

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

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE LISE CELULAR DAS LEVEDURAS
Yarrowia lipolytica QU21 e *Meyerozyma guilliermondii* BI281 PARA EXTRAÇÃO
DE ÓLEO MICROBIANO**

CARINA ALVES TIMOTHEO

Orientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Valente da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Marco Antônio Zachia Ayub

Porto Alegre
Abril/2018

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

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE LISE CELULAR DAS LEVEDURAS
Yarrowia lipolytica QU21 e *Meyerozyma guilliermondii* BI281 PARA EXTRAÇÃO
DE ÓLEO MICROBIANO**

Carina Alves Timotheo
Bacharel em Ciências Biológicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Industrial

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Patrícia Valente da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Marco Antônio Zachia Ayub

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Abril/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Alves Timotheo, Carina
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE LISE CELULAR DAS LEVEDURAS
Yarrowia lipolytica QU21 e Meyerozyma guilliermondii
BI281 PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO MICROBIANO / Carina Alves
Timotheo. -- 2018.

28 f.

Orientadora: Patrícia Valente da Silva.

Coorientadora: Marco Antônio Zachia Ayub.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. óleo microbiano. 2. lipídeos. 3. leveduras
oleaginosas. 4. lise celular. I. Valente da Silva,
Patrícia, orient. II. Zachia Ayub, Marco Antônio,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“In the long history of humankind (and animal kind, too) those who learned
to collaborate and improvise most effectively have prevailed.”

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Miriam Alves e Leovaldo Timotheo, obrigada pelo suporte e pelo esforço para construção do meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus avôs Marlene e Cláudio Alves, que mesmo com suas dificuldades, não mediram esforços para me ajudar.

À minha orientadora, Patrícia Valente, obrigada pela confiança e por ter me orientado e apoiado para a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Marco Antônio Záchia Ayub, que abriu as portas do seu laboratório e desde o início me apoiou na realização deste trabalho.

À minha irmã Camila Timotheo pela dedicação, paciência e carinho.

À minha amiga, Gabriele Gross, que foi um dos presentes que o mestrado me deu, obrigada pelo apoio e amizade.

À minha amiga, Thais Sobanski, que mesmo morando longe não mediu esforços para me ajudar e me apoiar sempre.

Aos meus amigos e à todas as pessoas especiais que direta ou indiretamente me apoiaram e estiveram ao meu lado ao longo de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, por toda ajuda e amizade.

Às bolsistas Bruna Côrrea, Audren Monteiro e Renata Ott, obrigada por me acompanharem e ajudarem no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente (PPGMAA), pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE LISE CELULAR DAS LEVEDURAS
Yarrowia lipolytica QU21 e *Meyerozyma guilliermondii* BI281 PARA EXTRAÇÃO
DE ÓLEO MICROBIANO**

Autor: Carina Alves Timotheo

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Patrícia Valente da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Marco Antônio Zachia Ayub

RESUMO

O interesse por leveduras oleaginosas tem crescido muito nos últimos anos, principalmente pela possibilidade do potencial renovável do uso do óleo microbiano para diversas finalidades tais como a produção de biocombustíveis e a aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Entretanto, as metodologias para lise celular e extração do óleo são consideradas etapas críticas e determinantes para a produção em escala industrial. Portanto, este projeto tem por objetivo avaliar diferentes metodologias para a lise celular para a extração de lipídeos das leveduras *Yarrowia lipolytica* QU21 e *Meyerozyma guilliermondii* BI281, selecionadas previamente. As duas cepas foram cultivadas em tanque biorreator de 5L em meio à base de glicose e sais inorgânicos, em 120 horas, agitação de 400 rpm e temperatura de 26 °C. Após o cultivo a biomassa gerada foi submetida a três pré-tratamentos (úmida, seca, liofilizada) e três processos diferentes de extração de lipídeos (Turrax, Sonicador e Braun e *bead milling*). O tratamento que apresentou o maior percentual de óleo foi a extração com o Sonicador ultrassônico 20% na BI281 em biomassa seca, seguida do Turrax 16% na QU21 em biomassa liofilizada, e o valor de rendimento lipídico menos expressivo foi a extração com o homogenizador Braun e *bead milling* 4% na BI281 nos três pré-tratamentos (úmida, seca, liofilizada).

