



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

ELISA DUARTE GUERRA COELHO

**Quantificação e caracterização de óleo microbiano produzido por  
linhagens de *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de  
carbono**

BELO HORIZONTE, MG  
2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

**Quantificação e caracterização de óleo microbiano produzido por linhagens de *Yarrowia lipolytica* utilizando glicerol como fonte de carbono**

**ELISA DUARTE GUERRA COELHO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

**Orientador:** Prof. Carlos Augusto Rosa – Departamento de Microbiologia, UFMG

**Colaboradores:** Vanya M. D. Pasa, Nilva Pereira Lopes e Rosângela Alves de Souza – Laboratório de Ensaio de Combustíveis, Departamento de Química, UFMG

Belo Horizonte, MG  
2018

Agradeço a Deus pela proteção. Aos meus pais e meu irmão Igor por me darem força e serem meus exemplos. Aos amigos de Ouro Preto por serem meu alívio durante a difícil caminhada. Ao professor Carlos pela orientação, ensinamentos e apoio. Aos amigos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos pela companhia e ajuda diárias. À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Microbiologia pelo apoio acadêmico e institucional, e à CAPES pelo apoio financeiro.

*Muito obrigada!*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	V
LISTA DE TABELAS .....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	VII
RESUMO .....	IX
ABSTRACT .....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1. Energia renovável .....	3
2.2. Biodiesel .....	5
2.3. Biocombustíveis de 1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> e 3 <sup>a</sup> gerações .....	8
2.4. Glicerol como substrato para a produção de biodiesel .....	12
2.5. Leveduras oleaginosas .....	14
2.6. Síntese de ácidos graxos por leveduras .....	18
2.7. <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	23
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. Geral .....	29
4.2. Específicos.....	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1. Linhagens de leveduras e manutenção .....	30
5.2. Condições de cultivo .....	30
5.3. Determinação da biomassa seca .....	31
5.4. Extração dos lipídeos.....	32
5.5. Determinação do perfil de ácidos graxos .....	32
5.6. Análise do consumo da fonte de carbono .....	34
5.7. Análises estatísticas.....	34
6. RESULTADOS .....	35
6.1. Análise da biomassa, produção lipídica e consumo de glicerol puro nos ensaios a 15 °C .....	35

6.2. Análise da biomassa, produção lipídica e consumo de glicerol puro nos ensaios a 25 °C .....	37
6.3. Caracterização e quantificação dos ácidos graxos produzidos a partir de glicerol puro .....	40
6.4. Avaliação do crescimento, consumo de substrato e quantificação dos lipídeos produzidos a partir de glicerol bruto .....	43
6.5. Caracterização e quantificação dos ácidos graxos produzidos a partir de glicerol bruto .....	46
7. DISCUSSÃO.....	49
7.1. Análise da biomassa, rendimento e conteúdo lipídico .....	49
7.2. Análise dos perfis graxos .....	58
8. CONCLUSÃO .....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 – Fontes de energia consumidas em 2015.....	4
FIGURA 2 – Reação de transesterificação de triglicerídeos.....	6
FIGURA 3 – Principais ácidos graxos presentes nos TAG (triacilgliceróis) dos lipídeos de leveduras.....	15
FIGURA 4 – Fases de crescimento, transição e acumulação de lipídeo.....	18
FIGURA 5 – Via de transporte de citrato da mitocôndria para o citoplasma.....	20
FIGURA 6 – Formação de malonil-CoA.....	21
FIGURA 7 – Peso seco, rendimento lipídico e conteúdo lipídico médio das cinco análises dos ensaios com glicerol bruto a 25 °C com as linhagens UFMG-CM-6114 e UFMG-CM-Y6189 de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	45
FIGURA 8 – Estados metabólicos de leveduras oleaginosas dependendo da espécie, linhagem e condições de cultivo.....	51
FIGURA 9 – Porcentagens dos principais ácidos graxos presentes nos óleos da linhagem UFMG-CM-Y6189 cultivada em glicerol bruto, <i>Y. lipolytica</i> QU21 (=UFMG-CM-Y327) <sup>a</sup> , das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> <sup>b</sup> e <i>Scenedesmus</i> sp. <sup>c</sup> , e dos óleos vegetais: soja <sup>d</sup> , milho e canola <sup>e</sup> .....	62
FIGURA 10 – Porcentagens dos ácidos saturados, monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) presentes nos óleos da linhagem UFMG-CM-Y6189 cultivada em glicerol bruto, <i>Y. lipolytica</i> QU21 (=UFMG-CM-Y327) <sup>a</sup> , das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> <sup>b</sup> e <i>Scenedesmus</i> sp. <sup>c</sup> , e dos óleos vegetais: soja <sup>d</sup> , milho e canola <sup>e</sup> .....	63

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – Especificações nacionais para o biodiesel no Brasil (Resolução Nº 5 da ANP de 25/08/2014 – DOU 26/08/2014).....	7
TABELA 2 – Média dos valores de biomassa, rendimento lipídico, conteúdo lipídico, consumo de glicerol e ( $Y_{L/S}$ ) rendimento lipídico por substrato no cultivo a 15 °C para as linhagens de <i>Yarrowia lipolytica</i> . ....	36
TABELA 3 – Média dos valores de biomassa, rendimento lipídico, conteúdo lipídico, consumo de glicerol e ( $Y_{L/S}$ ) rendimento lipídico por substrato no cultivo a 25 °C para as linhagens de <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	39
TABELA 4 – Perfil lipídico (%) dos ácidos graxos produzidos pelas cinco linhagens de <i>Yarrowia lipolytica</i> nas temperaturas de 15 e 25 °C, com 12 dias de cultivo, a partir de glicerol puro.....	42
TABELA 5 – Consumo de glicerol bruto e rendimento de óleo por substrato consumido ( $Y_{L/S}$ ) pelas linhagens de <i>Y. lipolytica</i> UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y6189.....	46
TABELA 6 – Perfil lipídico (%) dos ácidos graxos produzidos pelas linhagens de <i>Yarrowia lipolytica</i> UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y6189, em cada dia de análise.....	48
TABELA 7 – Comparação dos resultados apresentados por diferentes artigos, em ensaios com linhagens de <i>Y. lipolytica</i> selvagens em Erlenmeyers, com temperaturas entre 25-28 °C.....	57

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ACL	ATP citrato liase
AGS	Ácido graxo sintase
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amônia
AMP	Adenosina-monofosfato
ANP	Agência Nacional do Petróleo
BF <sub>3</sub>	Trifluoreto de boro
C	Carbono
CH <sub>4</sub>	Metano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO	Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbônico
DHA	Ácido docosahexaenóico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FAAE	Éster alquílico de ácido graxo
FAME	Éster metílico de ácido graxo
G	Gravidade
GLA	Ácido-gama linolênico
GRAS	Generally Recognized as Safe (Geralmente reconhecida como segura)
HCl	Ácido clorídrico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio Monobásico
KOH	Hidróxido de potássio
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de Magnésio
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
N	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio
NADPH	Nicotinamida-Adenina –Dinucleotídeo-Fosfato
(NH <sub>4</sub> ) <sup>2</sup> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel



PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
RPM	Rotações por minuto
SCO	Single Cell Oils (óleos de célula única)
TAG	Triacilglicerol
$Y_{L/S}$	Rendimento de lipídeo por substrato
YM	Yeast extract media (meio de extrato de levedura)
YPD	Yeast extract, Peptone, Dextrose (extrato de levedura, peptone e dextrose)

## RESUMO

Micro-organismos oleaginosos são capazes de produzir no mínimo 20% do peso seco da biomassa em forma de lipídeos, que muitas vezes possuem composição de ácidos graxos similar à das plantas mais usadas na produção do biodiesel. Leveduras oleaginosas são capazes de produzir óleo, a partir de substratos hidrofóbicos, glicose ou glicerol, que é um resíduo gerado pela indústria de biodiesel e desvalorizado no mercado. A espécie *Yarrowia lipolytica* é capaz de degradar o glicerol, sendo considerada um modelo para o estudo do acúmulo lipídico. Além disto, esta levedura possui o metabolismo e genoma mais conhecidos do que de outras espécies. Diferentes linhagens de leveduras e mudanças nas condições de cultivo podem gerar quantidades variadas de lipídeos, com diferentes perfis de ácidos graxos. Desse modo, neste trabalho foram testadas cinco linhagens de *Y. lipolytica* quanto a produção de óleo microbiano, a partir de glicerol puro, nas temperaturas de 15 e 25°C. Nenhum isolado foi considerado oleaginoso a 15 °C, enquanto que a 25 °C, os isolados UFMG-CM-Y6114 (isolado de queijo), UFMG-CM-Y4187 (de areia de praia do Paraná) e UFMG-CM-Y6189 (isolada na Antártica) produziram mais de 20% de conteúdo lipídico (29,30%, 26,95% e 34,38%, respectivamente). As linhagens UFMG-CM-Y6114 e Y4187 não apresentaram diferenças significativas em relação ao conteúdo lipídico. As linhagens de queijo e da Antártica foram testadas quanto a capacidade de acumular óleo a partir do crescimento em glicerol bruto. A linhagem UFMG-CM-Y6189 apresentou os melhores resultados, sendo capaz de produzir 9,40 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, 1,90 g.L<sup>-1</sup> de rendimento e 21,56% de conteúdo lipídico, a partir do consumo de 61,3 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Os ácidos graxos presentes nos lipídeos foram predominantemente monoinsaturados (59,5%), sendo que o ácido oleico foi o principal (49,4%). Essas duas características juntamente com o baixo conteúdo de poli-insaturados (5,2%), são desejáveis na produção de biodieseis de qualidade. Portanto os lipídeos do isolado *Y. lipolytica* UFMG-CM-Y6189 são potenciais matérias-primas na produção de biodiesel a partir de glicerol.

**Palavras-chave:** Óleo microbiano, leveduras oleaginosas, *Yarrowia lipolytica*, glicerol, biodiesel.

## ABSTRACT

Oleaginous microorganisms are capable of producing at least 20% of its dry weight in the form of lipids, which many times have fatty acid compositions similar to the plants used in the production of 1<sup>st</sup> generation biodiesel. Oleaginous yeasts are capable of producing oil from hydrofobic substrates, glucose or glycerol, which is a residue from the biodiesel industry and not valorized in the market. *Yarrowia lipolytica* is able to degrade glycerol and it is considered a model species for lipid accumulation. Besides that, its metabolism and genome are better known than other species. Different yeast strains and cultivation conditions can result in different lipid ammounts and fatty acid profiles. Thus, in this work five *Y. lipolytica* strains were tested for microbial oil production, from pure glycerol, at 15 e 25°C. Any isolate was considered oleaginous at 15 °C, while at 25 °C the srains UFMG-CM-Y6114 (isolated from cheese), UFMG-CM-Y4187 (from Paraná sand beach) e UFMG-CM-Y6189 (isolated from Antactica) produced more than 20% of lipid content (29,30%, 26,95% and 34,38%, respectively). Strains UFMG-CM-Y6114 and UFMG-CM-Y4187 showed no significant diference in relation to lipid content. Cheese and Antarctica isolates were tested about their oil accumulation capacity from raw glycerol. UFMG-CM-Y6189 presented the best results, being capable of producing 9,40 g.L<sup>-1</sup> of biomass, 1,90 g.L<sup>-1</sup> of lipid yield and 21,56% of lipid content, from the consume of 61,3 g.L<sup>-1</sup> of glycerol. The fatty acid present in the lipids were mostly monounsaturated (59,5%), and oleic acid was predominant (49,4%). These two features together with the low polyunsaturated content (5,2%) are desirable in the production of quality biodiesel. Therefore, lipids from the isolate *Y. lipolytica* UFMG-CM-Y6189 are potential feedstock for the biodiesel production from glycerol.

**Key-words:** Microbial oil, oleaginous yeasts, *Yarrowia lipolytica*, glycerol, biodiesel.

## 1. INTRODUÇÃO

A demanda energética cresce cada vez mais devido ao progresso tecnológico e ao crescimento populacional mundial. Com isso tem-se também o aumento da emissão dos gases que provocam o efeito estufa ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}$ ), da poluição e o consequente aumento dos preços dos combustíveis vindos de fontes não renováveis. A poluição ambiental causada por combustíveis fósseis, os preços elevados, a incerteza quanto à durabilidade das reservas energéticas presentes na Terra e a criação de regulamentos governamentais mais rigorosos sobre emissões de gases, incentivam pesquisas por novas fontes de energia, principalmente as renováveis. Sendo assim, fontes de energia mais sustentáveis como metano, biodiesel, bioetanol e biohidrogênio têm sido mais exploradas nos últimos anos (ATABANI *et al.*, 2012).

O desenvolvimento econômico de um país é sempre acompanhado do crescimento da área de transportes, principalmente dos veículos movidos a diesel, devido à necessidade do transporte dos produtos da indústria e da agricultura. Este setor consome 30% de toda a energia produzida no mundo e só perde para o setor industrial; desses 30%, 80% são gastos no transporte rodoviário (ATABANI *et al.*, 2012). Levando em conta toda a energia usada no transporte rodoviário em 2016, 4% foi energia renovável (REN21, 2017). Para que um desenvolvimento econômico e industrial sustentável seja alcançado, é preciso que a dependência quanto aos combustíveis fósseis seja reduzida. É preciso encontrar fontes de energia renováveis, sustentáveis, economicamente competitivas, facilmente disponíveis e que causem menos impactos ambientais e ao sistema climático que as atualmente utilizadas. O biodiesel é uma alternativa cada vez mais utilizada e pesquisada por atender a esses requisitos; entretanto, o biodiesel de 1ª geração, que é o mais usado atualmente, utiliza óleos de plantas comestíveis como matéria-prima, o que levanta questões éticas e morais. O biodiesel de 2ª geração utiliza como matéria-prima óleos de plantas não comestíveis e resíduos como o óleo de cozinha; entretanto estas matérias-primas podem não ser suficientes para suprir a crescente demanda energética. Uma solução que vem sendo estudada é o biodiesel produzido a partir de óleo microbiano, considerado de 3ª geração; leveduras oleaginosas são capazes de metabolizar

diversas fontes de carbono, incluindo substratos hidrofóbicos e resíduos, como o glicerol, que é gerado na própria indústria de biodiesel (SITEPU *et al.*, 2014). Muitas espécies produzem óleos com composição de ácidos graxos similares aos óleos de plantas usadas na produção do biodiesel de 1ª geração, portanto os lipídeos de leveduras também podem ser transformados em biodiesel de 3ª geração. Assim, a busca por novas linhagens de leveduras que sejam acumuladoras de lipídeos é de extrema importância para a potencial aplicação destas na produção de biodiesel, tornando todo o processo biotecnológico economicamente viável.

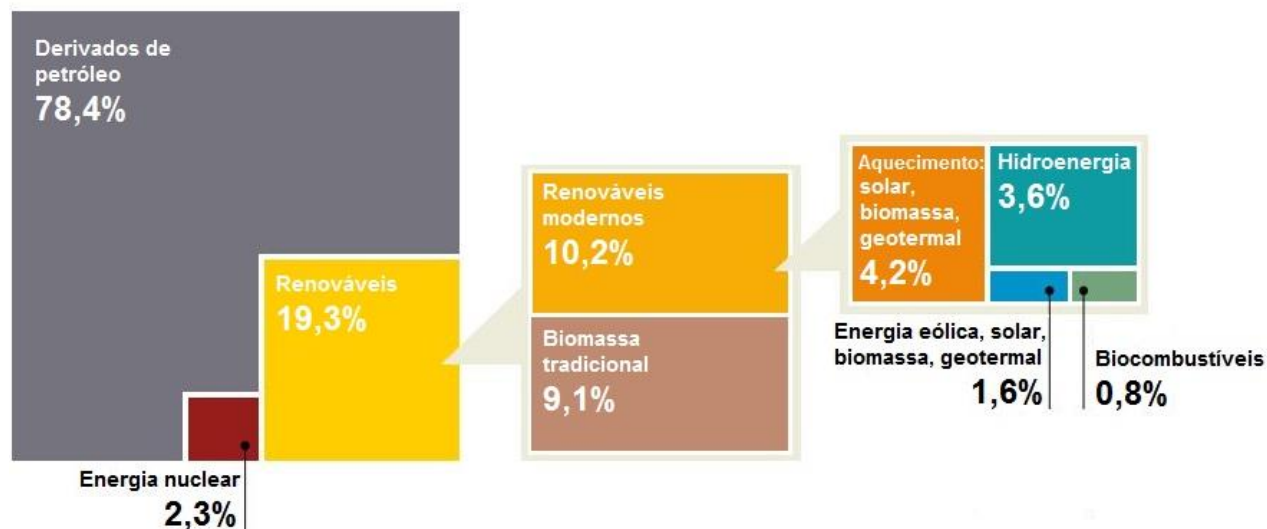
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Energia renovável

Com o aumento da população e do desenvolvimento econômico e tecnológico mundial, há o aumento da demanda energética; como as reservas fósseis de petróleo são finitas e disponíveis em poucos locais do mundo, há uma necessidade de se encontrar fontes de energia limpas e renováveis, que diminuam a dependência quanto aos combustíveis fósseis. Energia limpa e renovável é um dos pré-requisitos para o desenvolvimento humano e pode contribuir com a geração de renda e oportunidades de emprego, aumento da qualidade da saúde e diminuição dos níveis de pobreza (SEN; GANGULY, 2015). A energia renovável vem se estabelecendo como uma das principais fontes energéticas; o seu rápido crescimento é devido a diversos fatores, como a melhora na competitividade dos custos em relação às fontes não renováveis; iniciativas políticas que influenciam os investimentos; aumento das preocupações ambientais e com segurança; crescimento da demanda energética em países em desenvolvimento; criação de políticas mais rigorosas quanto às emissões de gases causadores do efeito estufa, dentre outros motivos (SAWIN; SEYBOTH; SVERRISSON, 2016).

Em 2016 o consumo mundial de petróleo representou 33,3% de toda energia consumida (BRITISH PETROLEUM, 2017). A combustão desses combustíveis fósseis é responsável por mais de 50% das emissões de gases causadores do efeito estufa (SEN; GANGULY, 2015). Embora o uso de combustíveis de origem fóssil ainda seja predominante, a energia renovável vem ganhando espaço a cada ano. Entre 2015 e 2016 houve um aumento de 14,4% no consumo mundial de energias renováveis (BRITISH PETROLEUM, 2017). A bioenergia é utilizada principalmente em três setores: calor (aquecimento ou resfriamento), eletricidade e transportes. Em 2015 19,3% da energia consumida no mundo foi renovável, sendo que 10,2% do total consumido foi de fontes renováveis modernas (provenientes da combustão de biomassa gasosa, líquida ou sólida, em sistemas de conversão altamente eficientes). Desses 10,2%, 4,2% foi usado no aquecimento por biomassa, solar e geotermal, 3,6%

de hidroenergia, 1,6% referentes à energia eólica, solar, biomassa e geotermal e 0,8% referentes a biocombustíveis (Fig. 1). Diferente das fontes renováveis modernas, a biomassa tradicional se refere ao uso de carvão, madeira, resíduos agrofloretais e esterco para a geração de energia, comumente usada em áreas rurais e países em desenvolvimento (REN21, 2017).



**Figura 1.** Fontes de energia consumidas em 2015.

Fonte: Adaptado de REN21, 2017.

A produção de biocombustíveis cresceu 2,6% mundialmente e diminuiu 4,3% no Brasil entre os anos de 2015 e 2016, sendo que o país foi responsável por produzir 22,5% de todo biocombustível produzido no mundo em 2016 perdendo apenas para os Estados Unidos, que produziu 43,5% do total (BRITISH PETROLEUM, 2017). O principal biocombustível produzido pelo Brasil é o bioetanol, proveniente da cana-de-açúcar; só no ano de 2017 foram produzidos quase 180 milhões de barris no país. A produção de biodiesel é menor, mas o país é o segundo maior produtor mundial, sendo que o maior produtor são os Estados Unidos (ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2017). Estima-se que por volta de 2050 o bioetanol e o biodiesel vão dominar o mercado global de combustíveis de carros e veículos pesados (DARVISHI *et al.*, 2017).

## 2.2. Biodiesel

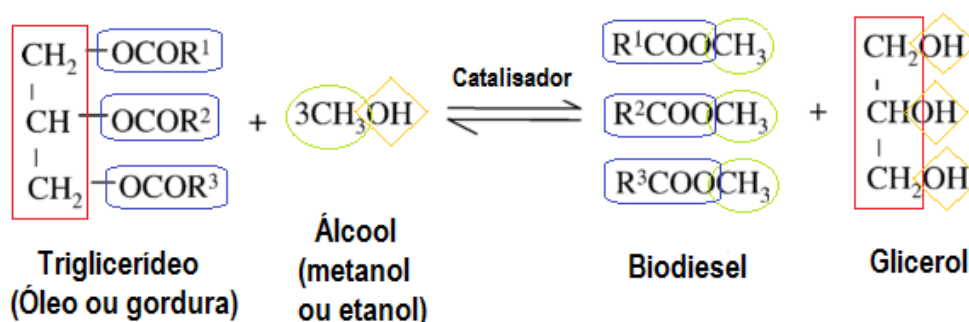
Segundo a ANP, o biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira por meio do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), criado em 2004, com o objetivo de implementar a sua produção e uso de forma sustentável e diminuir a dependência de importação do diesel derivado de petróleo. Com isso, no ano de 2008, a mistura de 2% de biodiesel puro (B100) ao óleo diesel passou a ser obrigatória, e a partir de novembro de 2014 a mistura passou a ser de 7% em volume. Com o aumento gradual dessa porcentagem que é determinada por leis federais, até março de 2019 o teor de biodiesel adicionado ao óleo diesel passará a ser de 10%. Com isto, a produção no país tem crescido a cada ano; em 2010 foram produzidos pouco mais de 15 milhões de barris, já em 2017, a produção foi de quase 27 milhões de barris, sendo que a principal matéria-prima do biodiesel no Brasil é o óleo de soja, seguido da gordura animal e de outras fontes como o óleo de palma, amendoim, girassol, mamona, gergelim, canola e algodão. O óleo de soja também é a principal matéria-prima do biodiesel no mundo (ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2017).

Biodiesel é definido por um éster monoalquílico de ácidos graxos derivados de lipídeos provenientes de óleos vegetais ou gorduras animais, que é uma alternativa ao diesel produzido a partir de petróleo (KNOTHE, 2005). O primeiro uso de óleos vegetais como combustíveis foi feito por Sir Rudolf Diesel, em Paris, no ano de 1898, a partir de óleo de amendoim (MEHER; VIDYA SAGAR; NAIK, 2006). A partir de então, uso do biodiesel como uma fonte de energia renovável vem sendo cada vez mais pesquisado, pois este é altamente degradável, não tóxico, renovável e sustentável. Além de possuir propriedades similares ao diesel derivado do petróleo, o biodiesel é compatível com os motores atuais e emite menos gases causadores do efeito estufa (SITEPU *et al.*, 2014).

