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 48, p. 375-387, 2009.

BILGEN, S.; KELES, S.; KAYGUSUZ, A.; SARI, A.; KAYGUSUZ, K. Global warming and renewable energy sources for sustainable development: A case study in Turkey. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 12, p. 372-396, 2008.

BLIGH, E. G. and DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification.*Canadian Journal Biochemistry Physiology*. n.37, p.911-917, 1959.

CASTANHA,R.F. Utilização do soro do queijo para produção de lipídeos por leveduras oleaginosas.USP.Piracicaba.2012.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por Biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-deaçúcar como substrato para a produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactérias. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 26, p. 105-112, 2005.

CONCEIÇÃO, L.E.F.R; SARAIVA, M.A.F; DINIZ, R.H.S; OLIVEIRA, J; BARBOSA, G.D; ALVAREZ, F; CORREA, L.F.M; MEZADRI, H; COUTRIM, M.X; AFONSO, R.J.C.F. Biotechnological potencial of yeast isolates from cachaça: the brazilian spirit. *Industrial Microbiology & biotechnology*. pp 237-246. 2015.

CORDEIRO, E. F. Efeito das condições de cultivo na composição de ácidos graxos produzidos pelas leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae*. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1997.

CURI, R. Efeito dos ácidos oléico, linoléico e palmítico na proliferação celular e expressão de a-enolase e FBP (FAR upstream element-binding protein) em fibroblastos murinos: possível aplicação no processo de cicatrização. USP. São Paulo. 2011.

DENER, R.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. v 45 .pp 233-240. 2006.

DILLIS, S.S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, M.R.; SAIER, M.H.; Carbohydrate transport in bacteria. *Rev Microbiology*., v 44, p 385. 1980.

DUARTE, S. H. Utilização do glicerol bruto proveniente da síntese do biodiesel para produção de lipídeos por leveduras silvestres. UNICAMP. 2011.

EASTERLING, E. R.; FRENCH, W. T.; HERNANDEZ, M. L.; LICHA, M. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 356-361, 2009.

ENSHAEIEH, M.; ABDOLI; NAHVI, I.; MADANI, M.; selection and optimization of single cel oil production from *Rhodotorula* 110 using environmental waste as substrate. 2013.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BASTOS, A.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.;MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass & Bioenergy*, v. 33, p. 573-580, 2009.

GANCEDO, C; GANCEDO, J.M; SOLS, A.; Europe. *Journal Biochemistry*. V. 6, p 165. 1968.

GILL, C.O.; HALL, M.J.; RATLEDGE, C. Lipid accumulation in oleaginous yeast (*Candida 107*) growing on glucose in a single stage continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 33, p. 235-239, 1977.

HERNALSTEENS,S.; MAUGERI, F. Synthesis of frut oligosaccharides using extracellular enzymes from *Rhodotorula* sp. *Journal of Food Biochemistry*, v.34, p. 520-534, 2010.

INNIS, S.M. Fatty acids and early human development *Early Human Development*, v. 83, p. 761-766, 2007.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, p. 260-265, 2005.

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipids production using crude glycerol as carbon source. 2011.

KRAISINTU, PAKAWAT.; MANITCHAI, W.; LIMTONG, S. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. 2010.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology*, v. 145, p. 2577-2585, 1999.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C.; *Microbiology*, 45, p 2577. 1999.

LASZLO,F. A Importância do óleo de côco - Ácido Láurico. v. 13, p. 133, 2014.

LEE, P.C.; LEE, W.G.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N.; *Biotechnology.Bioeng.*2001, 72, 41
CHENG, K-K.; ZHANG, J-A.; LIU, D-H.; SUN, Y.; LIU, H-J.; YANG, M-D.; XU, J-M.;
Process. Biochemistry., v.42, p 740. 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (1993). *Principles of biochemistry*
(2nd ed.). New York, NY: Worth.

LEWIS, T; NICHOLS,P.D; MCMEEKIN,T.A. Evaluation os extraction methods for
recovery of fatty acids from lipids producing. *Journal Microbiology.*v43. 2000.

LUYTEN, K.; ALBERTYN, J.; SKIBBE, W.F.; PRIOR, B.A.; RAMOS, J.; THEVELEIN,
J.M.; HOHMANN, S.; *EMBO J.* v 14. p1360.1995.

MEESTERS, P. A. E. P.; HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G. High cell density
cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a
carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, p. 575-579, 1996.

MLÍCKOVÁ, K.; LUO,Y.; ANDREA,S.; PEC,P.; CHARDOT, T.; NICAUD, J. Acyl-CoA
oxidase, a key step for lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of*
*Molecular Catalysis.*v34. p312. 2004.