Palavras-chave: leveduras oleaginosas, lipídeos, extração de lipídeos

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (28 p.) Abril, 2018.

EVALUATION OF CELL DISRUPTION METHODS IN YEAST *Yarrowia lipolytica* QU21 AND *Meyerozyma guilliermondii* BI281 FOR MICROBIAL OIL EXTRACTION

Author: Carina Alves Timotheo

Advisor: Prof. Dr. Patrícia Valente da Silva

Co-Advisor: Prof. Dr. Marco Antônio Zachia Ayub

ABSTRACT

The interest for oleaginous yeast has grown significantly in recent years, mainly due to the possibility of the renewable potential use of microbial oil for various purposes such as the production of biofuels and the applications in the pharmaceutical and food industries. However, the methodologies for cell lysis and lipids extraction are considered critical and determinant steps for industrial scale production. Therefore, this project aims to evaluate different methods for cell lysis for the oil extraction from *Yarrowia lipolytica* QU21 and *Meyerozyma guilliermondii* BI281, previously selected. The two strains were cultivated in a 5L bioreactor tank in glucose and inorganic salts medium for 120 hours, at 400 rpm and temperature of 26°C. After the cultivation the biomass was submitted to three pre-treatments (wet, dry, lyophilized) and three different lipid extraction processes (Turrax, Sonicador and Braun and bead milling). The treatment with the highest percentage of ruptured cells was the extraction with ultrasonic sonicator 20% in BI281 in dry biomass, followed by Turrax 16% in QU21 in lyophilized biomass, and the least expressive lipid yield was the extraction with the Braun homogenizer and bead milling 4% BI281 in the three biomass pre-treatments (wet, dry, lyophilized).

Key words: oleaginous yeast, lipids, lipids extraction

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (28 p.) April, 2018.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Óleo microbiano.....	4
3.2	Fontes Alternativas de Carbono para a Produção de Lipídeos.....	5
3.3	Aplicações do Óleo Microbiano.....	6
3.4	Leveduras Oleaginosas.....	7
3.5	Composição e Síntese de Lipídeos em Leveduras Oleaginosas.....	7
3.6	Métodos Existentes para Extração de Lipídeos Microbianos.....	8
4.	MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1	Microrganismos	10
4.2	Pré-inóculo.....	10
4.3	Determinação da Biomassa das Leveduras.....	10
4.4	Determinação das Condições de Extração.....	11
4.5	Homogeneizador Turrax.....	12
4.6	Sonicador Ultrassônico.....	12
4.7	Homogeneizador Celular Braun MSK e <i>bead milling</i>	13
4.8	Microscopia.....	13
4.9	Análise Estatística	13
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
6.	CONCLUSÃO	21
7.	PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	22
8.	REFERÊNCIAS	23

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Médias das concentrações de biomassa de cada levedura nos três pré-tratamentos.....	14
Tabela 2. Resultados obtidos a partir da extração de óleo nas linhagens BI281 e QU21 das concentrações de biomassa úmida, seca e liofilizada.....	15
Tabela 3. Relação do rendimento de lipídeos extraídos % (p/p) com os diferentes métodos de extração em cada levedura (BI281 e QU21) nos três pré-tratamentos de biomassa	17

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Experimento preliminar para avaliação do tempo de extração de óleo em cada aparelho.	12
Figura 2. Imagem de microscopia com epifluorescência (filtro verde) (A), mostrando as células rompidas da cepa BI281 após a extração com o Sonicador ultrassônico Qsonica (Q700).....	16
Figura 3. Comparação dos diferentes métodos de extração nos três tratamentos de biomassa em BI281 e QU21.....	16
Figura 4. Porcentagem do conteúdo de lipídeos extraídos com os diferentes métodos de extração nos três pré-tratamentos de biomassa em BI281 e QU21.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGS – Ácidos graxos sintetase
- CL – Corpos lipídicos
- CoA – Coenzima A
- CO₂ – Dióxido de carbono
- C/N – Razão carbono/nitrogênio
- EE – Ésteres de esteril
- GRAS- Geralmente reconhecido como seguro
- SCO – Single Cell Oil
- SH – Substância hidrofóbica
- TAG – Triacilglicerol

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muitas pesquisas com o intuito de explorar microrganismos oleaginosos têm sido realizadas, principalmente pela possibilidade do uso do óleo microbiano para diversas finalidades, tais como a produção de biocombustíveis e a utilização nas indústrias farmacêutica e alimentícia (Rosa *et al.*, 2015). As leveduras estão entre os microrganismos promissores que são capazes de acumular níveis elevados de lipídeos em seu peso seco (Gao *et al.*, 2013).