Quimicamente, os óleos e gorduras são formados por moléculas de triglicerídeos, também chamados triacilgliceróis (TAG), que consiste de três longas cadeias de ácidos graxos que fazem ligações do tipo éster com uma molécula de glicerol. Como esses óleos vegetais possuem também fosfolipídeos, ácidos graxos livres, esteróis, água e outras impurezas, são necessárias modificações químicas para



torná-los biodieseis (MEHER; VIDYA SAGAR; NAIK, 2006). O mais importante dos processos de conversão dos óleos em biodiesel é a reação de transesterificação (transformação de um éster em outro éster), em que um óleo ou gordura é misturado a um álcool monohidratado de cadeia curta, que pode ser etanol ou metanol, na presença de um catalisador (uma base ou um ácido), gerando um éster alquílico de ácido graxo (FAAE) ou um éster metílico de ácido graxo (FAME). Além do biodiesel, é gerado glicerol, que decanta para o fundo do reservatório (KNOTHE, 2005). A reação de transesterificação é mostrada na figura 2.



**Figura 2.** Reação de transesterificação de triglicerídeos.

Fonte: Adaptado de Meher; Vidya Sagar; Naik (2006).

Os triglicerídeos compõem mais de 95% dos óleos e gorduras e são eles os responsáveis pelas características desses lipídeos e consequentemente pela composição e qualidade do biodiesel produzido (SILVEIRA, 2011). A estrutura e algumas características dos ácidos graxos, como tamanho, grau de saturação, ramificação da cadeia carbônica e posição das insaturações determinam propriedades do biodiesel como calor de combustão, estabilidade oxidativa, número de cetano, viscosidade e temperatura de fusão (KNOTHE, 2005). Existem padrões de qualidade de combustível, determinados em diferentes países, como por exemplo, Estados Unidos, Alemanha, Itália e França; que asseguram a qualidade e garantem a performance dos combustíveis (MEHER; VIDYA SAGAR; NAIK, 2006). A tabela 1 apresenta algumas das especificações nacionais para o biodiesel no Brasil. Em geral, os FAAEs ou FAMEs podem ser produzidos a partir de qualquer matéria-prima oleaginosa, mas nem toda matéria-prima pode ser utilizada para a obtenção de um

produto que atenda às especificações internacionais do biodiesel (RAMOS *et al.*, 2017). Portanto é importante caracterizar os ácidos graxos presentes nos lipídeos e analisar se estes possuem potencial de serem convertidos em biodieseis que atendam aos padrões de qualidade exigidos.

**Tabela 1.** Especificações nacionais para o biodiesel no Brasil (Resolução Nº 5 da ANP de 25/08/2014 – DOU 26/08/2014). Fonte: ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2014).

<b>Propriedades</b>	<b>Limites</b>	<b>Unidade</b>
Ponto de fulgor	100 mín.	°C
Viscosidade a 40 °C	3,0 a 6,0	mm <sup>2</sup> /s
Cinzas sulfatadas	0,02 máx.	%, m/m
Enxofre total	10 máx.	mg/kg
Teor de éster	96,5 mín.	%, m/m
Glicerol total	0,25 máx.	%, m/m
Fósforo	10 máx.	mg/kg
Metanol e/ou etanol	0,20 máx.	%, m/m
Estabilidade oxidativa a 110 °C	8 mín.	Horas
Teor de água	200 máx.	mg/kg
Ponto de entupimento de filtro a frio	19	°C

m: massa

O calor de combustão indica o quão adequado é um ácido graxo para ser usado como combustível; quanto maior a sua cadeia carbônica, maior o calor de combustão e melhor e mais energético é o combustível. Já a estabilidade oxidativa se refere à tendência do combustível a ser oxidado, principalmente quando está armazenado; isso depende de diversos fatores, como presença de ar, calor, luz, metal, antioxidantes e grau de saturação da cadeia do ácido graxo; os biocombustíveis de cadeias insaturadas tendem a oxidar mais rapidamente do que os de cadeias saturadas. O número de cetano indica a qualidade de combustão e este é inversamente proporcional ao período de tempo entre a injeção de combustível e o início da combustão; portanto, quanto maior o número de cetano, melhor a qualidade do diesel, e isto está geralmente

relacionado a ácidos graxos de cadeias mais longas e saturadas. A viscosidade é outra propriedade importante dos combustíveis, esta é diretamente proporcional à tendência do diesel causar problemas como a formação de depósitos no motor. Os combustíveis menos viscosos, ou mais fluidos, são os que apresentam cadeias mais curtas e insaturadas. Já quanto ao ponto de fusão, quanto menor, mais insaturada e ramificada a cadeia, mais baixo será o ponto de fusão e melhor o combustível (KNOTHE, 2005). Algumas propriedades dos biodieseis, como número de cetano, estabilidade oxidativa, densidade e viscosidade variam de acordo com as condições climáticas da região (PATEL *et al.*, 2017).

Levando em conta todas essas informações, conclui-se que não existe um ácido-graxo que satisfaça todos os parâmetros de qualidade, já que alguns contrariam o padrão ótimo dos outros (LEIVA-CANDIA *et al.*, 2014); entretanto, óleos com maior composição de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), como o ácido oleico são os mais indicados, já que este ácido graxo atende à maioria dos critérios citados acima. A presença de altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) é indesejada na produção do biodiesel, pois estes apresentam baixo número de cetano e baixa estabilidade oxidativa (SITEPU *et al.*, 2014). Os óleos das plantas comestíveis mais usados mundialmente na produção do biodiesel são os óleos de soja, canola, girassol, palma, milho e outros vegetais (ATABANI *et al.*, 2012).

### **2.3. Biocombustíveis de 1ª, 2ª e 3ª gerações**

A produção de biodiesel e bioetanol vem crescendo e se tornando uma fonte alternativa para o uso do diesel e da gasolina. Os chamados biocombustíveis de 1ª geração são produzidos a partir de cana-de-açúcar, milho, óleos vegetais e gordura animal, o que levanta o problema do uso de alimentos e de áreas de plantio para a produção de combustível (AJANOVIC, 2011). Além disto, sua produção apresenta um impacto negativo no preço desses alimentos. Mais de 95% dos biocombustíveis produzidos mundialmente são derivados de óleos de plantas comestíveis

(BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011); portanto a utilização de outros tipos de óleo tornaria os biocombustíveis ainda mais sustentáveis e aceitáveis socialmente.

O bioetanol e o biodiesel de 2ª geração são produzidos a partir de fontes orgânicas não comestíveis como biomassa e resíduos lignocelulósicos vindos da agroindústria no caso do bioetanol; no caso do biodiesel podem ser usados óleos de plantas não comestíveis como óleo de jatropha (*Jatropha curcas*) e karanja (*Pongamia pinnata*), além de resíduos de óleo de cozinha e gordura animal. A utilização de materiais não comestíveis para a produção de biodiesel e bioetanol de 2ª geração apresenta diversas vantagens em relação ao uso de fontes comestíveis; como por exemplo: a possibilidade de plantas não comestíveis serem cultivadas em terras não apropriadas para a agricultura; a redução das taxas de desmatamento para o plantio; e no caso do uso dos resíduos existe a redução da sua disposição incorreta no ambiente, além da diminuição dos custos de produção (ATABANI *et al.*, 2012). Entretanto, a matéria-prima utilizada na produção de biodiesel de 2ª geração pode não ser suficiente para atender a crescente demanda global por combustíveis renováveis; além do que, a reação de transesterificação é dificultada em alguns tipos de gordura animal devido à presença das altas taxas de ácidos graxos saturados e no caso da utilização de óleos residuais de cozinha, seria preciso a criação de uma logística de coleta desse material. Já para a utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de bioetanol, é necessário um pré-tratamento que libere os açúcares, e este é oneroso, consome energia e também libera inibidores no meio, que podem inviabilizar os micro-organismos fermentadores (LEIVA-CANDIA *et al.*, 2014).

Há também os biocombustíveis de 3ª geração, que no caso do biodiesel são provenientes de micro-organismos acumuladores de óleos, como microalgas, bactérias, leveduras e outros fungos. Esses são chamados óleos de célula única (SCO – single cell oils) e são produzidos por micro-organismos oleaginosos por meio da conversão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), açúcares, ácidos orgânicos, substratos hidrofóbicos e outros em SCO, que são posteriormente armazenados dentro das células (SITEPU *et al.*, 2014). Micro-organismos oleaginosos são grandes atrativos devido à alta taxa de crescimento e à capacidade de utilização de diversas fontes de carbono como substrato para crescimento (ENSHAEIEH; ABDOLJ; NAHVI, 2013). Os óleos

microbianos trazem vantagens quando comparados aos óleos de plantas: requerem menos mão-de-obra; os micro-organismos possuem ciclo de vida mais curto do que as plantas; é possível a utilização de terras impróprias para a agricultura no cultivo das células; a produção acontece durante o ano inteiro, independente do clima ou estação do ano; são mais fáceis de serem produzidos em grande escala (LI; DU; LIU, 2008); em algumas espécies de micro-organismos o conteúdo lipídico pode alcançar 80% da biomassa, por exemplo a bactéria selvagem *Rhodococcus opacus* PD630, no estudo de Gouda; Omar e Aouad (2008). Entretanto, a produção dos biodieseis de 3ª geração ainda não é capaz de competir com os de 1ª e 2ª gerações; para tanto, é necessário se buscar novas espécies e linhagens de micro-organismos que sejam capazes de produzir altas concentrações de óleo através da conversão de substratos de baixo custo e assim tornar a produção economicamente viável, além de se desenvolver uma metodologia de extração lipídica que seja eficaz e utilize baixos volumes de solvente.

As pesquisas acerca do cultivo de algas para a produção de biodiesel vêm crescendo a cada ano. Algumas linhagens de algas com alta produtividade acumulam até 70% do seu peso seco em lipídeo, a *Chlorella protothecoides* UTEX 256 por exemplo, acumula 62% de conteúdo lipídico (CHEN; WALKER, 2011) e a *Schizochytrium limacinum* SR21 acumula 71% (CHRISTOPHE *et al.*, 2012), ambas a partir de glicerol bruto. Mas apesar de esta ser uma matéria-prima promissora devido às suas altas taxas de crescimento e produtividade e alto conteúdo oleoso, há desvantagens quanto à sua utilização (ATABANI *et al.*, 2012). As microalgas necessitam de extensas áreas para o crescimento fotossintético; a produção está sujeita às variações climáticas e à contaminação por bactérias e protozoários; e requerem grandes volumes de água para o cultivo e processamento (SITEPU *et al.*, 2014). Além disso, os óleos de muitas espécies de microalgas produzem óleos com baixas taxas de MUFA, e altas taxas de PUFA, que são indesejáveis na produção de biodiesel (STANSELL; GRAY; SYM, 2012). Já as bactérias são mais fáceis de serem cultivadas e possuem maior taxa de crescimento; entretanto, estes micro-organismos acumulam menos óleo do que as microalgas. A espécie *Acinetobacter calcoaceticus*, por exemplo, acumula de 27 a 38% do seu peso seco em forma de lipídeo, já a *Rhodococcus opacus* acumula entre 24 e 26%. Além disso, há poucas espécies de

bactérias oleaginosas conhecidas e a extração dos lipídeos é complicada, pois estes se encontram na membrana externa da parede celular bacteriana (THEVENIEAU; NICAUD, 2013).

Outros micro-organismos produtores de óleo microbiano que vêm sendo pesquisados para a síntese de biodiesel de 3ª geração são as leveduras oleaginosas. Estes fungos unicelulares já vêm sendo explorados por décadas para a produção de alimentos, suplementos alimentares e produtos químicos. Os benefícios da utilização de leveduras na produção de óleo são os seguintes: podem ser cultivadas em biorreatores com condições controladas; têm crescimento rápido e podem acumular até 80% do seu peso seco em forma de lipídeo; podem ser geneticamente modificadas para produzirem maiores quantidades de óleo; como são seres heterotróficos, são capazes de assimilar diversos tipos de fontes de carbono, inclusive resíduos da indústria e agricultura; são menos susceptíveis à infecções virais e o cultivo e manipulação são seguros para a saúde humana, já que há poucas espécies patogênicas (SITEPU *et al.*, 2014). Com a rápida expansão do biodiesel, o óleo produzido por levedura é uma matéria-prima potencial para a produção de biocombustíveis, entretanto, mais pesquisas são necessárias a fim de se potencializar a produção dos lipídeos vindos desses fungos.

Como não há na literatura muitas informações sobre as propriedades dos combustíveis feitos a partir de óleo de levedura, Pinzi e colaboradores (2011) tentaram determinar como seriam essas propriedades. Para isto, foram utilizadas informações sobre o comprimento da cadeia e grau de insaturação dos ácidos graxos dos lipídeos obtidos de diversas linhagens e espécies de leveduras. Estes dados foram usados na realização de modelos estatísticos com o objetivo de se determinar as seguintes propriedades do biodiesel: viscosidade, número cetano, poder calorífico e a temperatura do ponto de entupimento de filtro a frio. Essas características, quando comparadas aos combustíveis de óleo de palma e de canola mostraram que, com exceção da viscosidade, todas as propriedades do biodiesel de óleo de levedura se encaixam nos padrões de qualidade Europeu EN 14214 e em alguns casos podem ser melhores do que os biodieseis tradicionais. Quanto à viscosidade, a maioria dos biodieseis de levedura tiveram valores superiores ao exigido no padrão de qualidade,

então, até o momento esses combustíveis só poderiam ser utilizados misturados com outros diesel de origem fóssil. Portanto, a utilização de SCO provenientes de leveduras resultaria em um biodiesel de qualidade, que se encaixa nos padrões exigidos e com várias vantagens em relação aos biodieseis de 1ª e 2ª gerações (PINZI *et al.*, 2011).

#### **2.4. Glicerol como substrato para a produção de biodiesel**

Atualmente, o custo de produção do biodiesel é 30% mais alto do que dos diesel a base de petróleo (DARVISHI *et al.*, 2017). A origem da fonte de carbono que será o substrato usado pelo micro-organismo tem muita influência no custo final do biodiesel; em geral, 75% dos custos da produção do biodiesel são com a matéria-prima (ATABANI *et al.*, 2012). Portanto, para que os custos de produção sejam reduzidos é essencial encontrar novos tipos de matéria-prima que tenham baixo custo. Com esse objetivo, o uso de diversos tipos de resíduos como substrato vem sendo estudados, por exemplo: hidrolisados de palha e espiga de milho, bagaço de cana-de-açúcar, amido de mandioca, palha de arroz e de trigo, restos de óleo de cozinha, gordura animal e glicerol. No caso dos resíduos lignocelulósicos, há a necessidade de um pré-tratamento, que pode ser químico, físico ou biológico; a fim de separar os componentes da parede celular vegetal (celulos, hemicelulose e lignina) e aumentar o acesso das enzimas aos substratos bem como a quantidade de açúcares livres. Após o pré-tratamento deve ocorrer a hidrólise, que libera os monômeros de açúcar contidos nos polímeros de lignina, celulose e hemicelulose, para o consumo da levedura (SOUZA, 2013). Este pré-tratamento produz inibidores (ácido acético, ácido fórmico, furfural, dentre outros) no meio de cultura que são tóxicos para as células e podem reduzir a produtividade (LEIVA-CANDIA *et al.*, 2014).

Outro resíduo que pode ser fonte de carbono para as leveduras é o glicerol; também conhecido como glicerina ou propano-1,2,3-triol. Este é o principal subproduto da indústria de biodiesel que é formado durante o processo de transesterificação. A cada 1000 kg de biodiesel produzidos, são gerados 100 kg de glicerol bruto, ou seja,

10% (p/p) do biodiesel produzido (YANG; HANNA; SUN, 2012). Em 2015, a produção de biodiesel mundial foi de 30,1 bilhões de litros, portanto foram gerados cerca de 3,0 bilhões de litros de glicerol (SAWIN; SEYBOTH; SVERRISSON, 2016). Com o crescimento da produção de biodieseis, esse número tende a aumentar, juntamente com a preocupação acerca da sua correta disposição no ambiente. O que tende a diminuir é o preço do glicerol puro; antes da expansão da produção de biodiesel, 1kg de glicerol puro custava cerca de U\$0,35. Atualmente, a mesma quantidade custa cerca de U\$0,03 nos Estados Unidos (YANG; HANNA; SUN, 2012). Esse resíduo que também é formado na indústria de bebidas alcoólicas e de sabão possui múltiplos usos nas indústrias farmacêuticas, cosméticas, biotecnológicas e alimentícias (DOBROWOLSKI *et al.*, 2016), mas ainda não o suficiente para utilizar todo o glicerol produzido pela crescente indústria de biodiesel. A utilização efetiva desse resíduo iria aumentar a viabilidade do biodiesel, pois resolveria o problema da disposição correta do glicerol, aumentaria seu valor de mercado, além de reduzir os custos de produção de sabão e do biodiesel.

O glicerol residual da indústria de biodiesel possui concentração de 75 a 83% de glicerol, sendo o restante formado por outros componentes (LIU; JI; HUANG, 2015). A composição varia de acordo com o tipo de óleo usado como matéria-prima e com as condições e reagentes usados na reação de transesterificação (CHATZIFRAGKOU; PAPANIKOLAOU, 2012). Algumas utilizações desse glicerol residual exigem que ele passe por um processo de purificação, pois este contém metanol, sais, ácidos graxos livres, cinzas e outros tipos de matéria orgânica e impurezas; mas essa purificação é onerosa, consome energia e gera mais resíduos. Portanto, o uso desse glicerol bruto seria a melhor forma de valorizar esse resíduo e tornar a produção de biodiesel ainda mais sustentável (UÇKUN KIRAN; TRZCINSKI; WEBB, 2013). O glicerol é um composto orgânico que pertence à função álcool, de fórmula química  $C_3H_8O_3$ ; como é formado por moléculas de carbono, pode ser uma fonte de carbono para micro-organismos, que podem utilizá-lo no seu metabolismo e assim transformar esse resíduo em diversos produtos de maior valor agregado. Dentre estes produtos pode-se citar o 1,3 propanodiol (um precursor da síntese de poliésteres, solventes, da indústria química e farmacêutica, produzido por bactérias fermentativas anaeróbias), os



pigmentos alimentícios, etanol, poli-hidroxi-alcanoatos, ácido pirúvico, ácido cítrico (produzido por leveduras), biossurfactantes, enzimas microbianas, hidrogênio, manitol e eritritol (ANDRÉ *et al.*, 2009).

Além dos produtos citados acima, o glicerol também pode ser metabolizado por micro-organismos e transformado em lipídeos, ou SCO. Em leveduras, o metabolismo desse resíduo acontece da seguinte forma: o glicerol entra na célula por difusão ou por transporte ativo, então é fosforilado a glicerol-3-fosfato que é oxidado a dihidroxiacetona-3-fosfato (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008). Este então entra na via glicolítica e pode ser convertido a ácido cítrico, lipídeos de reserva ou outros produtos. O glicerol também pode ser introduzido à estrutura dos TAG que são armazenados nos corpos lipídicos (RAKICKA *et al.*, 2015). Esta fonte de carbono alternativa apresenta vantagens em relação aos açúcares convencionais, incluindo o baixo custo, maior disponibilidade, maior geração de NADPH e menor emissão de CO<sub>2</sub> durante o metabolismo microbiano (QIN *et al.*, 2017). O glicerol bruto gerado na produção de biodiesel também possui macronutrientes como cálcio, potássio, magnésio, enxofre e sódio, que podem suprir as carências nutricionais da levedura e assim reduzir os gastos com enriquecimento do meio de cultura (KITCHA; CHEIRSILP, 2011).

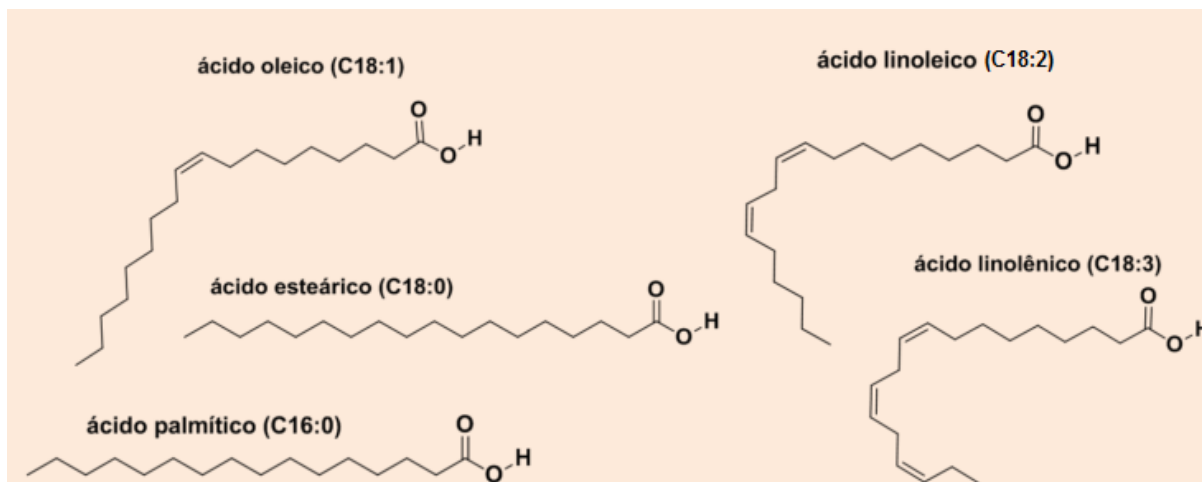
## 2.5. Leveduras oleaginosas

Existem mais de 2000 espécies de leveduras conhecidas, sendo um grupo taxonomicamente diverso e pertencente a dois dos sete filos do reino Fungi: Ascomycota e Basidiomycota (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Somente 3 a 10% das leveduras conhecidas são consideradas oleaginosas, ou seja, são capazes de acumular mais de 20% da sua biomassa seca em forma de lipídeos. Essas espécies oleaginosas até então conhecidas pertencem aos filos Ascomycota (por exemplo: *Metschnikowia pulcherrima*, *Lipomyces tetrasporus*, *Cyberlindnera jadinii*, *Candida tropicalis*, *Geotrichum fermentans*, *Myxozyma melibiosii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Kurtzmaniella cleridarum* e *Yarrowia lipolytica*) e Basidiomycota (por exemplo: *Rhodospordium toruloides*, *Leucosporidiella cratinivora*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R.*

*glutinis*, *Cryptococcus terricola*, *C. laurentii*, *Trichosporon oleaginosus*, *Pseudozyma aphidis* e *Moniliella spathulata*) (SITEPU *et al.*, 2014).