MONTET, D.; RATOMAHENINA, R.; GALZY, P.; PINA, M.; GRAILLE, J.A study of the
influence of the growth media on the fatty acid composition in *Candida lipolytica*
DIDDENS and LODDER. *Biotechnology Letters*, v. 7, p. 733-736, 1985.

MORRISON, L. R. Glycerol. In: *Encyclopedia of Chemical Technology*, New York:
Wiley, v.11, p. 921-932. 1994.

MURPHY, D. Storage lipid bodies in plants and other organisms.*Progress in Lipid*
Research, v. 29, p. 299-324. 1991.

NACHILUK, K.; FREITAS, S. M. Evolução da capacidade instalada para produção de
biodiesel no Brasil e auto-abastecimento regional. *Análises e Indicadores do*
Agronegócio, v. 4, p. 1-5, 2009.

NAE (Núcleos de Assuntos Estratégicos da Presidência da República). Glicerol:
mercados e perspectivas. In: *Biocombustíveis*, p. 105-106. 2005.

PACHAURI, N.; HE, B. Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: a survey of current research activities. In: ASABE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING, Portland, Oregon. p. 9-12. 2006.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Bioresource Technology*, v. 82, p. 43-49, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 5, p. 542-547, 2003.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 80, p. 215-224, 2001.

PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, p. 308-312, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology*, v.95, p. 287-291, 2004.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I.; Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl. Microbiology.*, v.92, p 737. 2002.

POLI, J.S; LUTZHOT, H.H; KARAKASHEV, D.B; VALENTE,P; ANGELIDAKI,I. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Bioresource Technoloy*. p 388-391.2014.

PHENG e CHENG, K-K.; ZHANG, J-A.; LIU, D-H.; SUN, Y.; LIU, H-J.; YANG, M-D.; XU, J-M.; *Process Biochemistry*. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste.v 42. p 740.2008.

OLIVEIRA, C.F. Produção de Polihidroxitirato: Bioprospecção de *Beijerinckia* sp., da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel. 2010.

OLIVEIRA, C.M.G., A.C.Z. MACHADO, R.K. KUBO & R. HAKAKAVA. Diagnose de *Aphelenchoides fragariae* e *Pratylenchus* spp. pela aplicação da tecnologia do código de barras do DNA. *Nematologia Brasileira*,33: 218-225. 2008.

RATLEDGE, C.. Yeasts moulds algae and bacteria as sources of lipids. In: Kamel, B.S., Kakuda, Y. (Eds.), *Technological Advances in Improved and Alternatives Sources of Lipids*. Blackie academic and professional, London, p. 235-291. 1994.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, v. 86, p. 807–815, 2004.

RATLEDGE, C.; COHEN, Z. *Single Cell Oils*. AOCS Press, Illinois Champaign (Eds), USA, p. 2-3. 2005.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel - Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*- nº 37, p. 44-51, 2008.

RIVALDI, J.D.; FONSECA, R.; SARROUH, B.F.; JORGE, N.; SILVA, S.S.; *Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Curitiba, Brasil, 2007.

RODRIGUES, R.H. Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea saccharalis* por primers específicos. São Paulo. 2003.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 30-39, 2009.

SILVEIRA, M.J. Atividade enzimática e produção de ácido γ -linolênico por fungo filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins. SP. Fevereiro de 2011.

SRIWONGCHAI, S.; PAKETHITUYOOK, P.; KRUATRACHUE, M.; BAYILA, P.; LEE, H. screening of selected oleaginous yeasts for lipid production from glycerol and some factors which affect lipid production by *Yarrowia lipolytica* strain. 2013.

VICENTE, M.A; FIETTO LG; CASTRO, IM; SANTOS, AN; COUTRIM, MX; BRANDÃO, RL. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains producing higher levels

of flavoring compounds for production of “cachaça” the Brazilian sugarcane spirit. Journal Food Microbiology 108:p 51–59. 2006.

WALBY,Z; ROLPH, C; LAWRENCE,C. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in a range of yeast species. 2012.

WANG, Z-X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. Biotechnology Advances, v. 19, p. 201-223, 2001.

YANG, X.J.; KOW, L.M.; FUNABASHI, T.; MOBBS, C.V.; Diabetes, v.48,p 1763,1999.

YONG, K.C.; OOI, T.L; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z.; HAZIMAH, A.H.; J. Oil Palm Res,v.13,p 39, 2001.

ZAVARIZE, K.C.Utilização da glicerina proveniente da produção do biodiesel na dieta de frangos de corte. USP.2012.