As leveduras são microrganismos que são conhecidos tradicionalmente por serem utilizados em processos fermentativos e muitas delas são capazes de produzir vários produtos de aplicação industrial simultaneamente ou após modificação das condições de cultivo, sendo consideradas verdadeiras fábricas celulares (Rosa *et al.*, 2015). Diferentes cepas já foram testadas como plataforma para a obtenção de oleoquímicos e outros produtos (Zhou *et al.*, 2016). Além disso, as leveduras oleaginosas poderiam ser implementadas como fábricas celulares em plantas de produção de bioetanol já existentes (Kavscek *et al.*, 2015).

Os óleos produzidos a partir de leveduras são principalmente lipídeos neutros (triacilgliceróis), glicolípideos, fosfolípideos e ácidos graxos livres (Dey e Maiti, 2013). As leveduras oleaginosas produzem óleos semelhantes aos óleos vegetais, porém estes microrganismos apresentam várias vantagens quando comparados com os óleos produzidos a partir de plantas, por exemplo, crescimento rápido em um curto período de tempo, são independentes de estação, clima e local, e não necessitam de vastas áreas para o seu cultivo e produção (Chemat *et al.*, 2017), sendo, portanto, uma fonte de óleo mais eficiente e sustentável.

A síntese de lipídeos e a acumulação de lipídeos intracelulares em leveduras têm sido estudadas para a elucidação dos mecanismos envolvidos nesses processos, assim como a identificação de genes de interesse relacionados ao metabolismo de lipídeos que possam ser alvos para o melhoramento da produção (Garay *et al.*, 2016, Zhu *et al.*, 2012).

Embora a obtenção de lipídeos produzidos por estes microrganismos seja considerada uma alternativa promissora, o custo elevado e as metodologias para lise celular e extração do óleo são considerados determinantes para a produção em escala industrial (Mendoza-López *et al.*, 2016).

As fontes de carbono, a recuperação da biomassa e a extração do óleo

microbiano são determinantes para redução dos custos operacionais de qualquer biorrefinaria baseada em óleo microbiano (Yousuf *et al.*, 2017). De um modo geral, a extração do óleo pode ser realizada por diversas metodologias tais como métodos mecânicos, métodos químicos ou uma combinação dos dois. Além disso, o óleo pode ser extraído da biomassa fresca ou seca (Poli *et al.*, 2014).

Portanto, esta dissertação teve por objetivo avaliar diferentes metodologias para a lise celular para a extração de óleo das leveduras *Yarrowia lipolytica* QU21 e *Meyerozyma guilliermondii* BI281, visando selecionar a metodologia que demonstrasse melhor rendimento de óleo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes metodologias de lise celular para a extração de óleo das leveduras *Yarrowia lipolytica* QU21 e *Meyerozyma guilliermondii* BI281, visando selecionar a metodologia que apresente melhor rendimento para futuro uso em escala industrial.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar processos de preparo da biomassa para posterior extração do óleo.

2.2.2 Avaliar diferentes as metodologias para rompimento da parede celular das leveduras, visando aumento do rendimento em óleo na escala ampliada.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Óleo microbiano

Os óleos e lipídeos são produzidos por todos organismos vivos pois são utilizados pelas células para funções essenciais e estruturais, tais como a formação de organelas e membranas semipermeáveis (Dowhan e Bogdanov, 2013). O óleo microbiano também é denominado como óleo de célula única (*Single cell oil-SCO*) produzido por microrganismos que são capazes de acumular de 20 até 80% de lipídeos de sua biomassa seca, incluindo microalgas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Ratledge e Wynn, 2002; Meng *et al.*, 2009).

O acúmulo de lipídeos em microrganismos depende da fisiologia, das condições nutricionais e ambientais, e da produção de metabólitos secundários. A geração de óleo microbiano começa durante o crescimento exponencial e segue durante a fase estacionária dependendo diretamente da fonte de carbono e da limitação de nutrientes no meio (Beopoulos *et al.*, 2011; Castanha *et al.*, 2014).