O fato de que as leveduras oleaginosas são encontradas em diferentes clados, sugere que a habilidade de armazenar lipídeos evoluiu diversas vezes independentemente ao longo da história evolutiva, portanto, os mecanismos pelos quais essas células acumulam lipídeos podem ser bastante diversos. Algumas destas espécies são encontradas em ambientes relativamente secos e pobres em nutrientes, como superfícies de folhas de plantas, areia e solos (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). A capacidade de acumular lipídeos pode ser uma vantagem adaptativa destes micro-organismos para sobreviver nestes ambientes.

As leveduras oleaginosas acumulam lipídeos principalmente na forma de TAG, que corresponde de 80 a 90% do conteúdo lipídico, e uma pequena porção de éster esterol. Os TAG e o éster esterol ficam armazenados dentro dos corpos lipídicos intracelulares, que são formados por uma monocamada fosfolipídica com diferentes proteínas embebidas (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011). Os ácidos graxos dos TAG são formados por cadeias saturadas ou insaturadas, com mais de 12 carbonos. Os ácidos graxos mais comumente encontrados nos lipídeos das leveduras oleaginosas são os ácidos oleico (C18:1), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), esteárico (C18:0), linolênico (C18:3) e palmitoleico (C16:1) (SITEPU *et al.*, 2014). Como estes também são os ácidos graxos mais obtidos dos óleos vegetais, os lipídeos produzidos pelas leveduras são potenciais substitutos para os óleos de plantas na produção de biocombustíveis. A figura 3 mostra a estrutura dos principais ácidos citados acima, com exceção do ácido palmitoleico.



**Figura 3.** Principais ácidos graxos presentes nos TAG (triacilgliceróis) dos lipídeos de leveduras.

Fonte: Adaptado de (RAMOS *et al.*, 2017).

Os ácidos graxos também podem ter diferentes finalidades industriais, não somente a produção de biodiesel. Óleos microbianos que contêm ácidos graxos essenciais são de interesse médico e nutricional, estes incluem: ácido gama-linolênico (GLA) (18:3), eicosapentaenóico (EPA) (C20:5), docosahexaenóico (DHA) (C22:6) e o ácido araquidônico (C20:2) (JIN *et al.*, 2015). Os ácidos linolênico, GLA e araquidônico, por exemplo, pertencem ao grupo dos ácidos graxos ômega 6 (que recebem esta nomenclatura pois a primeira instauração fica no carbono 6 da cadeia), já os ácidos alfa-linolênico (ALA) (C18:3), DHA e EPA pertencem ao grupo dos ácidos ômega 3. Ambos os grupos são essenciais na dieta humana para a garantia de uma vida saudável (LIU; JI; HUANG, 2015).

Diferentes linhagens da mesma espécie de levedura podem produzir quantidades e composições distintas de ácidos graxos, e isso pode variar para uma mesma linhagem (SITEPU *et al.*, 2013). A composição dos ácidos graxos pode determinar se a aplicação do óleo seria na indústria de biocombustíveis ou para fins nutritivos. Mudanças nas condições de cultivo, como concentração e fase de crescimento do inóculo inicial, concentração e tipo de fonte de carbono, aeração, temperatura de incubação, disponibilidade de nitrogênio e de íons, também alteram a concentração e a composição dos lipídeos produzidos (LI; DU; LIU, 2008). Poli e

colaboradores (2014) avaliaram o efeito de diferentes composições de meios e condições de cultura na biomassa e no conteúdo e perfil lipídico produzidos pela linhagem *Y. lipolytica* QU21 (=UFMG-CM-Y327). Foram testados meios com fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico e diferentes taxas de aeração (por mudanças no volume do frasco/volume de meio e na velocidade de agitação dos frascos). Ao utilizar a taxa C/N de 184 (meio com 10% de glicerol puro e 0,1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), foi obtido o melhor resultado, com a produção de  $1,48 \text{ g.L}^{-1}$  de lipídeo, que corresponde a 30% do peso seco da levedura.

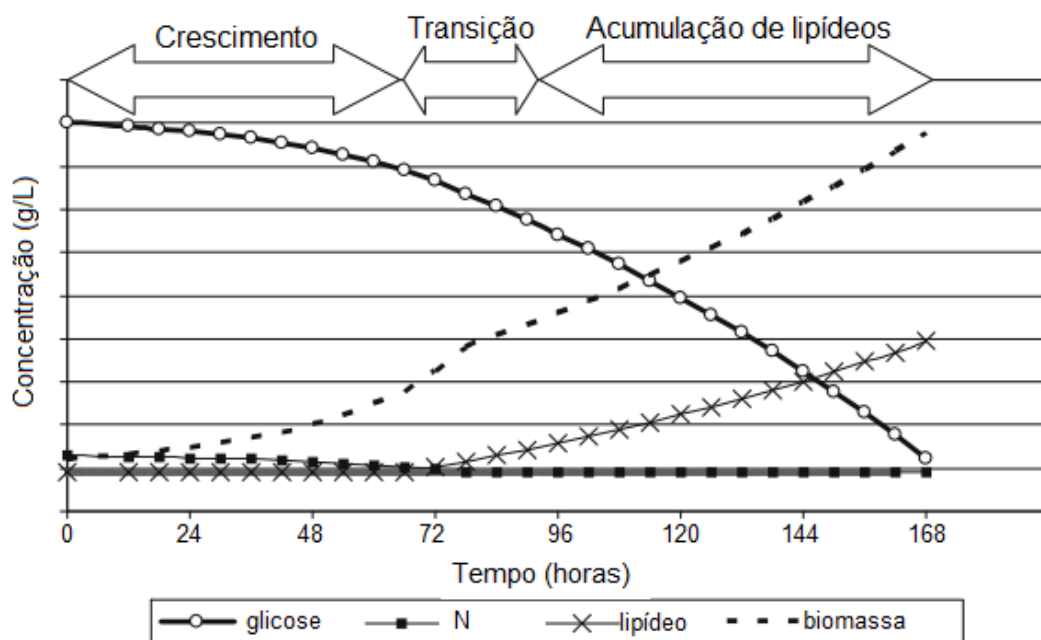
Apesar do gênero *Yarrowia* mostrar pouca ou nenhuma capacidade de degradar pentoses, como a xilose e arabinose presentes em resíduos lignocelulósicos e ainda ser intolerante ao furfural, Quarterman e colaboradores (2016) testaram 57 isolados pertencentes às 13 espécies relatadas do clado *Yarrowia* quanto a capacidade de produzir óleo a partir de hidrolisado de gramínea pré-tratado com ácido. Dos 45 isolados de *Y. lipolytica* testados, a linhagem NRRL YB-419 teve o melhor resultado, produzindo  $6,7 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo a partir de hidrolisado com concentração de 75%. Além disso, foram encontradas quatro espécies capazes de acumular mais de 20% do peso seco em lipídeos: *Candida galli* CBS 9723 (24.3%), *C. oslonensis* Y-48252 (20.3%), *C. phangngensis* PT1-17 (50.4%), e *Y. keelungensis* CBS 11062 (22.2%). Esta última também produziu xilitol, alcançando rendimento de  $19,0 \text{ g.L}^{-1}$ . O xilitol é um açúcar alcoólico de baixo valor calórico que pode ser usado por diabéticos e ajuda a prevenir a cárie dentária (MAKINEN, 1992). Os pesquisadores observaram que as leveduras foram capazes de consumir a xilose presente no hidrolisado após a depleção da glicose, entretanto o crescimento celular foi menor com o consumo da pentose e esta foi convertida a xilitol. O óleo produzido era composto de principalmente ácido oleico, o que é desejável na produção de biodiesel.

Uma linhagem ideal de levedura seria aquela capaz de produzir altas quantidades de óleo e de biomassa, utilizar os nutrientes presentes no substrato, ser tolerante a inibidores quando estes estiverem presentes e produzir os ácidos graxos desejados para o produto final. Esta levedura também teria que ter a capacidade de crescer rapidamente no substrato utilizado e ter células facilmente lisadas para a extração do óleo. Portanto, o primeiro passo para que o biodiesel produzido a partir de

lipídeos de leveduras possa competir com o já comercializado de óleo vegetal é encontrar determinada espécie e linhagem de levedura que tenha alta produtividade de óleo, alta produção de biomassa e que utilize resíduos como substrato de crescimento. A produção de lipídeo por esta levedura pode ser otimizada posteriormente, seja por modificações genéticas na levedura selvagem ou alterações nas condições de cultivo.

## **2.6. Síntese de ácidos graxos por leveduras**

Os lipídeos começam a ser acumulados dentro da levedura quando algum nutriente essencial para a proliferação celular, em geral o nitrogênio (N), se torna escasso no meio mas ainda há carbono (C) em excesso, que é assimilado pelas células e convertido em TAG. Enquanto há N no meio, ocorre a fase de crescimento das células e o fluxo de carbono assimilado é distribuído entre a síntese de carboidratos, lipídeos, ácidos nucléicos e proteínas. Como o N é necessário na produção dos ácidos nucléicos, proteínas e na multiplicação celular, a taxa de crescimento diminui rapidamente quando há a sua depleção, enquanto que o fluxo de carbono passa a ser focado na síntese de lipídeos e ocorre o acúmulo de TAG nos corpos lipídicos. A figura 4 ilustra cada uma destas fases.



**Figura 4.** Fases de crescimento, transição e acumulação de lipídeo.

O acúmulo de lipídeos ocorre quando há a depleção do nutriente limitante (no caso o nitrogênio), mas ainda existe uma grande concentração de carbono no meio.

Fonte: adaptado de Beopolos e colaboradores (2009).

Em micro-organismos não oleaginosos, a mesma situação acarretaria na mudança do fluxo de carbono do crescimento celular para a síntese de polissacarídeos como glicogênio, glucanas e mananas (BEOPOULOS *et al.*, 2009). Outros nutrientes essenciais poderiam ser limitados além do nitrogênio, como magnésio, zinco, ferro ou fósforo. No entanto, a limitação do N é a mais usada na produção de lipídeos, pelo fácil controle e maior eficiência na síntese de lipídeos. Isso acontece porque a falta desse nutriente induz uma cascata de reações que levam à acumulação de citrato e a formação de acetil-CoA, que é o principal precursor da síntese de ácidos graxos (RATLEDGE, 2004).

A taxa C/N tem influência direta na duração de cada uma das três fases de crescimento da levedura quando esta se encontra sob limitação de N. As fases são de crescimento exponencial; diminuição da proliferação e acumulação de lipídeos; e a fase estacionária, em que ainda ocorre a acumulação de lipídeos, mas a célula começa a usar o carbono presente nessas reservas (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN,

2011). A duração de cada fase irá influenciar na quantidade de lipídeo produzida, por isso é importante se determinar a taxa C/N que resultará em uma maior produtividade.

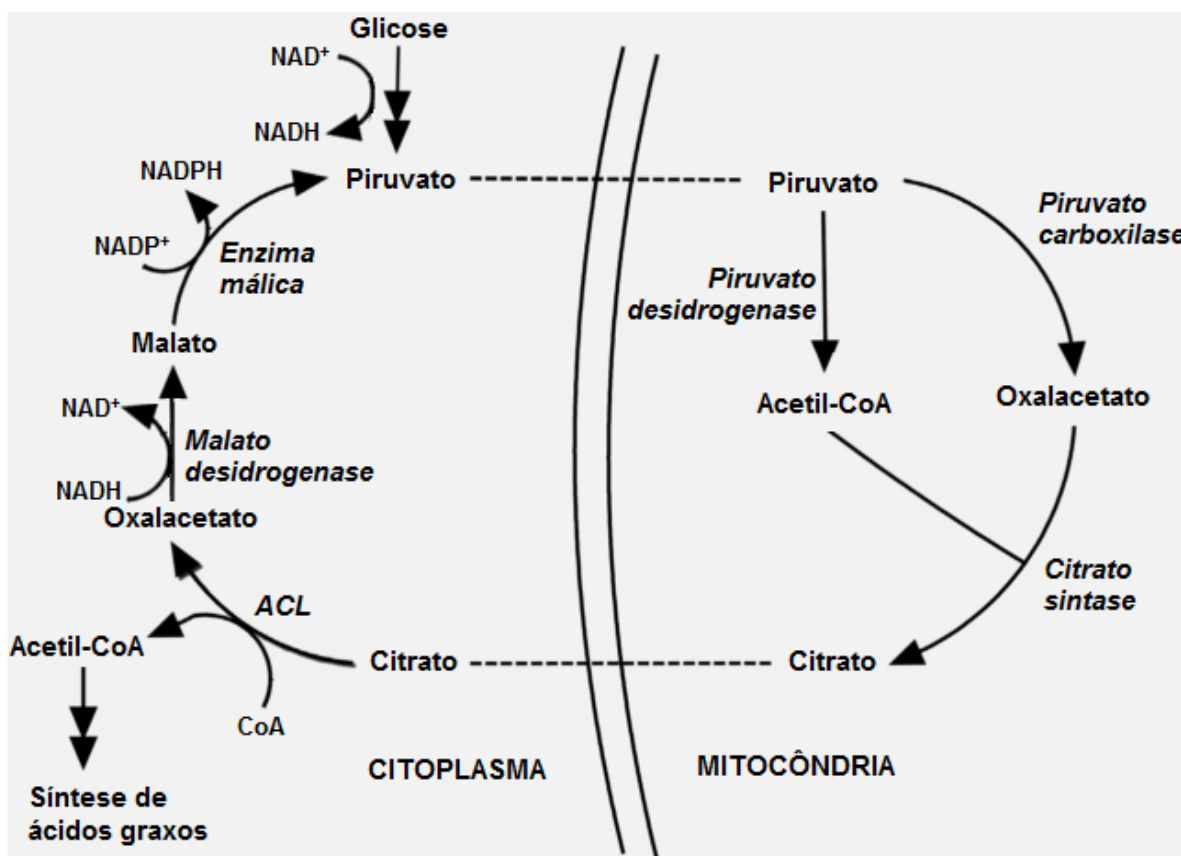
Ao variar a taxa de C/N do meio, diferentes metabolismos podem ser observados: somente crescimento com proliferação celular, produção de ácidos orgânicos, ou produção e acumulação de lipídeos. Uma taxa C/N muito elevada irá resultar na produção de metabólitos secundários, no caso o ácido cítrico, e não na produção de lipídeos (BEOPOULOS *et al.*, 2009). Estudos verificaram que as taxas de C/N iguais a 75, 100 e 150 resultaram em produção de biomassa e de lipídeos por uma linhagem selvagem de *Y. lipolytica* sem diferenças significativas, quando a fonte de carbono era glicerol puro. A taxa de C/N igual a 100 usando glicerol bruto foi a mais eficiente (DOBROWOLSKI *et al.*, 2016). Poli e colaboradores (2014) testaram cinco valores de C/N, 16, 36, 184, 276 e 368, obtendo o melhor resultado de produção lipídica com C/N igual a 184 com a linhagem de *Y. lipolytica* QU21 (=UFMG-CM-Y327) isolada de queijo.

Os lipídeos podem ser produzidos por duas vias de metabolismo nas leveduras: a via *de novo* e a via *ex novo*. Quando o substrato disponível é hidrofóbico, geralmente a via utilizada será a *ex novo* e esta é independente da exaustão de N do meio; quando o substrato é hidrofílico, como o glicerol, a via usada será a *de novo* (QIN *et al.*, 2017).

Na via de síntese *de novo* há a produção dos precursores dos ácidos graxos, como acetil-CoA e malonil-CoA e o posterior alongamento da cadeia carbônica. A glicose ou glicerol entram na célula e são convertidos a piruvato, que entra na matriz mitocondrial e é catalisado a acetil-CoA e oxalacetato pela enzima piruvato-desidrogenase. Este acetil-CoA pode entrar no ciclo de Krebs ou pode ser transportado para o citoplasma para participar da biossíntese de ácidos graxos. Mas como a membrana interna da mitocôndria é impermeável ao acetil-CoA, este se junta ao oxalacetato formando citrato, que é então exportado para fora da mitocôndria pelo transportador citrato-piruvato. Nas leveduras não oleaginosas, o acetil-CoA provém da glicólise de açúcares; já nas leveduras oleaginosas, o acetil-CoA também provém do excesso de citrato do ciclo de Krebs (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

Na via *de novo* a escassez de N provoca uma rápida redução na concentração de AMP (adenosina monofosfato) devido à uma enzima que degrada a AMP e libera

íons  $\text{NH}_4^+$  (amônia) que servem como uma fonte extra de N. A redução do AMP altera o ciclo de Krebs e o citrato se acumula dentro da mitocôndria. Ao chegar a um nível crítico, o citrato vai para o citoplasma, onde é clivado pela enzima ATP citrato liase (ACL), gerando oxalacetato e acetil-CoA; este acetil-CoA será usado então na síntese de ácidos graxos (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). A figura 5 ilustra a via de transporte de citrato da mitocôndria para o citoplasma.



**Figura 5.** Via de transporte de citrato da mitocôndria para o citoplasma.

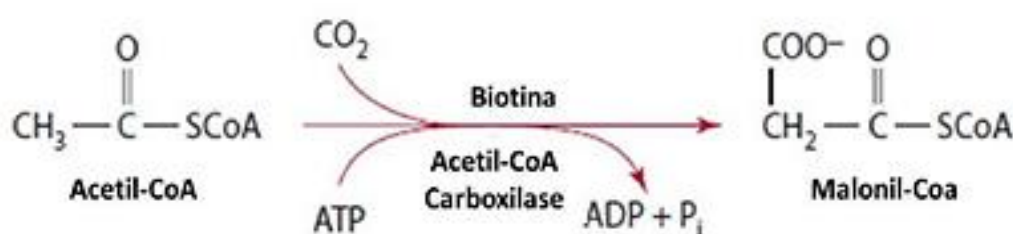
Após entrar na mitocôndria, o piruvato é convertido a acetil-CoA, que condensa com o oxalacetato para formar citrato. Quando o nível de citrato na mitocôndria é alto, ele entra no citoplasma, onde é clivado para formar acetil-CoA e oxalacetato. ACL: ATP citrato liase.

Fonte: adaptado de Liang e Jiang, 2013.

Após a geração de acetil-CoA no citoplasma ocorre a formação de malonil-CoA, um composto de 3C, a partir da adição de  $\text{CO}_2$  ao acetil-CoA, com ação da enzima Acetil-CoA Carboxilase, que é dependente de biotina (Fig. 6). A seguir acontece a via de alongação dos ácidos graxos, que depende do complexo enzimático



ácido graxo sintase (AGS). Este fica no citosol e requer a presença de acetil-CoA, que é a unidade biosintética inicial, e de malonil-CoA, que é a unidade de alongação que fornece dois carbonos a cada fase do crescimento da cadeia do ácido graxo (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). Para cada passo da alongação do ácido graxo, são necessárias duas moléculas de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), que podem ser produzidas pela enzima málica (que converte malato em piruvato) ou pela via das pentoses (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).



**Figura 6.** Formação de malonil-CoA.

A enzima Acetil-CoA-Carboxilase, que é dependente de biotina, adiciona uma molécula de  $\text{CO}_2$  ao acetil-CoA para formar o malonil-CoA.

Duas enzimas são importantes durante a fase de acúmulo de lipídeos pela via *de novo*: a enzima málica e a ATP citrato liase. A presença da ACL é necessária na acumulação lipídica, mas o fato de uma levedura possuir não garante que esta seja oleaginosa (MENG *et al.*, 2009). Um estudo comparou os genomas de microorganismos oleaginosos e não-oleaginosos e confirmou a presença de genes envolvidos na formação da ALC em leveduras e fungos filamentosos oleaginosos e a sua ausência nos não-oleaginosos (VORAPREEDA *et al.*, 2012).

Na via *ex novo*, ácidos graxos, óleos ou alcanos presentes no exterior da célula são hidrolisados por enzimas lipases e os ácidos graxos liberados são então transportados para o interior da célula na forma de CoA-tioésteres que entram na via de armazenamento para produzir os lipídeos. Algumas espécies que utilizam a via *ex novo* são *Cyberlindnera jadinii*, *Candida rugosa*, *Y. lipolytica* e *Candida colliculosa* (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011). Esta via não depende da escassez de N do meio, e ocorre simultaneamente ao crescimento celular. Na presença de

substratos hidrofóbicos, o complexo enzimático AGS e a enzima ACL são inibidos. Portanto, se o meio de cultura apresentar um substrato hidrofílico (como glicose ou glicerol) e longas cadeias hidrofóbicas (mesmo que em baixas concentrações), na maioria das vezes a via de síntese *de novo* não acontecerá (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011).

A elongação e dessaturação da cadeia carbônica dos ácidos graxos produzidos tanto na via *de novo* quanto na *ex novo* (normalmente os ácidos C16:0 ou C18:0) ocorrem posteriormente no retículo endoplasmático, pela ação das enzimas elongase e dessaturase. Cada espécie de levedura possui tipos diferentes dessas enzimas, o que acarreta em diferentes tipos de ácidos graxos sendo produzidos por linhagens e espécies distintas. Com os ácidos graxos formados, ocorre então a via de armazenamento dos lipídeos, em que os ácidos graxos são ligados à uma molécula de álcool, no caso o glicerol para formar o TAG; ou à uma molécula de esterol, para formar o éster esterol; que são armazenados nos corpos lipídicos e servem de reserva energética para a célula. Esses TAG podem ser hidrolisados por enzimas chamadas triacilglicerol lipases, fornecendo ácidos graxos livres para a síntese de membranas lipídicas e para atender às demandas energéticas da célula (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011). Teoricamente, o rendimento da produção lipídica por substrato é de 0,32g/g de glicose e 0,30g/g de glicerol, mas na prática, o rendimento lipídico é de aproximadamente 0,22 g/g de glicose (JIN *et al.*, 2015) e de 0,12 g/g de glicerol, devido aos gastos com biomassa e outros produtos (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

## **2.7. *Yarrowia lipolytica***

Pertencente ao filo Ascomycota, *Y. lipolytica* começou a ser usada comercialmente em 1970, na síntese de ácidos orgânicos (QUARTERMAN *et al.*, 2016). É a espécie tipo do gênero, que foi descrita por van der Walt e von ARX em 1980. Como a espécie é muito diferente de *Saccharomyces cerevisiae* quanto aos aspectos genéticos, evolutivos e fisiológicos, esta levedura teve o genoma mitocondrial sequenciado em 2001 por Kerscher e colaboradores, e o genoma nuclear completo em

2004, por Dujon e colaboradores. A espécie possui diversos usos industriais, como produção de proteases, lipases e de ácido cítrico, que é usado na indústria de fermentação (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Também possui a capacidade de acumular açúcares alcoólicos (como manitol, eritritol e arabitol) (EGERMEIER *et al.*, 2017), entretanto a produção de outros metabólitos pode ser uma desvantagem quando o objetivo é a produção lipídica. A levedura é classificada como sendo geralmente reconhecida como segura (GRAS), segundo a Food and Drug Administration dos Estados Unidos, podendo ser utilizada para a produção de ácido cítrico e também ter a biomassa consumida por humanos (DARVISHI *et al.*, 2017). Esta espécie é encontrada em ambientes variados, desde ambientes marinhos, areia, superfície de folhas, solos e ambientes ricos em lipídeos. Também é encontrada como um contaminante de queijo e carne de aves crua (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

*Y. lipolytica* possui metabolismo aeróbio estrito, não fermentativo, capaz de degradar compostos hidrofóbicos como N-alcanos, ácidos graxos, óleos e gorduras, por isso é frequentemente encontrada em ambientes com esse tipo de substrato. Essa habilidade se dá devido à presença de lipases e de diversos genes envolvidos no metabolismo de substratos hidrofóbicos, resultando na capacidade de acumulação de lipídeos em até 60% do seu peso seco, o que a classifica como uma levedura oleaginosa. Os lipídeos são acumulados nos corpos lipídicos tanto pela via *de novo* quanto pela *ex novo* e mais de 90% é composto de TAG, sendo o restante éster esterol. A espécie apresenta menores taxas de conteúdo lipídico (pode alcançar cerca de 60% do peso da biomassa seca) em relação a outros gêneros como *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* e *Trichosporon*, que acumulam ente 60 e 70% (BEOPOULOS *et al.*, 2009); entretanto, *Y. lipolytica* é a única espécie capaz de acumular altas concentrações de ácido linoleico, podendo ultrapassar 50% do total de ácidos graxos produzidos em algumas linhagens (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011)

A capacidade de utilização de substratos hidrofóbicos por *Y. lipolytica* também se deve às seguintes características: essa levedura sintetiza biossurfactantes, como o liposan, que solubilizam esses substratos; modifica a superfície celular para facilitar a

adesão e aumentar o contato com as gotículas hidrofóbicas; e possui mecanismos complexos de transporte para incorporar o carbono (FICKERS *et al.*, 2005). A espécie não é capaz de assimilar a maioria dos açúcares conhecidos, mas dentre os substratos assimilados, se encontra o glicerol. A utilização do glicerol bruto já foi mostrada para *Y. lipolytica*, apesar da presença de várias impurezas prejudicar o crescimento da levedura (DOBROWOLSKI *et al.*, 2016).

*Y. lipolytica* geneticamente modificada é usada para a produção industrial dos ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA, que são pertencentes à família do ômega-3 e possuem alto valor nutricional (RATLEDGE, 2004). Devido à capacidade de degradar substratos hidrofóbicos, a espécie também é usada em processos de biorremediação, reduzindo a demanda química de oxigênio (DQO) de águas contaminadas com óleos, açúcar, fosfato, fenol, corantes e metais (BEOPOULOS *et al.*, 2009). Outra característica relevante para a sua utilização biotecnológica é que diferentes linhagens da espécie apresentam diferentes morfologias e produzem diversos tipos e concentrações de metabólitos; essas diferenças parecem estar associadas ao local em que a linhagem foi isolada (EGERMEIER *et al.*, 2017).

Essa espécie vem sendo usada como um organismo modelo para o estudo dos mecanismos envolvidos nas vias metabólicas de acumulação de lipídeos (BEOPOULOS *et al.*, 2009). *Y. lipolytica* possui características únicas, tem o metabolismo voltado para a acumulação de lipídeos, é capaz de degradar substratos hidrofóbicos incluindo resíduos agroindustriais e é uma espécie com o metabolismo e genoma muito bem estudados, e estes fatores estimulam as buscas por uma linhagem dessa espécie que seja capaz de produzir altas taxas de lipídeos, com potencial aplicação na indústria de biodiesel. Além disso, como se conhece seu genoma e seus mecanismos de produção de óleo, esta é uma espécie mais fácil de ser modificada geneticamente.

Dobrowolski e colaboradores (2016) testaram a produção de lipídeos pela linhagem de levedura selvagem *Y. lipolytica* A101 isolada de solo contaminado por gasolina e diesel, em cinco tipos de resíduos de indústria (sendo três de indústria de biodiesel, um de sabão e um de estearina; glicerol puro foi usado como controle), que continham concentrações de glicerol bruto de 42 a 87%. A levedura apresentou

crescimento satisfatório nos cinco tipos de resíduo, mas o melhor resultado obtido em relação à produção lipídica foi com o glicerol proveniente do processo de saponificação, em que houve a produção de  $1,69 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo, que equivaleu a 25% do peso da biomassa seca. Além disso, os ácidos graxos produzidos apresentaram potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel, pois possuem baixas concentrações de ácidos PUFA. Este foi o primeiro trabalho publicado a relatar a produção de lipídeos a partir do glicerol bruto oriundo da indústria de sabão.

Outra forma de se reduzir os custos da produção de biodiesel, seria por meio da utilização não só dos lipídeos produzidos pela levedura, mas também das proteínas, carboidratos e outros nutrientes presentes nas células; essa biomassa poderia ser utilizada na alimentação de animais e também na produção de gás metano para geração de energia através de biodigestores (MENG *et al.*, 2009).

### 3. JUSTIFICATIVA

As desvantagens do uso de combustíveis fósseis, como a poluição ambiental, preços cada vez maiores e a natureza finita destes compostos, incentivam pesquisas por novas fontes de energia, principalmente as renováveis. A produção de biodiesel crescendo e se tornando uma fonte alternativa para o uso de diesel e gasolina, entretanto, os biodíeseis de 1ª geração são produzidos a partir de óleos vegetais e gordura animal, o que levanta os problemas do uso de alimentos e de áreas de plantio para a produção de combustível e o aumento no preço desses alimentos. Além disso, durante o processo de produção do biodiesel há a geração de glicerol, que é uma fonte de carbono desvalorizada no mercado: a cada 1000 Kg de biodiesel produzidos, são gerados 100 Kg de glicerol.

Uma das formas de energia renováveis que vem sendo estudada é a produção de biocombustíveis a partir de micro-organismos que utilizam resíduos como fonte de carbono. Os óleos microbianos possuem composição similar à dos óleos de plantas e também podem passar por um processo de transesterificação e serem convertidos a biodiesel. Estes óleos são produzidos por micro-organismos oleaginosos, que são aqueles capazes de acumular mais de 20% da sua biomassa em forma de lipídeos, dentre eles estão bactérias, microalgas e leveduras.

A produção de biodiesel a partir de lipídeos de leveduras oleaginosas apresenta diversas vantagens: é mais fácil de se produzir em grande escala, a produção é independente de clima ou estação do ano, as leveduras apresentam baixo risco à saúde humana quando comparadas a outros micro-organismos e algumas espécies podem acumular até 80% de conteúdo lipídico. Além disso, as leveduras podem ser geneticamente modificadas para aumentar a produtividade e são capazes de assimilar diversos tipos de fontes de carbono, inclusive resíduos da indústria e agricultura. A espécie *Yarrowia lipolytica* é um modelo para o estudo do metabolismo do acúmulo lipídico; ela produz até 60% de conteúdo lipídico, já é utilizada industrialmente na produção de metabólitos, é capaz de degradar compostos hidrofóbicos e resíduos como o glicerol, é reconhecida como segura e possui o genoma nuclear completo sequenciado, o que facilita a sua manipulação genética.

A habilidade das leveduras oleaginosas em produzir lipídeos leva ao uso dessas espécies para a produção de óleos com valor adicional, a partir de materiais desvalorizados no mercado. A composição lipídica e a capacidade de acumulação de cada espécie e linhagem de levedura dependem fortemente das condições de crescimento e cultura. Desse modo, para o desenvolvimento de biocombustíveis a partir de óleo microbiano, é essencial a identificação e caracterização de espécies e linhagens capazes de produzir altas concentrações de óleo a partir de matéria-prima abundante e de baixo custo, como o glicerol.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Geral**

Caracterizar e quantificar a produção de lipídeos por diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica*, visando encontrar leveduras que produzam altos níveis de óleo e com composição adequada para o uso na produção de biodiesel.

### **4.2. Específicos**

- 1- Quantificar os lipídeos produzidos pelas diferentes linhagens de *Y. lipolytica*, a partir do consumo de glicerol puro, nas temperaturas de 15 e 25 °C.
- 2- Selecionar a linhagem que apresentar melhor produção lipídica a partir de glicerol puro e fazer ensaio em glicerol bruto, quantificando os lipídeos produzidos.
- 3- Avaliar o consumo de glicerol puro e bruto pelas linhagens testadas.
- 4- Caracterizar e quantificar os ácidos graxos produzidos.



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Linhagens de leveduras e manutenção

Foram selecionadas cinco linhagens da espécie *Yarrowia lipolytica* de modo a testar micro-organismos isolados de diferentes substratos (areia de praia, queijo e líquens) e de diferentes localidades (Rio de Janeiro, Paraná e continente Antártico). As linhagens utilizadas no trabalho foram: *Yarrowia lipolytica* UFMG-CM-Y4427 isolada de areia no Rio de Janeiro; *Y. lipolytica* UFMG-CM-Y4187 isolada de areia do Paraná; *Y. lipolytica* UFMG-CM-Y6114 isolada de queijo artesanal, *Y. lipolytica* UFMG-CM-Y6189 isolada de líquens do continente Antártico e *Y. lipolytica* UFMG-CM-Y327 (= *Y. lipolytica* QU21) também isolada de queijo artesanal (esta última linhagem foi a mesma utilizada por Poli *et al.*, 2014). Os isolados pertencem à Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais, onde estão preservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2. Condições de cultivo

As leveduras foram cultivadas em ágar YM (glicose,  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; peptona,  $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; extrato de levedura,  $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; extrato de malte,  $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e ágar,  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e incubadas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Uma alçada das colônias crescidas no ágar YM foi cultivada em ágar YPD (extrato de levedura,  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; peptona,  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; glicose,  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e ágar,  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, para formar um tapete de células. Um terço das células de cada placa, correspondendo a uma média de  $0,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de células em peso seco, foi inoculado em Erlenmeyers de 125 e 250 mL contendo 35 e 75 mL de meio respectivamente (dessa forma a taxa entre o volume do Erlenmeyer e o volume de meio foi aproximada, para não influenciar na aeração). O meio de cultura continha 10% de fonte de carbono e 0,1% de fonte de nitrogênio (glicerol,  $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; enriquecidos com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); este meio foi desenvolvido por Poli e colaboradores (2014), visando uma maior produtividade de lipídeos, com uma taxa C/N de 184. Os Erlenmeyers de 125 mL foram incubados a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e os Erlenmeyers de 250 mL a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ambos em shakers a 150 rpm. Todos os meios foram autoclavados a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e cada ensaio foi realizado em 15

Erlenmeyers (3 referentes às triplicatas, para os dias 4, 6, 8, 10 e 12 que foram analisados), com o objetivo de se evitar possíveis contaminações caso os ensaios tivessem sido realizados em apenas um grande Erlenmeyer.

Inicialmente, a fonte de carbono utilizada no cultivo de todas as linhagens foi o glicerol puro; a partir dos resultados de produção lipídica foram escolhidas as duas melhores linhagens para a realização de um ensaio com glicerol bruto como fonte de carbono. O glicerol bruto usado foi obtido de uma indústria de biodiesel. Sua composição é a seguinte: conteúdo de glicerol, 82,73% p/p; cinzas sulfatadas, 6,3%; NaCl, 5,15%; cloreto, 3,3%; sódio, 2,02%; metanol, 0,008% (POLI *et al.*, 2014), este foi usado em uma concentração de 10% e foi a única fonte de carbono do meio.

Todos os cultivos foram feitos em triplicata. A primeira análise foi feita após 96 horas de cultivo e após isto, a cada 48 horas (até completar 12 dias de cultivo, totalizando cinco análises para cada linhagem de levedura, sendo estas nos dias 4, 6, 8, 10 e 12). Em cada análise foram determinados a biomassa em peso seco, o consumo da fonte de carbono e foi feita a extração e quantificação dos lipídeos de cada uma das triplicatas.

### **5.3. Determinação da biomassa seca**

A cada dois dias de cultivo no shaker, foram colocados em um tubo falcon de 50 mL previamente pesados: 10 mL de cultura dos frascos de 125 mL e 30 mL de cultura dos frascos de 250 mL. Os tubos foram centrifugados a 2200 g durante 10 minutos e 1 mL do sobrenadante foi guardada para análise do consumo de carbono. Os *pellets* foram lavados duas vezes com 15 mL de água destilada. Os tubos com os *pellets* eram mantidos a 55 °C e pesados diariamente até atingirem peso constante. Metodologia de Poli e colaboradores (2014).

#### 5.4. Extração dos lipídeos

A cada dois dias de cultivo, foram transferidos 10 mL de cultura para um tubo falcon de 50 mL. Os falcons foram centrifugados a 2200 g por 10 minutos. O *pellet* foi lavado duas vezes com água destilada.

As biomassa foi ressuspensa em 15 mL de água destilada e as células rompidas no IKA Ultra Turrax T 18 digital com elemento dispersor S18N-19G, a 21000 rpm, em 2 ciclos de 2 minutos, com intervalo de 1 minuto entre eles. A água contendo as células rompidas foi transferida para um Erlenmeyer de 100 mL, onde foram adicionados 37,5 mL da solução CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1 v/v) para a extração dos lipídeos das células rompidas (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957). Os frascos fechados foram mantidos em shaker a 200 rpm, 28 °C até o dia seguinte.

A fase líquida foi filtrada em membranas de papel e o filtrado foi centrifugado a 1600 g, por 8 minutos, para otimizar a separação das fases. A fase superior contendo o metanol e a água foi removida com uma pipeta Pasteur de vidro e descartada. A fase inferior, que continha clorofórmio e os lipídeos extraídos foi transferida para um tubo de cintilação previamente pesado e o solvente foi evaporado usando o Speed Vac Concentrator Savant SPD121P (Thermo Scientific, USA). Após a secagem completa do solvente, o tubo de cintilação foi pesado novamente para a determinação da produção lipídica.

A partir dos valores de peso seco da biomassa e do peso do lipídeo produzido pôde-se calcular o conteúdo lipídico produzido em porcentagem de cada uma das triplicatas, pela seguinte fórmula matemática:  $\text{Rendimento lipídico (g.L}^{-1}) \times 100 / \text{Peso seco (g.L}^{-1})$ . Metodologia adaptada de Poli e colaboradores (2014).

#### 5.5. Determinação do perfil de ácidos graxos

Os ácidos graxos presentes nos óleos foram analisados no Laboratório de Combustíveis da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram selecionadas duas amostras de óleo do 12º dia de ensaio de cada uma das leveduras, de ambos os

ensaios a 15 e 25 °C com glicerol puro. Já dos ensaios com glicerol bruto, foram selecionadas duas amostras de cada tempo analisado. Essas foram analisadas por cromatografia gasosa para determinação do perfil graxo. Os resultados não informam qual a concentração de cada ácido graxo, mas sim a proporção em porcentagem que cada ácido representa no total analisado. Foram considerados apenas os picos que corresponderam com os picos do padrão, que identifica 34 tipos de ácidos graxos. A área de cada pico informa qual a sua porcentagem em relação a todos os picos considerados. A partir desses resultados foi feito o cálculo da média entre as duplicatas.

Para a caracterização dos ácidos graxos, os lipídeos celulares foram convertidos a éster metílico de ácido graxo (FAME) de acordo com a seguinte metodologia. Cada amostra de óleo foi transferida para um vial e foi adicionado 100 µL de solução de KOH (hidróxido de potássio) 1 mol.L<sup>-1</sup>. O vial foi agitado no vortex e colocado em banho termostático a 65 °C por 20 minutos; após o resfriamento foram adicionados 400 µL de solução de HCl (ácido clorídrico) 20%, 20 mg de NaCl (cloreto de sódio) e 600 µL de acetato de etila. O vial foi agitado no vortex e deixado em repouso por 5 minutos. 300 µL da fase orgânica (superior) foram transferidos para outro vial, essa fase orgânica foi evaporada sob fluxo de nitrogênio. Foram então adicionados 100 µL de solução BF<sub>3</sub> (trifluoreto de boro) 14% em metanol e os vials foram novamente agitados no vortex e colocados em banho a 65 °C por 10 minutos. Após o resfriamento da amostra foram adicionados 500 µL de metanol grau HPLC e cerca de 100 mg de sulfato de sódio anidro. A solução foi filtrada em filtros com poros de 0,2 µm.

Os FAME foram analisados no cromatógrafo gasoso equipado com espectrometria de massas (GCMS-QP5050A, Shimadzu, Japan) e coluna capilar DB-WAX (30m x 0.25mm x 0.25µm). A temperatura do detector era de 260°C e do injetor 250°C. O seguinte programa de temperatura foi usado para a separação dos FAME: 70 °C, com aumento gradual de 4 °C por minuto até atingir a temperatura final de 230 °C, que era mantida por 10 minutos. O gás carreador foi gás hélio com velocidade linear de 28,1 cm.s<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 1µL com taxa de separação de 1:50. A identificação dos FAME foi avaliada usando Supelco 37 Component Fame Mix (10mg/mL - Sigma) como padrão e a quantificação pela normalização da área. Cada

amostra foi analisada durante 30 minutos. Metodologia de Christie (1989) e Instituto Adolfo Lutz (1985).

### **5.6. Análise do consumo da fonte de carbono**

Para a análise da concentração de glicerol consumido, 1,0 mL do meio de cultura inicial e do sobrenadante de cada amostra foram armazenados em microtubos de 1,5 mL, que posteriormente foram filtrados, diluídos e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se o cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão), de acordo com as seguintes condições: coluna Supelco Analytical C-610 H, mantida à temperatura de 45°C; volume de injeção de 20µL; detector de índice de refração RID 10-A; a fase móvel usada foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM. Também foi determinada a curva padrão do glicerol puro e os resultados foram comparados com essa curva.

### **5.7. Análises estatísticas**

Todas as etapas dos experimentos foram feitas em triplicata (cultivo nos Erlenmeyers, determinação da biomassa seca, extração lipídica e determinação da produção lipídica). Foram calculadas as médias dos resultados e estas foram comparadas por análise de variância (ANOVA) (p-valor <0,05). As diferenças entre as médias dos experimentos foram analisadas com o teste de Scott-Knott (p-valor <0,05), através do programa de análise estatística Sisvar (FERREIRA, 2011), para determinar se as diferenças foram estatisticamente significativas.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Análise da biomassa, produção lipídica e consumo de glicerol puro nos ensaios a 15 °C

A tabela 2 apresenta os resultados dos ensaios com glicerol puro a 15 °C, com os valores da média das triplicatas e seus respectivos desvios padrões para cada um dos tempos de análise. São apresentados os valores da biomassa em peso seco, rendimento lipídico, conteúdo lipídico, glicerol consumido e rendimento de óleo por substrato consumido ( $Y_{L/S}$ ). Os valores de cada coluna que apresentam a mesma letra no expoente não apresentam diferenças estatísticas significativas.

Das cinco linhagens de *Y. lipolytica* cultivadas à 15 °C, nenhuma foi capaz de produzir mais de 20% do seu peso seco na forma de lipídeos nos parâmetros de cultivo utilizados e com a metodologia de extração descrita neste trabalho. Portanto nesta temperatura nenhuma das linhagens pode ser considerada oleaginosa. Três isolados produziram valores próximos a 20%, sendo eles: UFMG-CM-Y6114, com 16,79%  $\pm$  0,39, UFMG-CM-Y6189, com 15,80%  $\pm$  1,47 e UFMG-CM-Y4187, que produziu 18,59%  $\pm$  1,19; não houve diferença estatisticamente significativa entre os três resultados de conteúdo lipídico para estas linhagens. Entretanto, o rendimento lipídico do isolado UFMG-CM-Y4187 foi significativamente maior (1,46  $\pm$  0,30 g.L<sup>-1</sup>) do que dos isolados UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y6189, (1,25  $\pm$  0,00 g.L<sup>-1</sup> e 1,21  $\pm$  0,06 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente).

O isolado UFMG-CM-Y4427 foi o que apresentou os resultados mais baixos de conteúdo e rendimento lipídico, alcançando somente 7,40%  $\pm$  2,93 e 0,63  $\pm$  0,09 g.L<sup>-1</sup>, entretanto foi o que obteve maior valor de biomassa (9,45  $\pm$  0,44 g.L<sup>-1</sup>). Os dois fatores combinados, alta taxa de biomassa e baixa produção lipídica, resultaram nos menores valores de conteúdo lipídico. Este isolado foi um dos que consumiu mais glicerol (49,5 g.L<sup>-1</sup>), assim como o isolado UFMG-CM-Y327 (49,86  $\pm$  8,27 g.L<sup>-1</sup>).

Considerando a máxima produção de biomassa de cada isolado a 15 °C, houve variação de 7,45  $\pm$  0,17 g.L<sup>-1</sup> (UFMG-CM-Y6114) a 9,45  $\pm$  0,44 (UFMG-CM-Y4427). Já o rendimento lipídico máximo variou entre 0,63  $\pm$  0,09 g.L<sup>-1</sup> (UFMG-CM-Y4427) e 1,46  $\pm$

0,30 g.L<sup>-1</sup> (UFMG-CM-Y4187). O conteúdo lipídico máximo variou entre 7,40% ± 2,93 (UFMG-CM-Y4427) e 17,05% ± 2,85 (UFMG-CM-Y4187), que representa uma diferença de mais de 56,6% entre os conteúdos máximos dos isolados com maior e menor produção lipídica. O consumo máximo de glicerol variou entre 34,76 ± 4,34 g.L<sup>-1</sup> (UFMG-CM-Y6189) e 49,86 ± 8,27 g.L<sup>-1</sup> (UFMG-CM-Y327). Já o maior valor de  $Y_{L/S}$  foi 0,04 g.g<sup>-1</sup>, que foi alcançado por duas leveduras (UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y4187). Os isolados UFMG-CM-Y4427 e UFMG-CM-Y327 não ultrapassaram 0,01 g.g<sup>-1</sup> de  $Y_{L/S}$  ao longo do ensaio.