O interesse pelo uso dos óleos microbianos iniciou-se durante a Primeira e Segunda Guerras Mundiais, quando a Alemanha perdeu o acesso aos principais fornecedores de óleo vegetal, buscando então microrganismos oleaginosos como alternativa (Ratledge e Wynn, 2002). Entretanto, a busca e o desenvolvimento de lipídeos a partir de microrganismos diminuiu após o cessar da guerra em 1945, pois o custo para desenvolver estes era superior à produção e importação dos óleos de fontes vegetal e animal (Ratledge e Wynn, 1976; Ratledge e Wynn, 2002). Nos últimos anos, a busca por óleos microbianos para aplicações industriais voltou a crescer, principalmente pela promessa de ser uma alternativa mais sustentável ao uso de combustíveis fósseis. Além disso, sua exploração biotecnológica não compete com áreas destinadas para o cultivo de alimentos (Rosa *et al.*, 2015).

Um dos maiores empecilhos para a produção de SCO continua sendo o custo das fontes de carbono, por exemplo, a glicose que é a principal fonte de energia utilizada pelos microrganismos para produção de óleo, representando até 80% do custo total (Qin *et al.*, 2017). Para tornar a produção de óleo microbiano economicamente viável, a maneira mais interessante é a redução de custos utilizando materiais de baixo valor financeiro tais como os subprodutos/resíduos industriais como o soro de leite e glicerol bruto (Leesing e Baojungharn, 2011).

O aproveitamento de resíduos e subprodutos agroindustriais e a utilização de microrganismos oleaginosos capazes de produzir quantidades aceitáveis de lipídeos com composição semelhante à de óleos de alto valor agregado representam potencial para a produção de SCO em larga escala (Papanikolaou e Aggelis, 2011).

3.2 Fontes Alternativas de Carbono para a Produção de Lipídeos

Nas últimas décadas muitas pesquisas intensificaram-se na exploração de fontes de matérias-primas renováveis para amenizar problemas ambientais gerados pelos resíduos industriais e pelo uso de combustíveis fósseis. Os resíduos oriundos de processos agroindustriais são considerados fontes de baixo custo pois são matérias-primas secundárias que podem ser utilizadas para a produção de SCO (Gouda *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2015).

Os resíduos do processamento agroindustrial podem ser usados como substratos para a produção de SCO devido ao alto teor de açúcares. Os substratos, como o soro de leite, glicerol bruto e o melão têm sido investigados para o armazenamento lipídico em microrganismos oleaginosos. A acumulação de óleo geralmente é otimizada em proporção das taxas de carbono/nitrogênio (Banat, 2014; Martínez *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2017). Vários outros substratos renováveis, como o óleo de soja, podem atuar como nutrientes para o crescimento microbiano, assim como podem ser uma fonte importante de isolamento de potenciais microrganismos produtores de SCO (Banat, 2014; Martínez *et al.*, 2015; Athenaki *et al.*, 2018).

O soro de leite resultante da indústria de laticínios é considerado matéria-prima de baixo custo que também poderia ser usado como fonte para SCOs. O soro é o líquido remanescente após a precipitação e remoção de caseína do leite e sua composição varia de acordo com o processamento industrial pela qual o leite passa (Castanha *et al.*, 2014). Devido as características nutritivas, a valorização do uso do soro de leite vem sendo explorado como substrato de fermentação para conversão em biomassa microbiana para diferentes processos de fermentação visando a produção de biopolímeros, biossurfactante, ácido acético e SCOs (Akpınar-bayizit *et al.*, 2014; Castanha *et al.*, 2014; Pescuma *et al.*, 2015).

O glicerol residual derivado da indústria do biodiesel contém macro elementos, incluindo cálcio, potássio, enxofre e magnésio que podem ser convertidos por microrganismos em produtos como SCOs e biopolímeros (Qin *et al.*, 2017).

Muitas leveduras têm sido avaliadas como sendo capazes de converter

glicerol em lipídeos em um curto período (Garlapati *et al.*, 2016). A reutilização do glicerol residual pode servir como uma estratégia promissora para a redução de custos de cultivo de leveduras oleaginosas, assim como menor emissão de CO₂ durante a fermentação e menor concorrência direta com a produção de alimentos (Li *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2017). Segundo Signori *et al.* (2016), rendimento lipídico alcançado por leveduras que utilizam glicerol como substrato difere-se muito entre espécies e até cepas individuais.