**Tabela 2.** Média dos valores de biomassa, rendimento lipídico, conteúdo lipídico, consumo de glicerol e ( $Y_{L/S}$ ) rendimento lipídico por substrato no cultivo a 15 °C para as linhagens de *Yarrowia lipolytica*. Os valores correspondem aos cinco tempos analisados no cultivo em glicerol puro, com os respectivos desvios padrões. Valores com as mesmas letras não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Linhagem	Tempo (dias)	Biomassa em peso seco (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento lipídico (g.L <sup>-1</sup> )	Conteúdo lipídico (%)	Consumo de glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{L/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )
UFMG-CM-Y6114 (queijo)	4	4,73 ± 0,30 <sup>b</sup>	0,40 ± 0,12 <sup>a</sup>	8,59 ± 2,84 <sup>b</sup>	9,63 ± 3,75	0,04
	6	6,09 ± 0,38 <sup>c</sup>	0,52 ± 0,11 <sup>b</sup>	8,54 ± 1,34 <sup>b</sup>	18,17 ± 0,49	0,03
	8	6,33 ± 0,09 <sup>c</sup>	0,57 ± 0,06 <sup>b</sup>	9,01 ± 0,88 <sup>b</sup>	31,54 ± 3,60	0,02
	10	6,64 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,65 ± 0,09 <sup>b</sup>	9,83 ± 1,27 <sup>b</sup>	38,67 ± 4,83	0,02
	12	7,45 ± 0,17 <sup>d</sup>	1,25 ± 0,00 <sup>d</sup>	16,79 ± 0,39 <sup>c</sup>	47,81 ± 3,47	0,03
UFMG-CM-Y327 (queijo)	4	3,84 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,38 ± 1,28 <sup>a</sup>	20,98 ± 10,61	0,01
	6	3,34 ± 1,45 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,27 ± 2,80 <sup>b</sup>	23,74 ± 3,24	0,01
	8	6,80 ± 0,81 <sup>c</sup>	0,28 ± 0,09 <sup>a</sup>	4,30 ± 1,73 <sup>a</sup>	41,68 ± 5,58	0,01
	10	6,37 ± 1,54 <sup>c</sup>	0,55 ± 0,11 <sup>b</sup>	8,72 ± 1,12 <sup>b</sup>	47,17 ± 8,38	0,01
	12	8,48 ± 0,21 <sup>e</sup>	0,69 ± 0,03 <sup>b</sup>	8,18 ± 0,35 <sup>b</sup>	49,86 ± 8,27	0,01
UFMG-CM-Y6189 (Antártica)	4	4,17 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,15 <sup>a</sup>	8,82 ± 3,63 <sup>b</sup>	14,21 ± 5,71	0,03
	6	5,45 ± 0,16 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,13 <sup>a</sup>	7,51 ± 2,54 <sup>b</sup>	27,17 ± 4,87	0,02
	8	6,10 ± 0,37 <sup>c</sup>	0,35 ± 0,11 <sup>a</sup>	5,63 ± 1,40 <sup>a</sup>	32,84 ± 4,83	0,01
	10	6,55 ± 0,54 <sup>c</sup>	0,51 ± 0,10 <sup>b</sup>	7,81 ± 1,11 <sup>b</sup>	31,97 ± 12,77	0,02
	12	7,68 ± 0,35 <sup>d</sup>	1,21 ± 0,06 <sup>d</sup>	15,80 ± 1,47 <sup>c</sup>	34,76 ± 4,34	0,03
UFMG-CM-Y4187 (Paraná)	4	4,93 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,13 <sup>b</sup>	9,71 ± 2,33 <sup>b</sup>	17,49 ± 5,50	0,03
	6	5,26 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,06 <sup>c</sup>	18,59 ± 1,19 <sup>c</sup>	26,73 ± 9,26	0,04
	8	5,72 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,08 <sup>b</sup>	11,36 ± 1,25 <sup>b</sup>	27,21 ± 2,41	0,02
	10	7,67 ± 0,14 <sup>d</sup>	0,90 ± 0,38 <sup>c</sup>	11,74 ± 5,11 <sup>b</sup>	37,27 ± 7,57	0,02
	12	8,55 ± 0,43 <sup>e</sup>	1,46 ± 0,30 <sup>e</sup>	17,05 ± 2,85 <sup>c</sup>	36,56 ± 0,85	0,04
UFMG-CM-Y4427 (Rio de Janeiro)	4	3,76 ± 1,00 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,56 ± 3,01 <sup>a</sup>	21,67 ± 3,42	0,01
	6	4,74 ± 1,08 <sup>b</sup>	0,24 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,29 ± 1,83 <sup>a</sup>	33,37 ± 8,40	0,01
	8	7,20 ± 0,37 <sup>c</sup>	0,37 ± 0,13 <sup>a</sup>	5,20 ± 2,01 <sup>a</sup>	37,26 ± 5,78	0,01
	10	6,34 ± 1,81 <sup>c</sup>	0,45 ± 0,11 <sup>b</sup>	7,40 ± 2,93 <sup>b</sup>	41,24 ± 6,98	0,01
	12	9,45 ± 0,44 <sup>e</sup>	0,63 ± 0,09 <sup>b</sup>	6,72 ± 1,01 <sup>a</sup>	49,48 ± 6,12	0,01



## 6.2. Análise da biomassa, produção lipídica e consumo de glicerol puro nos ensaios a 25 °C

A tabela 3 abaixo mostra os valores das médias das triplicatas dos ensaios a 25 °C com glicerol puro. Três das cinco linhagens de *Y. lipolytica* testadas foram capazes de produzir mais de 20% do peso seco em lipídeos, portanto podem ser consideradas leveduras oleaginosas nessas condições de cultivo. Esses três isolados também foram os que alcançaram maiores conteúdos lipídicos a 15 °C. As três linhagens oleaginosas alcançaram a máxima produção de óleo no 12º dia de experimento e essas foram: UFMG-CM-Y6114, com 29,30% ± 4,12 de conteúdo lipídico, UFMG-CM-Y4187, com 26,95 % ± 4,68, e UFMG-CM-Y6189, com 34,38 % ± 2,15, sendo que os valores das duas primeiras não diferiram significativamente. Tanto UFMG-CM-Y6189 quanto UFMG-CM-Y4187 alcançaram a produção de 20% de lipídeos já no sexto dia de cultivo.

Os valores de rendimento e de conteúdo lipídico dessas três linhagens cultivadas a 25 °C foram maiores do que o dobro dos valores obtidos no ensaio a 15 °C. O consumo de glicerol também foi maior na temperatura mais alta.

Nas linhagens UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y4187, pode-se observar que a produção lipídica começou a aumentar após a diminuição do crescimento celular, pois os valores de biomassa não diferiram significativamente, enquanto os valores de rendimento lipídico aumentaram. Isso mostra que os óleos começaram a ser acumulados ao final da fase exponencial do crescimento. O aumento do consumo de glicerol ao longo dos dias por essas linhagens também comprova que a fonte de carbono foi utilizada no acúmulo lipídico. Provavelmente houve a depleção do nitrogênio no meio, que acabou redirecionando o metabolismo da levedura para o acúmulo lipídico. Nas linhagens UFMG-CM-Y327 e UFMG-CM-Y4427 pode-se observar que a biomassa não pára de aumentar, enquanto o rendimento lipídico continua o mesmo; esta seria a situação contrária a dos dois isolados citados anteriormente, em que o glicerol está sendo consumido em função do crescimento celular e não do acúmulo lipídico. Já na linhagem UFMG-CM-Y6189, tanto os lipídeos quanto o peso seco aumentaram com o consumo do glicerol, isso poderia ser uma

vantagem no processo industrial, já que reduziria o tempo de início da produção lipídica.

A linhagem da Antártica UFMG-CM-Y6189 apresentou os melhores resultados tanto de biomassa em peso seco  $8,35 \pm 0,30 \text{ g.L}^{-1}$ , quanto de rendimento lipídico  $2,87 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$  e de conteúdo lipídico  $34,38\% \pm 2,15$ . Além disso é interessante observar que do 10º para o 12º dia, o rendimento aumentou em 65,9%. Esta também foi a linhagem que consumiu a maior concentração de glicerol, que foi de  $60,68 \pm 1,81 \text{ g.L}^{-1}$ , e também alcançou o maior valor de  $Y_{LS}$  do presente trabalho, que foi de  $0,05 \text{ g.g}^{-1}$ .

O isolado do Rio de Janeiro UFMG-CM-Y4427 teve os menores resultados de conteúdo lipídico, alcançando somente  $12,42\% \pm 1,22$ , pois apresentou um alto crescimento celular ( $8,23 \pm 0,50 \text{ g.L}^{-1}$ ), que não foi acompanhado pelo aumento no rendimento lipídico ( $1,02 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$ ). O alto consumo de glicerol por esta linhagem ( $54,70 \pm 4,10 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi investido na produção de biomassa e talvez em outros metabólitos não testados neste trabalho.

A máxima produção de biomassa de cada isolado variou entre  $6,37 \pm 0,20 \text{ g.L}^{-1}$  (UFMG-CM-Y327) e  $8,35 \pm 0,30 \text{ g.L}^{-1}$  (UFMG-CM-Y6189). Já o rendimento lipídico máximo variou entre  $0,87 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$  (UFMG-CM-Y327) e  $2,87 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$  (UFMG-CM-Y6189). O conteúdo lipídico máximo variou entre  $12,42\% \pm 1,22$  (UFMG-CM-Y4427) e  $34,38\% \pm 2,15$  (UFMG-CM-Y6189). Não apenas os valores de rendimento e conteúdo lipídico foram maiores a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , mas também o consumo de glicerol, que variou entre  $46,15 \pm 3,21 \text{ g.L}^{-1}$  (UFMG-CM-Y4187) e  $60,68 \pm 1,81 \text{ g.L}^{-1}$  (UFMG-CM-Y6189).

As linhagens UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y4187, que assim como a linhagem da Antártica, produziram mais de 20% de lipídeos, não diferiram estatisticamente em relação ao rendimento e ao conteúdo lipídico. UFMG-CM-Y6114 obteve  $1,98 \pm 0,24 \text{ g.L}^{-1}$  de rendimento, e a UFMG-CM-Y4187 alcançou  $2,06 \pm 0,37 \text{ g.L}^{-1}$ . Assim, a linhagem UFMG-CM-Y6114 foi selecionada, juntamente com a UFMG-CM-Y6189, para serem testadas nos ensaios com glicerol bruto.

**Tabela 3.** Média dos valores de biomassa, rendimento lipídico, conteúdo lipídico, consumo de glicerol e ( $Y_{L/S}$ ) rendimento lipídico por substrato no cultivo a 25 °C para as linhagens de *Yarrowia lipolytica*. Os valores correspondem aos cinco tempos analisados no cultivo em glicerol puro, com os respectivos desvios padrões. Valores com as mesmas letras não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Linhagem	Tempo (dias)	Biomassa em peso seco (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento lipídico (g.L <sup>-1</sup> )	Conteúdo lipídico (%)	Consumo de glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{L/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )
UFMG-CM-Y6114 (queijo)	4	4,36 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,58 ± 0,02 <sup>c</sup>	13,39 ± 0,97 <sup>c</sup>	19,98 ± 6,12	0,03
	6	5,04 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,83 ± 0,05 <sup>d</sup>	16,38 ± 0,92 <sup>c</sup>	32,11 ± 5,24	0,03
	8	6,34 ± 0,27 <sup>d</sup>	1,10 ± 0,04 <sup>e</sup>	17,39 ± 1,27 <sup>c</sup>	38,43 ± 2,73	0,03
	10	6,50 ± 0,27 <sup>d</sup>	1,64 ± 0,09 <sup>g</sup>	25,21 ± 0,28 <sup>d</sup>	42,26 ± 2,59	0,04
	12	6,78 ± 0,29 <sup>d</sup>	1,98 ± 0,24 <sup>h</sup>	29,30 ± 4,12 <sup>e</sup>	48,52 ± 2,00	0,04
UFMG-CM-Y327 (queijo)	4	3,01 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,88 ± 1,28 <sup>a</sup>	18,72 ± 4,87	0,01
	6	4,34 ± 0,20 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,02 <sup>b</sup>	11,15 ± 0,95 <sup>b</sup>	39,99 ± 5,13	0,01
	8	4,44 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,05 <sup>c</sup>	14,74 ± 1,59 <sup>c</sup>	45,03 ± 7,34	0,01
	10	4,43 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,06 <sup>c</sup>	16,14 ± 1,79 <sup>c</sup>	48,66 ± 8,86	0,01
	12	6,37 ± 0,20 <sup>d</sup>	0,87 ± 0,14 <sup>d</sup>	13,58 ± 1,72 <sup>c</sup>	50,97 ± 2,29	0,02
UFMG-CM-Y6189 (Antártica)	4	4,65 ± 0,44 <sup>b</sup>	0,82 ± 0,05 <sup>d</sup>	17,74 ± 2,20 <sup>c</sup>	24,21 ± 3,49	0,03
	6	6,40 ± 0,59 <sup>d</sup>	1,47 ± 0,25 <sup>f</sup>	22,86 ± 1,76 <sup>d</sup>	43,45 ± 10,54	0,03
	8	6,47 ± 0,68 <sup>d</sup>	1,50 ± 0,17 <sup>f</sup>	23,40 ± 4,51 <sup>d</sup>	45,11 ± 10,22	0,03
	10	7,58 ± 0,42 <sup>e</sup>	1,73 ± 0,12 <sup>g</sup>	22,88 ± 1,30 <sup>d</sup>	50,03 ± 2,03	0,03
	12	8,35 ± 0,30 <sup>f</sup>	2,87 ± 0,11 <sup>i</sup>	34,38 ± 2,15 <sup>f</sup>	60,68 ± 1,81	0,05
UFMG-CM-Y4187 (Paraná)	4	4,42 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,10 <sup>c</sup>	15,20 ± 2,41 <sup>c</sup>	23,06 ± 0,34	0,03
	6	6,04 ± 0,48 <sup>d</sup>	1,21 ± 0,17 <sup>e</sup>	20,12 ± 3,29 <sup>d</sup>	28,70 ± 3,93	0,04
	8	7,14 ± 0,44 <sup>e</sup>	1,51 ± 0,15 <sup>f</sup>	21,71 ± 0,65 <sup>d</sup>	42,73 ± 8,67	0,04
	10	7,32 ± 0,11 <sup>e</sup>	1,58 ± 0,11 <sup>g</sup>	21,62 ± 1,20 <sup>d</sup>	43,35 ± 2,53	0,04
	12	7,63 ± 0,18 <sup>e</sup>	2,06 ± 0,37 <sup>h</sup>	26,95 ± 4,68 <sup>e</sup>	46,15 ± 3,21	0,04
UFMG-CM-Y4427 (Rio de Janeiro)	4	4,05 ± 0,49 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,10 <sup>b</sup>	11,15 ± 1,70 <sup>b</sup>	23,85 ± 5,91	0,02
	6	5,56 ± 0,25 <sup>c</sup>	0,61 ± 0,07 <sup>c</sup>	10,99 ± 1,35 <sup>b</sup>	36,44 ± 1,08	0,02
	8	6,56 ± 0,43 <sup>d</sup>	0,69 ± 0,07 <sup>c</sup>	10,56 ± 1,44 <sup>b</sup>	41,22 ± 5,51	0,02
	10	7,34 ± 0,28 <sup>e</sup>	0,82 ± 0,14 <sup>d</sup>	11,19 ± 2,02 <sup>b</sup>	50,05 ± 3,53	0,02
	12	8,23 ± 0,50 <sup>f</sup>	1,02 ± 0,07 <sup>e</sup>	12,42 ± 1,22 <sup>b</sup>	54,70 ± 4,10	0,02

### 6.3. Caracterização e quantificação dos ácidos graxos produzidos a partir de glicerol puro

A partir dos resultados da cromatografia gasosa, foi feito o cálculo da média entre as duplicatas dos perfis graxos dos óleos do 12º dia de cultivo. A tabela 4 apresenta a composição lipídica em porcentagem dos principais ácidos graxos presentes em cada amostra e seus respectivos desvios padrões. Os ácidos com menor proporção (até 2,0%) estão agrupados em 'outros'. A tabela também apresenta um somatório dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA).

Os perfis graxos das cinco leveduras foram bastante semelhantes dentro de cada temperatura, tanto em relação quanto aos tipos de ácidos graxos presentes, quanto às suas proporções. As maiores variações ocorreram entre as duas condições de temperatura. O principal ácido graxo produzido pelos isolados nas duas temperaturas testadas foi o ácido oleico (C18:1). A 15 °C, a composição de ácido oleico ficou entre 61,2 e 67,6%, seguida do ácido palmitoleico (C16:1) com variação entre 13,9 e 16,5%. O ácido palmítico (C16:0) vem em seguida com 7,1 a 12,1%. Os ácidos esteárico (C18:0) e linoleico (C18:2) aparecerem em menores proporções, com valores entre 3,8 e 5,6% e 2,8 e 6,2%, respectivamente.

Os ensaios a 25 °C resultaram nos mesmos ácidos graxos principais presentes nos ensaios a 15 °C; entretanto, as proporções destes apresentaram algumas variações. São observados dois padrões de perfis graxos; nos isolados UFMG-CM-Y6114, UFMG-CM-Y327 e UFMG-CM-Y4187 o ácido oleico (C18:1) foi o principal, variando entre 54,78 e 58,51%, seguido do ácido palmítico (C16:0) com entre 14,17 e 15,55%, ácido esteárico (C18:0) com entre 11,36 e 15,41%. A seguir vem o ácido palmitoleico (C16:1) com entre 5,68 e 7,67%, e em menor proporção o ácido linoleico (C18:2) com entre 3,38 e 5,75%. Já nos isolados UFMG-CM-Y6189 e UFMG-CM-Y4427, o ácido oleico (C18:1) também foi predominante (entre 52,64 e 59,02%), também seguido do palmítico (C16:0) com entre 16,02 ± 0,17 e 18,4%. Já o terceiro ácido mais predominante foi o palmitoleico (C16:1) com entre 11 e 13%, seguido do

esteárico (C18:0) com entre 7,31 e 7,63%. Por último também se encontra o ácido linoleico (C18:2) com entre 3,80 e 5,33%.

As diferenças entre as proporções dos ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1) e esteárico (C18:0) entre as duas temperaturas de cultivo resultaram em proporções variadas dos ácidos saturados, MUFA e PUFA, mas não mudaram o fato de que nas duas temperaturas os ácidos foram predominantemente monoinsaturados (C16:1, C18:1). Estes foram seguidos pelos ácidos saturados (C16:0, C18:0) e em pequena porcentagem pelos poli-insaturados (C18:2). A diferença é que a 15 °C, a proporção de ácidos saturados variou entre 13,2 e 18,1%, que foi menor do que a proporção dos ácidos saturados a 25 °C (24,5 e 31,7%). Já a proporção de MUFA a 15 °C foi maior (entre 76,6 e 80,4%) quando comparada a 25 °C (entre 62,0 e 71,7%). A quantidade de PUFA foi entre 3,8 e 6,9% para as duas temperaturas.

Dentre os ácidos classificados agrupados em 'outros' estão os ácidos saturados: C17:0, C17:1, C18:3, C20:0, C20:1, C24:0, dentre outros. Estes apareceram em quantidades mínimas de até 2,0%, não necessariamente em todas as amostras. A quantidade de cada um deles está também representada nos ácidos saturados, MUFA e PUFA.

**Tabela 4.** Perfil lipídico (%) dos ácidos graxos produzidos pelas cinco linhagens de *Yarrowia lipolytica* nas temperaturas de 15 e 25 °C, com 12 dias de cultivo, a partir de glicerol puro.

Os valores são referentes às médias das duplicatas. MUFA: Ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: Ácidos graxos poli-insaturados.

Ensaio a 15 °C									
Linhagens	% Ácidos graxos								
	Ácido palmítico (C16:0)	Ácido palmitoleico (C16:1)	Ácido esteárico (C18:0)	Ácido oleico (C18:1n9)	Ácido linoleico (C18:2n6)	Outros	Ácidos saturados	MUFA	PUFA
UFMG-CM-Y6114	8.74 ± 0.0	16.51 ± 0.10	5.36 ± 0.0	63.44 ± 0.85	3.60 ± 0.16	2.35	15.68	80.44	3.87
UFMG-CM-Y327	8.63 ± 0.43	13.89 ± 0.14	3.80 ± 0.0	67.65 ± 1.17	4.39 ± 0.22	1.64	13.19	82.01	4.81
UFMG-CM-Y6189	8.34 ± 0.05	16.16 ± 0.50	4.21 ± 0.13	61.17 ± 0.78	6.23 ± 0.79	3.89	14.30	78.75	6.94
UFMG-CM-Y4187	7.06 ± 0.30	15.01 ± 0.30	5.34 ± 0.32	66.14 ± 1.55	2.78 ± 0.15	3.68	14.26	82.08	4.05
UFMG-CM-Y4427	12.14 ± 0.73	16.06 ± 1.59	5.60 ± 0.56	60.25 ± 2.14	5.31 ± 1.32	0.63	18.08	76.61	5.31
Ensaio a 25°C									
Linhagem	% Ácidos graxos								
	Ácido palmítico (C16:0)	Ácido palmitoleico (C16:1)	Ácido esteárico (C18:0)	Ácido oleico (C18:1n9)	Ácido linoleico (C18:2n6)	Outros	Ácidos saturados	MUFA	PUFA
UFMG-CM-Y6114	14.17 ± 0.3	7.6 ± 0.30	11.36 ± 1.16	58.51 ± 2.23	3.94 ± 0.35	4.42	27.89	67.84	4.27
UFMG-CM-Y327	15.55 ± 0.54	5.68 ± 0.56	15.41 ± 0.81	54.78 ± 0.88	5.75 ± 0.32	2.83	31.71	62.03	6.27
UFMG-CM-Y6189	18.40 ± 0.58	13.00 ± 2.46	7.63 ± 1.69	52.64 ± 2.67	5.33 ± 0.92	2.70	27.14	67.10	5.76
UFMG-CM-Y4187	14.53 ± 0.06	7.67 ± 0.43	13.57 ± 0.12	57.78 ± 1.37	3.38 ± 0.26	3.07	29.43	66.82	3.75
UFMG-CM-Y4427	16.02 ± 0.17	11.01 ± 0.91	7.31 ± 0.75	59.02 ± 0.6	3.80 ± 0.25	2.13	24.46	71.73	3.80

#### **6.4. Avaliação do crescimento, consumo de substrato e quantificação dos lipídeos produzidos a partir de glicerol bruto**

Os ensaios em glicerol puro a 15 e 25 °C serviram para selecionar as melhores linhagens produtoras de lipídeos e estas serem testadas com o glicerol bruto residual de indústria de biodiesel. A triagem foi feita pois já era esperado que a produção de óleo seria menor utilizando o glicerol bruto e assim as leveduras que não produzissem quantidades significativas de óleo a partir do glicerol puro não seriam utilizadas nos próximos ensaios. Nos ensaios a 15 °C, nenhuma das cinco linhagens foi capaz de produzir mais de 20% de óleo em conteúdo lipídico. Nos ensaios a 25 °C, foram obtidas três linhagens oleaginosas; destas, duas foram selecionadas para um ensaio somente a 25 °C, com glicerol bruto, sendo estas a levedura de queijo UFMG-CM-Y6114 e a levedura da Antártica UFMG-CM-Y6189.

A figura 7 mostra a produção de biomassa, rendimento lipídico e conteúdo de óleo ao longo dos cinco dias de análise, para os dois isolados de levedura testados. O isolado de queijo UFMG-CM-Y6114 não conseguiu alcançar os 20% de conteúdo lipídico a partir do glicerol bruto, chegando a apenas 15,88%  $\pm$  0,54 no 12º dia, o que representa cerca de metade do conteúdo produzido a partir do glicerol puro na mesma temperatura. A biomassa em peso seco teve um valor maior com o glicerol bruto (8,74  $\pm$  0,46 g.L<sup>-1</sup>) mas o rendimento lipídico foi significativamente menor (1,39  $\pm$  0,07 g.L<sup>-1</sup>). Do 6º ao 10º dia não houve diferença significativa no rendimento lipídico, já no 12º dia analisado houve um pequeno aumento no rendimento, mas que não alterou os valores de conteúdo lipídico, que se mantiveram sem diferenças estatísticas significativas a partir do 6º dia de cultivo. A biomassa continuou aumentando significativamente ao longo de todo o ensaio.

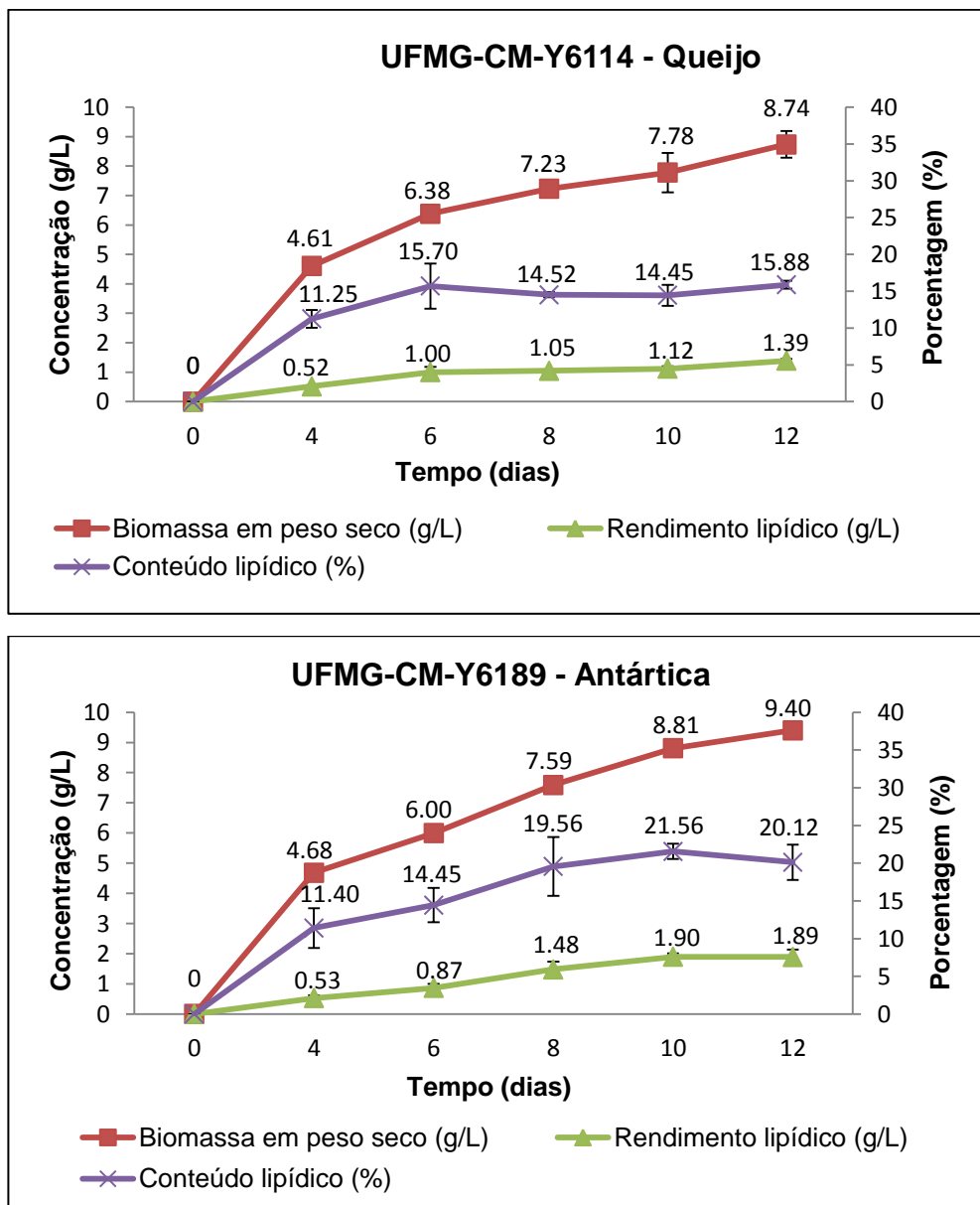
Um melhor resultado foi obtido com o isolado da Antártica (UFMG-CM-Y6189), que alcançou 21,56%  $\pm$  1,04 no 10º dia; valor que não se diferenciou estatisticamente dos conteúdos alcançados também no 8º e 12º dias. Este resultado foi bem menor do que os 34,38% obtidos pela mesma linhagem em glicerol puro, como era esperado, mas ainda sim foi melhor do que a produção lipídica em glicerol puro por outros isolados (UFMG-CM-Y327 e UFMG-CM-Y4427) e do que a levedura de queijo testada

em glicerol bruto. O rendimento lipídico máximo de  $1,90 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}$  foi alcançado aos 10 dias pelo isolado da Antártica, e apesar de ter sido muito menor do que o rendimento máximo da mesma levedura em glicerol puro, este valor ainda foi quase igual ao obtido pela UFMG-CM-Y6114 em glicerol puro, que teve o segundo maior rendimento. A biomassa em peso seco seguiu aumentando significativamente ao longo de todo o cultivo, e alcançou o valor de  $9,40 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$  no 12º dia, que só foi significativamente igual a biomassa de UFMG-CM-Y4427 no cultivo a 15 °C. Este valor foi maior do que todas as outras linhagens em todos os ensaios (com glicerol puro e bruto), inclusive significativamente maior do que a alcançado pela UFMG-CM-Y6114 em glicerol bruto.

O glicerol bruto foi utilizado a uma concentração de 10% (p/v) e como este é composto de outras substâncias além do glicerol, a concentração inicial de glicerol no meio foi determinada por cromatografia líquida sendo de  $91,98 \text{ g.L}^{-1}$ . A tabela 5 mostra os valores das médias das triplicatas do glicerol bruto consumido e o rendimento de óleo por substrato consumido ( $Y_{L/S}$ ) para as duas linhagens.

O consumo de glicerol ao longo dos dias foi bastante similar para as duas linhagens. O isolado de queijo consumiu uma maior concentração de glicerol bruto ( $60,0 \pm 3,08 \text{ g.L}^{-1}$ ) quando comparado ao glicerol puro ( $48,52 \pm 2,0 \text{ g.L}^{-1}$ ); e o isolado da Antártica consumiu cerca de  $60 \text{ g.L}^{-1}$  nos dois substratos. Entretanto, em relação à porcentagem de glicerol consumido em relação à concentração inicial do meio, UFMG-CM-Y6114 consumiu cerca de 65,2% do glicerol bruto; enquanto UFMG-CM-Y6189 consumiu cerca de 66,6%. O valor de  $Y_{L/S}$  de ambas as leveduras foi menor em glicerol bruto, alcançando  $0,03 \text{ g.g}^{-1}$ .





**Figura 7.** Peso seco, rendimento lipídico e conteúdo lipídico médio das cinco análises dos ensaios com glicerol bruto a 25 °C com as linhagens UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y6189 de *Yarrowia lipolytica*. As barras representam o desvio padrão entre as triplicatas.

**Tabela 5.** Consumo de glicerol bruto e rendimento de óleo por substrato consumido ( $Y_{L/S}$ ) pelas linhagens de *Yarrowia lipolytica* UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y6189. Glicerol inicial era de 92,0 g.L<sup>-1</sup>.

Tempo (dias)	UFMG-CM-Y6114		UFMG-CM-Y6189	
	Glicerol consumido (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{L/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	Glicerol consumido (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{L/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )
4	29.87 ± 1.47	0,02	29.87 ± 3.97	0,02
6	38.77 ± 1.48	0,03	41.95 ± 4.44	0,02
8	45.80 ± 0.79	0,02	48.50 ± 3.28	0,03
10	52.48 ± 2.76	0,02	56.33 ± 1.11	0,03
12	60.00 ± 3.08	0,02	61.31 ± 1.38	0,03

### 6.5. Caracterização e quantificação dos ácidos graxos produzidos a partir de glicerol bruto

Foram selecionadas duas amostras por dia de cada isolado para serem analisadas no cromatógrafo gasoso. Os valores presentes na tabela 6 são da média das duplicatas e respectivos desvios padrões e representam a percentagem da composição de cada ácido graxo, além dos agrupamentos em ácidos saturados, MUFA e PUFA. Foram caracterizados os óleos de cada dia de análise a fim de se observar possíveis alterações na composição lipídica ao longo dos dias de experimento; entretanto, nas duas linhagens não houve grandes variações na quantidade de cada ácido ao longo dos dias.

Na composição do isolado de queijo UFMG-CM-Y6114, o ácido predominante foi o oleico (C18:1), com entre 51,2 e 57,1% ao longo dos dias, seguido do esteárico (C18:0) com entre 16,34 e 21,9%. A seguir o ácido palmítico (C16:0) com entre 14,46 e 15,06%, e em menores quantidades os ácidos palmítoleico (C16:1), com entre 4,38 e 5,91% e linoleico (C18:2) com cerca de 3,1 e 4,03%.

Já no isolado da Antártica UFMG-CM-Y6189, o ácido principal também foi o oleico (C18:1), com entre 48,16 e 50,19%. Diferente da linhagem UFMG-CM-Y6114, o segundo ácido predominante foi o palmítico (C16:0) com entre 19,71 e 22,44%, seguido do esteárico (C18:0) com entre 11,22 e 15,21%. Em menores quantidades aparecem os ácidos palmitoleico (C16:1) (entre 7,99 e 9,61%) e o palmítico (C18:2) (entre 4,15 e 5,58%).

As proporções de ácidos saturados, MUFA e PUFA de ambos os isolados foi bastante similar; em UFMG-CM-Y6114, o conteúdo foi de em média 35,5%, 60,4% e 4,2%, respectivamente. Na levedura UFMG-CM-Y6189, o conteúdo de saturados, MUFA e PUFA foi em média de 35,3%, 59,5% e 5,2%, respectivamente.

**Tabela 6.** Perfil lipídico (%) dos ácidos graxos produzidos pelas linhagens de *Yarrowia lipolytica* UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y6189, em cada dia de análise. Ensaio a partir de glicerol bruto, a 25 °C. Os valores são referentes às médias das duplicatas. MUFA: Ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: Ácidos graxos poli-insaturados.

<b>UFMG-CM-Y6114</b>									
<b>Tempo (dias)</b>	<b>% Ácidos graxos</b>								
	<b>Ácido palmítico (C16:0)</b>	<b>Ácido palmitoleico (C16:1)</b>	<b>Ácido esteárico (C18:0)</b>	<b>Ácido oleico (C18:1n9)</b>	<b>Ácido linoleico (C18:2n6)</b>	<b>Outros</b>	<b>Ácidos saturados</b>	<b>MUFA</b>	<b>PUFA</b>
<b>4</b>	14.77 ± 0.17	3.08 ± 0.35	21.90 ± 1.34	51.21 ± 1.46	3.89 ± 0.36	5.15	39.82	55.95	4.23
<b>6</b>	14.75 ± 0.04	4.64 ± 0.52	17.78 ± 1.15	57.10 ± 0.91	3.10 ± 0.08	2.63	33.84	62.77	3.38
<b>8</b>	14.65 ± 0.01	4.38 ± 0.12	20.53 ± 0.38	54.17 ± 0.15	3.48 ± 0.08	2.78	36.55	59.63	3.82
<b>10</b>	14.46 ± 0.05	5.91 ± 0.02	16.34 ± 0.06	54.82 ± 0.16	4.03 ± 0.01	4.45	33.03	61.94	5.04
<b>12</b>	15.06 ± 0.03	5.67 ± 0.41	17.52 ± 0.01	54.10 ± 1.08	3.82 ± 0.04	3.83	34.15	61.59	4.26

<b>UFMG-CM-Y6189</b>									
<b>Tempo (dias)</b>	<b>% Ácidos graxos</b>								
	<b>Ácido palmítico (C16:0)</b>	<b>Ácido palmitoleico (C16:1)</b>	<b>Ácido esteárico (C18:0)</b>	<b>Ácido oleico (C18:1n9)</b>	<b>Ácido linoleico (C18:2n6)</b>	<b>Outros</b>	<b>Ácidos saturados</b>	<b>MUFA</b>	<b>PUFA</b>
<b>4</b>	19.71 ± 0.81	7.99 ± 0.18	15.21 ± 0.05	48.16 ± 0.08	5.58 ± 0.34	3.35	36.92	57.1	5.98
<b>6</b>	22.19 ± 0.15	8.76 ± 0.06	12.77 ± 0.29	50.19 ± 0.29	4.67 ± 0.09	1.42	35.5	59.52	4.98
<b>8</b>	22.07 ± 0.09	9.61 ± 0.50	11.74 ± 0.60	50.05 ± 0.44	4.15 ± 0.08	2.38	35.47	60.17	4.36
<b>10</b>	21.98 ± 0.26	9.31 ± 0.36	11.49 ± 0.49	48.66 ± 0.66	4.61 ± 0.25	3.95	34.83	59.89	5.27
<b>12</b>	22.44 ± 0.08	9.18 ± 0.85	11.22 ± 0.45	50.10 ± 0.25	5.36 ± 0.05	1.7	33.62	60.81	5.57

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1. Análise da biomassa, rendimento e conteúdo lipídico

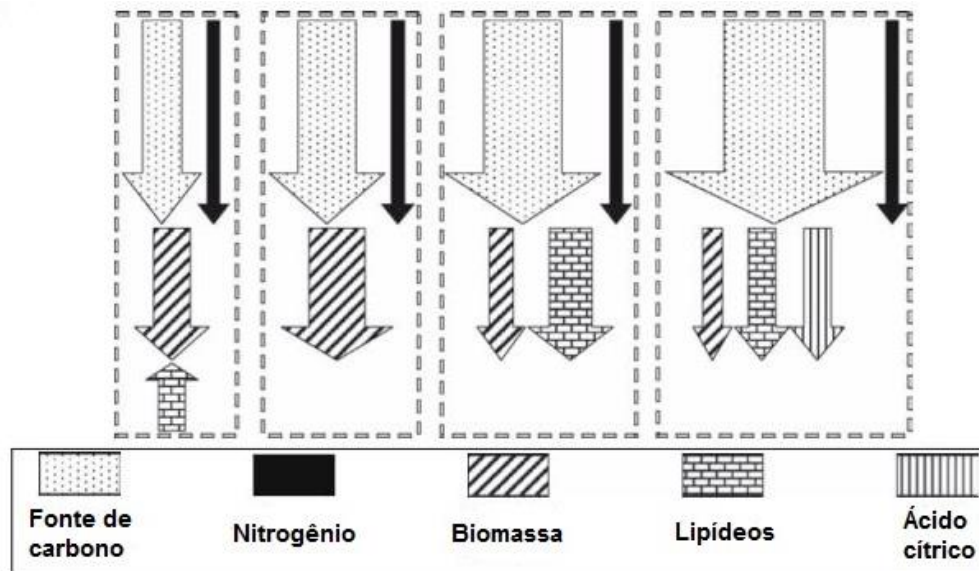
Para que o óleo microbiano consiga competir com os óleos vegetais no mercado de biodieseis, os custos de produção precisam ser reduzidos. A matéria-prima usada como substrato pelo micro-organismo tem grande influência nesses custos de produção. Apesar de o glicerol purificado resultar em melhores condições de crescimento e acúmulo de óleo, a sua utilização industrial não é viável devido aos altos custos de purificação desse resíduo; portanto, o interessante seria a utilização do glicerol bruto que é descartado pela própria indústria de biodiesel. Os primeiros ensaios a 15 e 25 °C usando glicerol puro tiveram o objetivo de selecionar as linhagens que fossem capazes de produzir maiores conteúdos lipídicos, para serem então testadas na presença do glicerol bruto como fonte de carbono; pois já era esperado que o resultado utilizando o glicerol residual fosse inferior ao resultado com o glicerol purificado, devido às impurezas e inibidores presentes no resíduo bruto.

Em determinadas condições de cultivo, somente algumas linhagens de *Yarrowia lipolytica* são consideradas oleaginosas (LIU; JI; HUANG, 2015); isto foi comprovado neste trabalho, em que três (UFMG-CM-Y6189, UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y4187) das cinco linhagens testadas no glicerol puro, e uma (UFMG-CM-Y6189) das duas linhagens testadas em glicerol bruto, foram capazes de produzir mais de 20% de conteúdo lipídico nas condições de cultivo e metodologia de extração utilizadas. Entretanto, otimizando-se algumas condições como aeração, temperatura, concentração da fonte de carbono e fazendo-se alterações nas etapas da extração lipídica, poderia-se alcançar resultados diferentes, com maiores rendimentos de óleo.

Diferentes isolados da mesma espécie são capazes de acumular diferentes quantidades de lipídeos (UPRETY; VENKATESAGOWDA; RAKSHIT, 2017) e foi o que aconteceu neste trabalho. A linhagem UFMG-CM-Y6189, por exemplo, produziu quase 3 vezes mais óleo (em rendimento e conteúdo) do que a linhagem UFMG-CM-Y4427. Isso prova a importância de se testar diferentes isolados de espécies consideradas oleaginosas. A redução da temperatura ambiental provoca mudanças nas propriedades

físicas e funções da membrana celular, o que resulta na diminuição da fluidez da membrana. Para se adaptarem à esses ambientes muito frios, vários micro-organismos são capazes de modular a fluidez da membrana através da regulação da síntese de ácidos graxos, e assim mudar a composição de ácidos graxos mais saturados para mais insaturados (ZLATANOV *et al.*, 2010). Portanto, a presença de leveduras nos ambientes extremos do continente Antártico pode estar relacionada ao conteúdo lipídico que tem um papel estrutural e protetor para a célula. Isso poderia explicar os altos níveis lipídicos obtidos pela linhagem UFMG-CM-Y6189, que foi isolada de líquens presentes na Antártica. Além de poderem ser disponibilizados para a membrana celular, esses lipídeos contidos nos corpos lipídicos intracelulares também possuem a função de reserva energética, que é especialmente importante em ambientes que não apresentam nutrientes abundantemente disponíveis, como é o caso da Antártica.

Nos cultivos com glicerol puro nas duas temperaturas, as linhagens UFMG-CM-Y327 e UFMG-CM-Y4427 continuaram aumentando a biomassa sem produzir grandes quantidades de lipídeo. Isto acontece em algumas espécies e linhagens, ou sob determinadas condições de cultivo, em que o substrato é convertido tanto em biomassa, quanto em uma pequena quantidade de lipídeo e também em outros produtos metabólicos, como o ácido cítrico. A figura 8 mostra um esquema dos possíveis estados metabólicos que uma levedura oleaginosa pode seguir, dependendo da espécie, linhagem e das condições de cultivo. As setas de fonte de carbono e nitrogênio correspondem ao fluxo para o interior da célula. A largura das setas é proporcional à concentração de fluxo. As duas linhagens citadas acima estariam representadas no 4º estado, em que há a produção de biomassa, lipídeos e outro metabólito em baixas proporções. O estado ideal para a produção lipídica seria o 3º, em que o carbono e nitrogênio consumidos são convertidos à biomassa e a uma quantidade maior de lipídeo, isto foi alcançado pelas linhagens UFMG-CM-Y6114, UFMG-CM-Y6189 e UFMG-CM-Y4187 nos ensaios a 25 °C com glicerol puro. O primeiro estado acontece quando a fonte de carbono acaba e a célula passa a degradar os lipídeos intracelulares produzidos por ela, isto não aconteceu em nenhum ensaio deste trabalho, já que o glicerol não foi totalmente consumido por nenhuma linhagem no tempo de ensaio.



**Figura 8.** Estados metabólicos de leveduras oleaginosas dependendo da espécie, linhagem e condições de cultivo.

A largura das setas é proporcional à concentração do fluxo. As setas de fonte de carbono e nitrogênio são de consumo pela levedura, e as demais de produção. No primeiro estado há o consumo de lipídeo. Fonte: Adaptado de (BEOPOULOS *et al.*, 2009).

A biomassa alcançou valores maiores a 15 °C, quando comparada aos ensaios a 25 °C em glicerol puro em todos os isolados, com exceção do UFMG-CM-Y6189. O contrário aconteceu com o rendimento lipídico, em que os valores foram maiores a 25 °C para todos os isolados. Enshaeieh e colaboradores (2013) testaram vários parâmetros de cultivo para otimização da produção de óleo por uma linhagem de *Candida* sp. e uma de *Y. lipolytica* a partir de glicose, sendo um dos fatores as temperaturas de 15, 25, 35 e 45 °C. Assim como no presente trabalho, a produção lipídica foi maior na temperatura de 25 °C nas duas leveduras, e a *Y. lipolytica* testada alcançou o conteúdo de 34,15%; o menor rendimento foi obtido à 35 °C.

*Y. lipolytica* é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura. As três linhagens UFMG-CM-Y6189, UFMG-CM-Y6114 e UFMG-CM-Y4187 apresentaram os melhores resultados de produção lipídica tanto na temperatura de 15 quanto de 25 °C em relação às demais linhagens. Entretanto, estas leveduras só foram capazes de produzir mais de 20% de conteúdo lipídico a partir do glicerol puro a 25 °C. Os valores de rendimento e conteúdo lipídicos das últimas duas leveduras não apresentaram diferenças significativas. Duas dessas linhagens foram selecionadas para os ensaios

em glicerol bruto a 25 °C, sendo essas o isolado da Antártica UFMG-CM-Y6189, que apresentou o melhor resultado, e a levedura de queijo UFMG-CM-Y6114. Os ensaios foram feitos com o mesmo meio de cultura e nas mesmas condições de cultivo, apenas havendo a substituição do glicerol puro pelo glicerol bruto residual de indústria de biodiesel. Não foi feito um ensaio em glicerol bruto na temperatura de 15 °C, pois os resultados mostraram que esta temperatura não favoreceu a acumulação lipídica nos isolados testados.

O glicerol bruto residual da indústria de biodiesel, que é produto da reação de transesterificação, pode apresentar composições variadas de nutrientes como cobre, magnésio, ferro, zinco potássio, sódio, cloro e cálcio (DOBROWOLSKI *et al.*, 2016), além de peptídeos, proteínas e fontes adicionais de nitrogênio (POLI *et al.*, 2014). Isto pode ter sido a justificativa para o valor de biomassa ter sido maior no cultivo com glicerol bruto para os dois isolados testados (UFMG-CM-Y6189,  $9,40 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$  e UFMG-CM-Y6114,  $8,74 \pm 0,46 \text{ g.L}^{-1}$ ) quando comparado ao crescimento em glicerol puro (UFMG-CM-Y6189,  $8,35 \pm 0,30 \text{ g.L}^{-1}$  e UFMG-CM-Y6114,  $6,78 \pm 0,29 \text{ g.L}^{-1}$ ). Entretanto, o crescimento da biomassa não foi acompanhado pelo aumento na produção lipídica (UFMG-CM-Y6189,  $1,89 \pm 0,24 \text{ g.L}^{-1}$  contra  $2,87 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$  no glicerol puro; e UFMG-CM-Y6114,  $1,39 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$  contra  $1,98 \pm 0,24 \text{ g.L}^{-1}$ ). Isso pode ser explicado pelo fato de que a taxa C/N, que é crucial para o acúmulo lipídico, é provavelmente mais baixa no glicerol bruto quando comparada ao glicerol puro. A presença dos minerais e nutrientes no glicerol bruto pode ter promovido a divisão celular e com isso reduziu a produção lipídica (KUTTIRAJA *et al.*, 2016). Devido à combinação de uma maior biomassa e menor rendimento lipídico em glicerol bruto, o conteúdo lipídico também foi menor nas duas leveduras. Nos ensaios de Duarte e colaboradores (2013) com uma linhagem oleaginosa de *Candida* sp., o cultivo em glicerol bruto também resultou em uma maior biomassa comparado ao cultivo em glicerol puro. No isolado da Antártica, a troca do glicerol puro pelo bruto proporcionou uma redução no conteúdo lipídico de 37,3% ( $34,38\% \pm 2,15$  no glicerol puro e  $21,56\% \pm 1,01$  no bruto). No isolado de queijo a diminuição foi de 45,8%, pois o conteúdo lipídico foi de  $29,30\% \pm 4,12\%$  no glicerol puro para  $15,88\% \pm 0,54$  no glicerol bruto. Essa redução no conteúdo lipídico também aconteceu nos experimentos realizados por Poli e



colaboradores (2014), em que o isolado QU21 (=UFMG-CM-Y327) apresentou maior crescimento celular no glicerol bruto, e o mesmo rendimento lipídico, que resultou em uma diminuição de 37,2% no conteúdo lipídico, em relação ao cultivo em glicerol puro. Outros estudos com linhagens de *Y. lipolytica* também obtiveram menores rendimento e conteúdo lipídicos quando o glicerol puro foi substituído pelo bruto (Sestric *et al.*, 2014; Dobrowolski *et al.*, 2016).

A levedura da Antártica foi capaz de consumir a mesma quantidade de glicerol puro ( $60,7 \pm 1,8 \text{ g.L}^{-1}$ ) e bruto ( $61,31 \pm 1,38 \text{ g.L}^{-1}$ ), já a UFMG-CM-Y6114 consumiu  $48,52 \pm 2,00 \text{ g.L}^{-1}$  do glicerol puro e  $60,0 \pm 3,1 \text{ g.L}^{-1}$  do bruto. No trabalho de Sestric e colaboradores (2014), a taxa de consumo de ambos os substratos pela *Y. lipolytica* ATCC 20460 foi similar mas o cultivo no resíduo gerou resultados de produção lipídica um pouco melhores.

Kuttiraja e colaboradores (2016) testaram diversas concentrações de glicerol bruto e taxas C/N e alcançaram uma biomassa muito maior do que os valores obtidos neste estudo, sendo que o valor máximo alcançado pela linhagem *Y. lipolytica* SKY7 foi de  $22,62 \text{ g.L}^{-1}$ , no meio com  $112,5 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol e taxa C/N igual a 25. Os autores concluíram que quanto menor a taxa C/N, maior o valor de biomassa obtido. Dobrowolski e colaboradores (2016) também alcançaram maiores valores de biomassa pela linhagem *Y. lipolytica* A101 usando uma taxa de C/N menor. A taxa C/N utilizada nos ensaios com glicerol puro do presente trabalho foi de 184; como a concentração de glicerol no meio com o resíduo bruto foi de  $92,0 \text{ g.L}^{-1}$  e existem fontes adicionais de nitrogênio no glicerol bruto, conseqüentemente a taxa C/N foi menor nos ensaios utilizando o glicerol residual. Essa redução na taxa C/N pode ter sido a causa dos maiores valores de biomassa no cultivo em glicerol bruto, quando comparados ao puro.

Kuttiraja e colaboradores (2016) obtiveram menores valores de rendimento lipídico ( $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) usando a taxa C/N de 25 e um rendimento maior ( $6,66 \text{ g.L}^{-1}$ ) com a taxa C/N de 100. Os autores concluíram que taxas C/N maiores que 50 favorecem o acúmulo lipídico devido à alterações no metabolismo celular causadas por baixas taxas de N no meio.

O isolado de queijo UFMG-CM-Y327 deste trabalho foi o mesmo utilizado por Poli e colaboradores (2014), entretanto foram obtidos resultados diferentes nos dois

estudos. No estudo de Poli e colaboradores, em apenas 4 dias de cultivo a 28 °C em glicerol puro, a levedura obteve  $4,92 \pm 0,68 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa,  $1,48 \pm 0,27 \text{ g.L}^{-1}$  de rendimento e 30,1% de conteúdo lipídico. Enquanto que no presente trabalho, com 12 dias de cultivo o rendimento lipídico alcançado pela mesma linhagem foi menor ( $0,87 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$ ) e combinado ao alto valor de biomassa ( $6,37 \pm 0,20 \text{ g.L}^{-1}$ ), resultou em um baixo conteúdo lipídico ( $13,58\% \pm 1,72$ ). Apesar de ambos os estudos apresentarem muitas semelhanças quanto às condições de cultivo (mesmas temperaturas, rotação de 150 rpm, volumes do Erlenmeyer e de meio, composição do meio e taxa C/N), as diferenças nos resultados podem ter sido causadas pelas diferentes metodologias usadas na extração lipídica, principalmente na etapa de rompimento celular.

Entretanto, ao comparar os resultados da levedura UFMG-CM-Y6189 em glicerol puro com os resultados citados acima obtidos por Poli e colaboradores (2014), a levedura da Antártica obteve maiores valores de biomassa ( $8,35 \pm 0,30 \text{ g.L}^{-1}$ ), rendimento ( $2,87 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$ ) e conteúdo lipídico ( $34,38\% \pm 2,15$ ). O isolado UFMG-CM-Y6189 também apresentou melhores resultados no glicerol bruto em comparação ao isolado QU21 (=UFMG-CM-Y327) testado no mesmo substrato. Enquanto UFMG-CM-Y6189 alcançou  $8,81 \pm 0,19 \text{ g.L}^{-1}$  em peso seco,  $1,9 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$  em rendimento e  $21,56\% \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$  em conteúdo, produziu  $6,7 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa,  $1,27 \text{ g.L}^{-1}$  de rendimento e 18,9% de conteúdo de óleo. Entretanto, os resultados do isolado UFMG-CM-Y327 se referem à 4 dias de cultivo, enquanto os melhores resultados de UFMG-CM-Y6189 foram obtidos no 12º dia de ensaio. Quanto ao consumo de glicerol, a linhagem UFMG-CM-Y327 consumiu  $21,2 \pm 5,0 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol puro e  $23,1 \pm 2,8 \text{ g.L}^{-1}$  do bruto em quatro dias de cultivo, enquanto UFMG-CM-Y6189 consumiu  $24,21 \pm 3,49 \text{ g.L}^{-1}$  do glicerol puro e  $29,89 \pm 3,97 \text{ g.L}^{-1}$  do bruto no mesmo tempo de cultivo.

Os resultados de conteúdo lipídico da UFMG-CM-Y6189 foram semelhantes aos obtidos por Dobrowolski e colaboradores (2016), com relação à linhagem de *Y. lipolytica* A101 testada em glicerol residual de indústria de biodiesel, com 80% de conteúdo de glicerol (similar ao usado neste trabalho). A linhagem A101 alcançou valores de biomassa e rendimento menores do que a levedura da Antártica ( $6,63 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,32 \text{ g.L}^{-1}$ ), mas o conteúdo lipídico foi semelhante (19,9%). O rendimento de óleo por lipídeo produzido pela A101 em glicerol bruto foi de  $0,03 \text{ g.g}^{-1}$ , o mesmo valor foi obtido pela

UFMG-CM-Y6189 no resíduo bruto. No estudo de Dobrowolski e colaboradores (2016), glicerol de diversas indústrias de biodiesel e sabão foram testados, e concluiu-se que os resultados de biomassa e produção de óleo variam de acordo com a origem do glicerol e sua composição. As composições variadas do glicerol são devido às diferentes matérias-primas e reagentes usados no processo de transesterificação do biodiesel (UPRETY; VENKATESAGOWDA; RAKSHIT, 2017).

Outro estudo (CANONICO *et al.*, 2016) obteve resultados melhores em comparação com a levedura da Antártica. A linhagem de *Y. lipolytica* 347 alcançou 32,6%, 1,29 g.L<sup>-1</sup> e 4,0 g.L<sup>-1</sup> de conteúdo, rendimento e biomassa, respetivamente, usando uma taxa C/N de 36 e 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Mas em condições semelhantes às usadas no presente trabalho (90 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto, C/N: 145), os resultados obtidos foram próximos aos resultados de UFMG-CM-Y6189, sendo 19,7% de conteúdo, 1,79 g.L<sup>-1</sup> de rendimento e 9,0 g.L<sup>-1</sup> de biomassa.

Chatzifragkou e colaboradores (2011) obtiveram apenas 6,8% de conteúdo lipídico e 0,51 g.L<sup>-1</sup> de rendimento com a linhagem *Y. lipolytica* LFMB 19; a limitação de nitrogênio no meio resultou na produção de compostos extracelulares (4,5 g.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 3,5 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético e 1,5 g.L<sup>-1</sup> de manitol), ao invés de provocar o acúmulo lipídico. Pode ser que o mesmo tenha acontecido com as linhagens que tiveram baixas produções lipídicas no presente trabalho, mas não houve a busca por esses compostos extracelulares.

O acúmulo lipídico acontece ao final da fase exponencial do crescimento, quando o N é escasso do meio (PROBST *et al.*, 2016), entretanto, esse padrão não foi observado na linhagem UFMG-CM-Y6189, tanto no glicerol puro quanto no bruto. O isolado começou a produzir óleo mas a biomassa continuou aumentando ao longo dos dias de ensaio. Mas para se estudar com mais precisão as fases de crescimento e de acumulação lipídica seria necessário relizar um ensaio mais longo e com mais análises ao longo dos dias, inclusive nas primeiras 96 horas de cultivo. A capacidade de produzir lipídeos durante a fase de crescimento é uma vantagem para a produção industrial pois isso encurtaria o tempo de produção e tornaria possível a utilização de substratos ricos em nitrogênio (SITEPU *et al.*, 2013).

Em algumas pesquisas (Sitepu *et al.*, 2013; Poli *et al.*, 2014) os ensaios de acumulação lipídica foram feitos em apenas 96 horas; mas assim como o presente estudo, outras pesquisas (Chatzifragkou *et al.*, 2011; Dourou *et al.*, 2017), realizam as extrações de óleo das leveduras ao longo de mais dias e isto parece ser favorável quando a concentração inicial de substrato é alta, visto que tanto a biomassa, quanto o rendimento e o conteúdo lipídico tendem a aumentar ao longo dos dias de cultivo. Isto pode ser percebido no presente estudo e nos artigos de Chatzifragkou e colaboradores (2011). Se a concentração inicial de fonte de carbono for baixa e o ensaio for longo, ao longo dos dias as leveduras irão consumir todo o substrato e começarão a metabolizar os lipídeos intracelulares produzidos por elas para se manterem viáveis.

A metodologia utilizada na extração lipídica tem grande influência no rendimento lipídico obtido e ainda não existe uma metodologia capaz de extrair 100% do óleo presente nas células. Em outro trabalho de Poli e colaboradores (2013), várias linhagens de leveduras isoladas de queijo foram coradas com o corante vermelho de Nilo e visualizadas no microscópio de fluorescência. A linhagem *Yarrowia lipolytica* QU21 (=UFMG-CM-Y327) foi selecionada para a realização da extração lipídica, pois as gotas lipídicas intracelulares ocupavam mais de 50% da área celular; entretanto a extração dos lipídeos resultou em apenas 26,5% de conteúdo lipídico. Portanto, a quantidade de óleo extraída quase sempre é bem menor do que a quantidade real presente nas células. A dificuldade em se extrair todo o óleo presente nas células de levedura pode ser explicada pela presença de uma parede celular espessa, que prejudica o rompimento celular e a ação dos solventes. Além disso, há várias etapas da extração (rompimento celular, filtração, transferência de vidraria) em que pode haver perda de óleo e de células. Melhores resultados de acúmulo lipídico poderiam ser alcançados não somente otimizando as condições de cultivo, mas também a metodologia de rompimento celular e extração lipídica. Inclusive, a utilização de técnicas de extração que utilizassem menores volumes de solventes seriam mais ideais, por serem mais ecologicamente corretas devido à redução na geração de resíduos, além de reduzirem os custos de produção.

A tabela 7 apresenta os resultados de biomassa, rendimento e conteúdo lipídico de diversos artigos que testaram a produção lipídica por linhagens selvagens de *Y.*

*lipolytica* a partir de glicerol puro ou bruto, em condições semelhantes às do presente trabalho.

**Tabela 7.** Comparação dos resultados apresentados por diferentes artigos, em ensaios com linhagens de *Y. lipolytica* selvagens em Erlenmeyers, com temperaturas entre 25-28 °C.

<b>Linhagem de <i>Y. lipolytica</i></b>	<b>Biomassa (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimento lipídico (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Conteúdo lipídico (%)</b>	<b>Referência</b>
LFMB 19 <sup>b</sup>	6,2	0,51	6,8	Chatzifragkou <i>et al.</i> (2011)
QU21 <sup>a</sup>	4,92	1,48	30,1	Poli <i>et al.</i> (2014)
QU21 <sup>b</sup>	6,7	1,27	18,9	Poli <i>et al.</i> (2014)
SM7 <sup>b</sup>	17,9	8,00	44,8	Magdouli; Brar; Blais (2017)
ATCC 20460 <sup>a</sup>	6,0	1,86	31,0	Sestric <i>et al.</i> (2014)
ATCC 20460 <sup>b</sup>	6,5	0,75	11,6	Sestric <i>et al.</i> (2014)
SM7 <sup>b</sup>	8,7	2,7	30,8	Magdouli <i>et al.</i> (2017)
A101 <sup>a</sup>	7,98	2,06	25,8	Dobrowolski <i>et al.</i> (2016)
A101 <sup>b</sup>	6,63	1,32	19,9	Dobrowolski <i>et al.</i> (2016)
347 <sup>b</sup>	4,0	1,29	32,6	Canonico <i>et al.</i> (2016)
LGAM S(7)1 <sup>b</sup>	8,1	3,5	43,0	Papanikolaou; Aggelis (2002)
UFMG-CM-Y6189 <sup>a</sup>	8,35	2,87	34,38	Este trabalho
UFMG-CM-Y6189 <sup>b</sup>	8,81	1,9	21,56	Este trabalho

<sup>a</sup> Ensaio com glicerol puro

<sup>b</sup> Ensaio com glicerol bruto

## 7.2. Análise dos perfis graxos

O perfil graxo do biodiesel é idêntico ao perfil do óleo que o originou e pequenas mudanças no perfil graxo dos óleos resultam em grandes mudanças nas propriedades do biodiesel (KNOTHE, 2008). Fatores como o tamanho da cadeia, número e posição das insaturações possuem grande importância na qualidade do biodiesel a ser produzido (PATEL *et al.*, 2017). A mesma linhagem de levedura pode produzir óleos com perfis diferentes, de acordo com mudanças nas condições de cultivo e isso pôde ser observado no presente trabalho. A caracterização do perfil graxo produzido por cada linhagem de levedura é importante para determinar se o óleo possui potencial em ser transformado em biodiesel, ou se os ácidos graxos presentes possuem outras importâncias industriais ou nutricionais.

A variação do perfil graxo dos isolados, tanto no glicerol puro quanto no bruto parece estar mais associada às mudanças nas condições de cultivo (fonte de carbono e temperatura), do que às diferentes linhagens de *Y. lipolytica*. Ou seja, em uma mesma temperatura as linhagens produziram óleos com perfis bastantes semelhantes; mas quando os perfis graxos de uma mesma levedura foram comparados aos outros ensaios com condições diferentes, estes apresentaram maiores variações. Isso também foi observado por Sitepu e colaboradores (2013), que afirmam que linhagens da mesma espécie produzem óleos com perfis graxos bem semelhantes, nas mesmas condições de cultivo. Em todos os ensaios e linhagens, mais de 95% do total de ácidos foi composto por ácidos graxos com 16 e 18 carbonos, o mesmo foi observado por Polburee e colaboradores (2015) e Chatzifragkou e Papanikolaou (2012). Uma grande concentração de ácidos com 16 ou 18 carbonos é desejada na produção do biodiesel (JIRU *et al.*, 2017).

O aumento da temperatura do cultivo em glicerol puro de 15 para 25 °C proporcionou um aumento na composição de ácidos saturados e uma diminuição na quantidade de ácidos insaturados em todas as cinco leveduras testadas. No cultivo a 15 °C, os ácidos saturados variaram entre 13,2 e 18,1%, enquanto que a 25 °C, os mesmos ácidos variaram entre 24,5 e 31,7%. Isso está de acordo com os resultados obtidos por Jiru e colaboradores (2017), onde temperaturas muito altas ou muito baixas

em relação à temperatura de crescimento ideal da levedura, afetaram o crescimento celular e a acumulação lipídica por uma linhagem oleaginosa de *Rhodotorula kratochvilovae*. Além disso, a redução na temperatura de cultivo resulta em uma mudança na composição lipídica, com um aumento nos níveis de ácidos graxos insaturados e de cadeia curta. Sitepu e colaboradores (2014) também afirmam que o aumento da temperatura resulta em mais ácidos saturados.

Foram analisadas amostras de óleo extraídas dos cinco dias de análise das leveduras UFMG-CM-Y6189 e UFMG-CM-Y6114 cultivadas em glicerol bruto, com o objetivo de se analisar a cinética dos ácidos graxos ao longo de todo o ensaio. Entretanto, observou-se nos dois isolados que as quantidades de cada ácido presente alteraram pouco ao longo dos dias. O mesmo foi observado por Sestric e colaboradores (2014), em que as proporções de cada ácido produzidas pela linhagem *Y. lipolytica* ATCC 20460 se mantiveram similares ao longo das 120 horas de análise, nos ensaios com diferentes meios e fontes de carbono.

Os principais ácidos graxos produzidos pelo isolado UFMG-CM-Y6189 em glicerol puro foram o oleico (C18:1) (52,6%), palmítico (C16:0) (18,4%), palmitoleico (C16:1) (13%), esteárico (C18:0) (7,6%) e linoleico (C18:2) (5,3%). Quando o glicerol puro foi trocado pelo bruto, a composição se alterou para oleico (C18:1) (50%), palmítico (C16:0) (22,4%), esteárico (C18:0) (11,2%), palmitoleico (C16:1) (9,2%) e linoleico (C18:2) (5,4%); estes valores são referentes aos óleos do 12º dia de cultivo. Os dois principais ácidos, oleico e palmítico continuaram sendo os principais componentes, e as suas porcentagens variaram pouco com a mudança de glicerol. O perfil graxo da linhagem *Y. lipolytica* 347 foi muito parecido com o da levedura Antártica, com a diferença que não houve produção do ácido C18:2 na linhagem 347 (CANONICO *et al.*, 2016).

Os ácidos graxos produzidos pela linhagem UFMG-CM-Y6189 foram agrupados em ácidos saturados, MUFA e PUFA, apresentando em média 35,3%, 59,5% e 5,2%, respectivamente, para cada grupo. Dobrowolski e colaboradores (2016) obtiveram proporções semelhantes de ácidos saturados, MUFA e PUFA em relação à levedura da Antártica. Entretanto, a linhagem *Y. lipolytica* A101 cultivada em glicerol bruto residual de indústria de biodiesel produziu uma maior taxa de ácidos PUFA, sendo 26,6% de

saturados, 53,7% de MUFA e 13,6% de PUFA; isso se deveu à maior porcentagem do ácido linoleico (C18:2) (DOBROWOLSKI *et al.*, 2016).

Os ácidos graxos predominantes, que estavam presentes em todas as amostras analisadas foram oleico (C18:1), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0) e linoleico (C18:2). Sendo que o ácido oleico (C18:1) foi o principal ácido graxo produzido por todas as linhagens, em todos os ensaios, variando entre 48,7 e 67,6%. Esses resultados vão de acordo com os obtidos por vários pesquisadores (Sitepu *et al.*, 2013; Poli *et al.*, 2014; Cheirsilp; Louhasakul, 2013; Sestric *et al.*, 2014; Dobrowolski *et al.*, 2016). Estes também são os ácidos mais presentes em alguns óleos vegetais, como o de canola e de girassol (SITEPU *et al.*, 2014).

A maioria das linhagens, estudadas no presente trabalho, possui provavelmente a enzima dessaturase que introduz uma ligação dupla ao carbono 9 da cadeia do ácido graxo, isso justificaria a alta incidência dos ácidos oleico (C18:1) e palmítico (C16:1) nos óleos microbianos deste trabalho. Além disso, os ácidos graxos não são aleatoriamente distribuídos na molécula de glicerol para formar o triacilglicerol; mais de 65% dos ácidos ligados à primeira posição do triacilglicerol são os ácidos oleico (C18:1) e palmítico (C16:0), o que também explicaria a alta ocorrência desses ácidos na maioria das leveduras (SARGEANT; JENKINS; CHUCK, 2017).

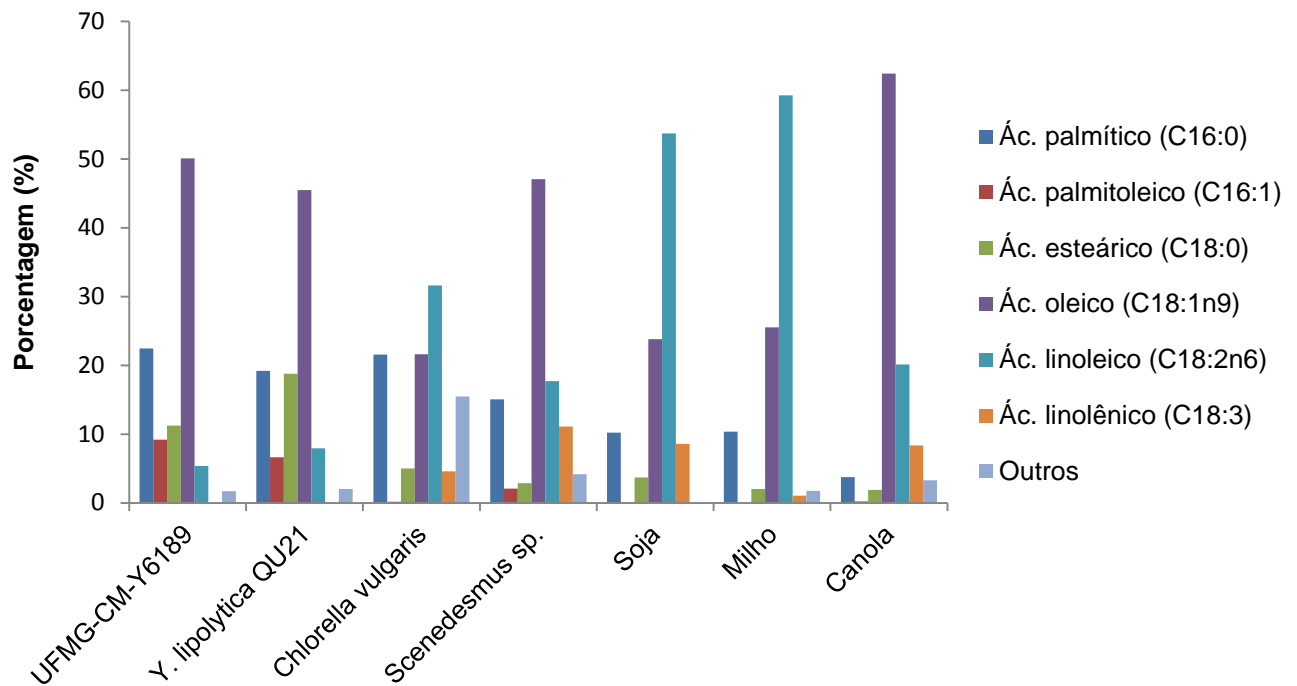
A alta taxa de ácido oleico (C18:1), juntamente com as baixas quantidades de ácidos PUFA são duas características importantes em um óleo para se obter um biodiesel de qualidade (SITEPU *et al.*, 2013). Essas características foram obtidas por todas as leveduras testadas, em todos os ensaios. Particularmente, UFMG-CM-Y6189 testada em glicerol bruto produziu em média 49,4% de ácido oleico e apenas 5,2% do total de ácidos poli-insaturados. Uma baixa taxa de ácidos PUFA é desejada na produção de biodiesel porque os ácidos poli-insaturados possuem baixos pontos de fusão, número de cetano e estabilidade oxidativa, que são características indesejáveis em um biodiesel (KNOTHE, 2008). Já o ácido oleico (C18:1) em grandes proporções é importante, pois este ácido atende a vários padrões de qualidade exigidos em um bom biodiesel. Além disso, os padrões de qualidade europeus EN14214 exigem menos de 12% de ácido linolenico (C18:3) e menos de 1% de ácidos com mais de 4 insaturações



(SHARMA *et al.*, 2016). Estes foram encontrados apenas em concentrações mínimas nas amostras de óleo analisadas no presente trabalho.

Na figura 9 são mostrados dos dados relativos às porcentagens dos principais ácidos graxos dos óleos extraídos de duas espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp.), da soja, da linhagem QU21 (=UFMG-CM-Y327) de *Y. lipolytica* e da linhagem UFMG-CM-Y6189 (presente estudo), cultivadas em glicerol bruto. Como dito anteriormente, os perfis dos ácidos graxos das *Y. lipolytica* UFMG-CM-Y6189 e QU21 (=UFMG-CM-Y327) (resultados obtidos por POLI *et al.*, 2014) são bastante semelhantes. Já os perfis das duas microalgas aqui representadas possuem mais divergências. *Scenedesmus* sp. apresenta uma alta quantidade de ácido oleico (C18:1) (47,05%) (CHOI; YU, 2015), que se aproxima do conteúdo das duas leveduras, mas representa mais do que o dobro da porcentagem do mesmo ácido na alga *C. vulgaris* (21,6%) (SHARMA *et al.*, 2016). Apesar da soja apresentar somente cerca de 20% de conteúdo de óleo, este é o vegetal mais utilizado na produção de biodiesel no mundo, seguido pelo óleo de milho. Estes óleos vegetais apresentam valores de ácido oleico (C18:1) mais baixos do que as duas leveduras (23,8% na soja e 25,5% no milho) e altos valores de ácido linoleico (C18:2) (53,7% e 59,3%, respectivamente) (Ramos *et al.*, 2017; Uprety; Dalli; Rakshit, 2017), o que resulta na produção de biodieseis com baixa estabilidade à oxidação. Na linhagem UFMG-CM-Y6189 o ácido linoleico (C18:2) representa apenas 5,4% do total.

O óleo de canola possui o maior conteúdo de ácido oleico (C18:1) dentre os óleos mostrados na figura 9 (62,41%). Já o ácido linolênico (C18:3) está presente em todos os óleos em porcentagens menores do que 12%, com excessão das leveduras, onde ele não aparece.



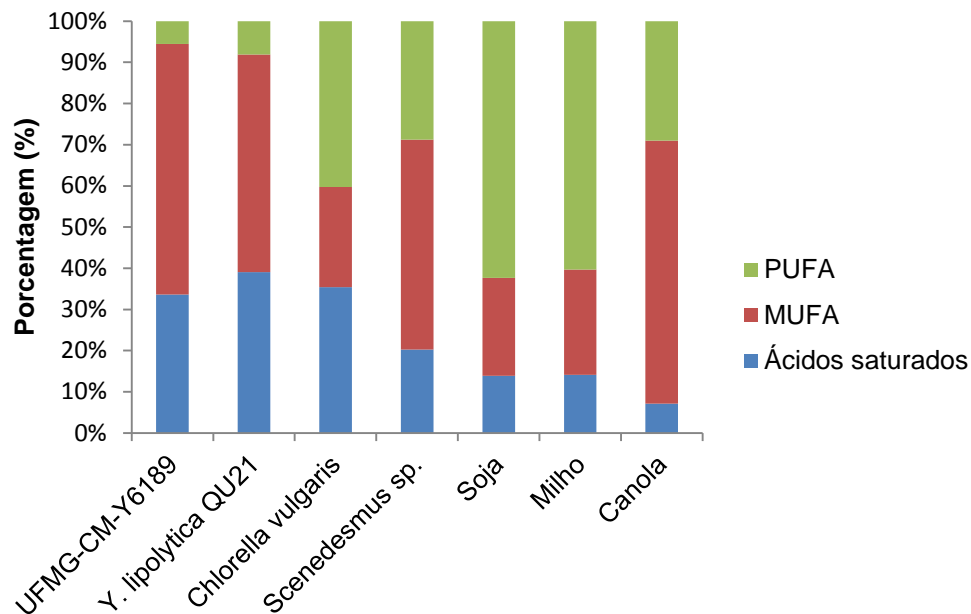
**Figura 9.** Porcentagens dos principais ácidos graxos presentes nos óleos da linhagem UFMG-CM-Y6189 cultivada em glicerol bruto, *Y. lipolytica* QU21 (=UFMG-CM-Y327)<sup>a</sup>, das microalgas *Chlorella vulgaris*<sup>b</sup> e *Scenedesmus* sp.<sup>c</sup>, e dos óleos vegetais: soja<sup>d</sup>, milho e canola<sup>e</sup>.

Fonte: <sup>a</sup>Poli *et al.* (2014); <sup>b</sup>Sharma *et al.* (2016); <sup>c</sup>Choi; Yu (2015); <sup>d</sup>Ramos *et al.* (2017); <sup>e</sup>Uprety; Dalli; Rakshit (2017).

A figura 10 mostra uma comparação das proporções de ácidos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados dos mesmos óleos da figura 9. Pode-se observar que as microalgas apresentam quantidades muito maiores de ácidos poli-insaturados quando comparadas à *Y. lipolytica* e aos óleos de leveduras em geral, sendo que *C. vulgaris* apresenta 36,1% e *Scenedesmus* sp. 28,8% de PUFA, respectivamente (Sharma *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2015).

Os óleos de soja, milho e canola também produzem grandes quantidades de PUFA, sendo que a soja e o milho apresentam perfis semelhantes, com 62,3% e 60,3% de PUFA e 23,8% e 25,5% de MUFA, respectivamente (Ramos *et al.*, 2017; Uprety *et al.*, 2017). A combinação de altas concentrações de ácidos PUFA e baixas concentrações de MUFA observada nos óleos de soja e milho acaba gerando um biodiesel com baixa estabilidade oxidativa, baixo número de cetano e baixo ponto de entupimento de filtro a frio. Isto pode acarretar problemas no seu armazenamento e

transporte, influenciando negativamente a sua comercialização (STANSELL; GRAY; SYM, 2012). Problemas como estes são ajustados através da mistura do biodiesel com grandes proporções de diesel de petróleo e com o uso de aditivos (RAMOS *et al.*, 2017). Os perfis das duas linhagens de levedura são os que apresentam as maiores porcentagens de ácidos MUFA e as menores de PUFA, duas características importantes para certificar um biodiesel de boa qualidade; sendo que o óleo do isolado UFMG-CM-Y6189 apresentou uma concentração um pouco maior de ácidos MUFA e menor de PUFA, quando comparado ao isolado QU21 (=UFMG-CM-Y327) de Poli *et al.* (2014).



**Figura 10.** Porcentagens dos ácidos saturados, monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) presentes nos óleos da linhagem UFMG-CM-Y6189 cultivada em glicerol bruto, *Y. lipolytica* QU21 (=UFMG-CM-Y327)<sup>a</sup>, das microalgas *Chlorella vulgaris*<sup>b</sup> e *Scenedesmus sp.*<sup>c</sup>, e dos óleos vegetais: soja<sup>d</sup>, milho e canola<sup>e</sup>.

Fonte: <sup>a</sup>Poli *et al.* (2014); <sup>b</sup>Sharma *et al.* (2016); <sup>c</sup>Choi; Yu (2015); <sup>d</sup>Ramos *et al.* (2017);

<sup>e</sup>Uprety; Dalli; Rakshit (2017).

Algumas espécies de micro-organismos oleaginosos produzem ácidos com valores nutricionais e farmacêuticos, como os ácidos ômega-3; por exemplo os ácidos EPA (C20:5) e DHA (C22:6). Estes apresentam benefícios à saúde humana contra doenças cardiovasculares, câncer e Alzheimer. Estudos afirmam que a inclusão do DHA na dieta de bebês garante um desenvolvimento normal (UPRETY; VENKATESAGOWDA; RAKSHIT, 2017). Os ácidos do grupo ômega-6 também

possuem valor nutricional; e como ambos os grupos não são sintetizados por mamíferos, eles devem ser obtidos por meio da dieta alimentar. Alguns desses ácidos estão muito presentes em peixes, portanto a obtenção desses PUFA de outras fontes seria de grande interesse para vegetarianos. Os isolados deste trabalho não produziram, ou produziram quantidades insignificantes destes ácidos de importante valor nutricional.

A composição dos ácidos graxos dos isolados testados neste trabalho é similar à dos óleos vegetais utilizados na produção de biodiesel. Tanto nas leveduras quanto nos vegetais, existe uma predominância dos ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0). O isolado *Y. lipolytica* UFMG-CM-Y6189 apresentou o melhor resultado de rendimento e conteúdo lipídico em glicerol bruto dentre as leveduras testadas; e um perfil graxo com grandes quantidades de ácido oleico e menos de 5% de ácidos poli-insaturados, o que é favorável na produção de um biodiesel que atenda aos padrões de qualidade. Portanto, o isolado da Antártica poderia ser utilizado como uma matéria-prima na produção de biodiesel de 3ª geração. A partir desses resultados, sugere-se mais experimentos com a linhagem UFMG-CM-Y6189 a fim de testar diversas condições de cultivo que favoreçam o acúmulo lipídico a partir de resíduos, como o glicerol bruto, como substrato.

## 8. CONCLUSÃO

Nos ensaios com glicerol puro na temperatura de 25 °C, três das cinco linhagens de *Yarrowia lipolytica* testadas foram capazes de produzir mais de 20% de conteúdo lipídico, sendo essas UFMG-CM-Y6114 (29,30% ± 4,12; isolada de queijo), UFMG-CM-Y4187 (26,95 % ± 4,68; isolada da areia de uma praia do Paraná), e UFMG-CM-Y6189 (34,38 % ± 2,15; isolada da Antártica). Os resultados de rendimento e conteúdo lipídico a 25 °C foram maiores do que nos ensaios a 15 °C. Estes resultados mostram que a temperatura é um fator muito importante a ser considerado no estudo de acúmulo de óleos por leveduras, pois dependendo da temperatura utilizada, uma linhagem pode ser considerada oleaginosa ou não.

A composição dos ácidos graxos dos lipídeos das cinco linhagens não apresentou variações significativas dentro de uma mesma temperatura de cultivo na presença do glicerol puro. Entretanto, entre as duas temperaturas testadas houve algumas alterações nas proporções dos principais ácidos graxos presentes, que resultou em uma maior concentração de ácidos monoinsaturados e menor concentração de ácidos saturados a 15 °C; quando comparados à temperatura de 25 °C. Portanto, a temperatura pode influenciar no tipo e proporções de ácido graxo produzido por uma linhagem de levedura.

Todas as linhagens produziram mais de 50% de ácido oleico (C18:1) e menos de 7% de ácidos poli-insaturados, sendo propícias para a produção de biodieseis, atendendo os padrões de qualidade exigidos pela indústria.

Das duas linhagens testadas no glicerol bruto residual da indústria de biodiesel, a linhagem *Y. lipolytica* UFMG-CM-Y6189 apresentou os melhores resultados de rendimento e conteúdo lipídico e foi capaz de acumular 21,56% e produzir 1,9 g.L<sup>-1</sup> de óleo, partir do consumo de 61,3 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto. Os lipídeos dessa linhagem foram compostos por em média 59,5% de ácidos graxos monoinsaturados, sendo que o ácido oleico foi predominante, com composição média de mais de 49% dos ácidos totais. Essas características são desejáveis para a produção de um biodiesel de qualidade. Portanto os lipídeos da linhagem UFMG-CM-Y6189 podem ser considerados potenciais matérias-primas para a produção de biodiesel a partir de glicerol bruto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJANOVIC, A. Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices? *Energy*, v. 36, n. 4, p. 2070–2076, 2011.

ANDRÉ, A. *et al.* Biotechnological conversions of bio-diesel derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences*, v. 9, n. 6, p. 468–478, 2009.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E B. *Dados estatísticos*. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

ANP (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS). *Resolução Nº 45*. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=274064>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

ATABANI, A. E. *et al.* A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 4, p. 2070–2093, 2012.

BEOPOULOS, A. *et al.* *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 48, n. 6, p. 375–387, 2009.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 4, p. 1193–1206, 2011.

BRITISH PETROLEUM. BP Statistical Review of World Energy 2017. *British Petroleum*, n. 66, p. 1–52, 2017.

CANONICO, L. *et al.* Conversion of raw glycerol to microbial lipids by new *Metschnikowia* and *Yarrowia lipolytica* strains. *Annals of Microbiology*, v. 66, n. 4, p. 1409–1418, 2016.

CHATZIFRAGKOU, A. *et al.* Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, v. 36, n. 2, p. 1097–1108, 2011.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 95, n. 1, p. 13–27, 2012.

CHEIRSILP, B.; LOUHASAKUL, Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 329–337, 2013.

- CHEN, Y. H.; WALKER, T. H. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnology Letters*, v. 33, n. 10, p. 1973–1983, 2011.
- CHOI, H. J.; YU, S. W. Influence of crude glycerol on the biomass and lipid content of microalgae. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, v. 29, n. 3, p. 506–513, 2015.
- CHRISTIE, W. W. Gas chromatography and lipids: A practical guide. *Phytochemistry*, v. 28, n. 11, p. 3251–3252, 1989.
- CHRISTOPHE, G. *et al.* Recent developments in microbial oils production: A possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 55, n. 3, p. 29-46, 2012.
- DARVISHI, F. *et al.* *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 127, p. 87–96, 2017.
- DOBROWOLSKI, A. *et al.* Efficient conversion of crude glycerol from various industrial wastes into single cell oil by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, v. 207, p. 237–243, 2016.
- DOUROU, M. *et al.* Storage lipid and polysaccharide metabolism in *Yarrowia lipolytica* and *Umbelopsis isabellina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 101, n. 19, p. 7213–7226, 2017.
- DUARTE, S. H. *et al.* Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. *Bioresource Technology*, v. 138, p. 377–381, 2013.
- DUJON, B. *et al.* Genome evolution in yeasts. *Nature*, v. 430, n. 6995, p. 35–44, 2004.
- EGERMEIER, M. *et al.* Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. JAN, p. 1–9, 2017.
- ENSHAEIEH, M.; ABDOLI, A.; NAHVI, I. Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using *Yarrowia lipolytica* M7 and *Candida* sp. *Journal of Cell and Molecular Research*, v. 5, n. 1, p. 17–23, 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- FICKERS, P. *et al.* Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, v. 5, n. 6-7, p. 527–543, 2005.

- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.
- GOUDA, M. K.; OMAR, S. H.; AOUAD, L. M. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 9, p. 1703–1711, 2008.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, v. 1, n. 3, p. 533, 1985.
- JIN, M. *et al.* Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: Feasibility and challenges. *Trends in Biotechnology*, v. 33, n. 1, p. 43–54, 2015.
- JIRU, T. M. *et al.* Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn, *Rhodosporidium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. *3 Biotech*, v. 7, n. 2, p. 1–11, 2017.
- KERSCHER, S. *et al.* The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comparative and Functional Genomics*, v. 2, n. 2, p. 80–90, 2001.
- KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia*, v. 9, p. 274–282, 2011.
- KNOTHE, G. “ Designer ” Biodiesel : Optimizing Fatty Ester Composition to Improve Fuel Properties †. p. 1358–1364, 2008.
- KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, v. 86, n. 10, p. 1059–1070, 2005.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th editio ed. Amsterdã: Elsevier, 2011.
- KUTTIRAJA, M. *et al.* Elucidating the Effect of Glycerol Concentration and C/N Ratio on Lipid Production Using *Yarrowia lipolytica* SKY7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 180, n. 8, p. 1586–1600, 2016.
- LEIVA-CANDIA, D. E. *et al.* The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel*, v. 123, p. 33–42, 2014.
- LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, n. 5, p. 749–756, 2008.



- LIANG, M. H.; JIANG, J. G. Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research*, v. 52, n. 4, p. 395–408, 2013.
- LIU, H.-H.; JI, X.-J.; HUANG, H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1522–1546, 2015.
- MAGDOULI, S. *et al.* Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, v. 243, p. 57–68, 2017.
- MAGDOULI, S.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F. Morphology and rheological behaviour of *Yarrowia lipolytica* : Impact of dissolved oxygen level on cell growth and lipid composition. *Process Biochemistry*, p. 1-9, 2017.
- MAKINEN, K. K. Dietary prevention of dental caries by xylitol - Clinical effectiveness and safety. *Journal of Applied Nutrition*, v. 44, n. 1, p. 16–28, 1992.
- MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2006.
- MENG, X. *et al.* Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, v. 34, n. 1, p. 1–5, 2009.
- PAPANIKOLAOU, S. *et al.* Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, n. 1, p. 60–71, 2008.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single stage continuous culture. *Bioresource Technology*, v. 82, n. 1, p. 43–49, 2002.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, n. 8, p. 1031–1051, 2011.
- PATEL, A. *et al.* Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 77, n. April, p. 604–616, 2017.
- PINZI, S. *et al.* Multiple response optimization of vegetable oils fatty acid composition to improve biodiesel physical properties. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 15, p. 7280–7288, 2011.

- POLBUREE, P. *et al.* Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol. *Fungal Biology*, v. 119, n. 12, p. 1194–1204, 2015.
- POLI, J. S. *et al.* Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 11, n. 2, p. 203–208, 2013.
- POLI, J. S. *et al.* Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 161, p. 320–326, 2014.
- PROBST, K. V. *et al.* Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 36, n. 5, p. 942–955, 2016.
- QIN, L. *et al.* From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*, n. May, 2017.
- QUARTERMAN, J. *et al.* A survey of yeast from the *Yarrowia* clade for lipid production in dilute acid pretreated lignocellulosic biomass hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016.
- RAKICKA, M. *et al.* Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnology for biofuels*, v. 8, p. 104, 2015.
- RAMOS, L. P. *et al.* Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. *Revista Virtual de Química*, v. 9, n. 1, p. 317–369, 2017.
- RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, v. 86, n. 11, p. 807–815, 2004.
- REN21, R. E. P. N. FOR THE 21ST C. *Renewables 2017 Global Status Report*. . Paris: v.1, p. 29-35, 2017.
- SARGEANT, L. A.; JENKINS, R. W.; CHUCK, C. J. Biofuels and bioenergy. *Biofuels and bioenergy*. Chichester, UK: v. 1, p. 227–240, 2017.
- SAWIN, J. L.; SEYBOTH, K.; SVERRISSON, F. *Renewables 2016: Global Status Report*. v.1, p. 29-32, 2016.
- SEN, S.; GANGULY, S. Opportunities, barriers and issues with renewable energy development - A discussion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, n. May, p. 0–IDEM1, 2015.

SESTRIC, R. *et al.* Growth and neutral lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* on various carbon substrates under nutrient-sufficient and nutrient-limited conditions. *Bioresource Technology*, v. 164, p. 41–46, 2014.

SHARMA, A. K. *et al.* Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. *3 Biotech*, v. 6, n. 2, 2016.

SILVEIRA, B. I. *Produção de Biodiesel - Análise e Projeto de Reatores Químicos*. 1<sup>a</sup>. ed. São Paulo: biblioteca24horas, 2011.

SITEPU, I. R. *et al.* Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 360–369, 2013.

SITEPU, I. R. *et al.* Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, v. 32, n. 7, p. 1336–1360, 2014.

SOUZA, W. R. DE. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. *InTech*, p. 207–248, 2013.

STANSELL, G. R.; GRAY, V. M.; SYM, S. D. Microalgal fatty acid composition: Implications for biodiesel quality. *Journal of Applied Phycology*, v. 24, n. 4, p. 791–801, 2012.

THEVENIEAU, F.; NICAUD, J.-M. Microorganisms as sources of oils. *Ocl*, v. 20, n. 6, p. D603, 2013.

UÇKUN KIRAN, E.; TRZCINSKI, A.; WEBB, C. Microbial oil produced from biodiesel by-products could enhance overall production. *Bioresource Technology*, v. 129, p. 650–654, 2013.

UPRETY, B. K.; DALLI, S. S.; RAKSHIT, S. K. Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities. *Energy Conversion and Management*, v. 135, p. 117–128, 2017a.

UPRETY, B. K.; VENKATESAGOWDA, B.; RAKSHIT, S. K. Current Prospects on Production of Microbial Lipid and Other Value-Added Products Using Crude Glycerol Obtained from Biodiesel Industries. *Bioenergy Research*, v. 10, n. 4, p. 1117–1137, 2017.

VORAPREEDA, T. *et al.* Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: Involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology*, v. 158, n. 1, p. 217–228, 2012.

YANG, F.; HANNA, M. A; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for biofuels*, v. 5, n. 1, p. 13, 2012.

ZLATANOV, M. *et al.* Biomass production by Antarctic yeast strains: An investigation on the lipid composition. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, v. 24, n. 4, p. 2096–2101, 2010.