O material lignocelulósico é outro subproduto agrícola, orgânico e abundante que pode ser utilizado para finalidades biotecnológicas. As fontes lignocelulósicas mais usadas e pesquisadas são o bagaço de cana, palha de milho, arroz, trigo, entre outros (Rabelo *et al.*, 2011). A composição da biomassa lignocelulósica consiste em três polímeros diferentes, celulose, hemicelulose e lignina, em teores diversificados dependendo da espécie vegetal (Qin *et al.*, 2017). Entretanto, a celulose e a hemicelulose são compostas por açúcares polimerizados que necessitam de pré-tratamento para serem hidrolisados em açúcares simples, tais como hexose e pentose. Portanto, o pré-tratamento da biomassa vegetal é primordial para sua utilização como fonte de açúcar fermentável para que os microrganismos possam produzir lipídeos de alta qualidade (Bandhu *et al.*, 2018). Muitos trabalhos vêm sendo realizados para elucidar a utilização rápida e simultânea de misturas de açúcar usando enzimas hidrolíticas e oxidativas para a bioconversão da biomassa lignocelulósica para SCO (Poontawee *et al.*, 2017; Qin *et al.* 2017).

3.3 Aplicações do Óleo Microbiano

A produção de SCOs demonstra um potencial enorme como fonte renovável para a produção de produtos oleoquímicos. O óleo microbiano pode ser usado na sua forma nativa ou convertido em uma variedade de produtos químicos, físicos e bioquímicos. Os SCOs podem ser utilizados nas indústrias de biocombustíveis, sabões, tintas, plásticos, detergentes, têxteis, borracha, biossurfactantes, lubrificantes, aditivos para alimentos, cosméticos entre outras aplicações (Probst *et al.*, 2015).

3.4 Leveduras Oleaginosas

As leveduras são particularmente interessantes para o desenvolvimento de

óleo microbiano devido a sua alta capacidade de síntese e acumulação de lipídeos intracelulares, chegando a níveis correspondentes a mais de 70% de sua biomassa. Além disso, os óleos produzidos pelas leveduras oleaginosas apresentam estrutura química semelhante aos óleos vegetais, tais como triglicerídeos saturados (Ratledge, 1988; Ratledge, 2002; Garay *et al.*, 2016).

Atualmente, os gêneros identificados como oleaginosos são: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodospodidium*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Trichosporonoides*, *Schizosaccharomyces* e *Meyerozyma* (Polburee *et al.*, 2015; Signori *et al.*, 2016). As leveduras oleaginosas são consideradas promissoras para a produção de combustíveis e oleoquímicos. As vantagens das leveduras oleaginosas para gerar SCOs estão na sua capacidade de crescimento rápido, alta produtividade de lipídeos, adaptação para produzir biomassa em biorreatores convencionais e a não concorrência com espaço e produção de alimentos, além da flexibilidade de expansão e facilidade de manipulação genética para posterior otimização em escala industrial (Tanimura *et al.*, 2014; Johnravindar *et al.*, 2017).

Entre as leveduras oleaginosas, a *Yarrowia lipolytica* é uma das mais estudadas, apresenta bom desempenho em fermentações de escala comercial e é bem conhecida por acumular alto teor de lipídeos em seu peso seco. Além disso, através da engenharia metabólica, a *Y. lipolytica* vem sendo manipulada para a construção de uma plataforma de produção versátil para converter lipídeos, gorduras e óleos em produtos de valor agregado (Ratledge *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2012; Shi e Zhao, 2017).

A *Meyerozyma guilliermondii* (anteriormente *Pichia guilliermondii*), é outra levedura previamente relatada como oleaginosa por Wang *et al.* (2012) e Ramírez-Castrillón *et al.* (2017). No trabalho realizado por Ramírez-Castrillón *et al.* (2017) a *M. guilliermondii* demonstrou possuir potencial para acumular lipídeos utilizando tanto glicose como glicerol como fontes de carbono, produzindo até 52,38% de lipídeos totais, sendo portanto uma fonte interessante para produção de óleo microbiano, especialmente para a produção de biodiesel.

3.5 Composição e Síntese de Lipídeos em Leveduras Oleaginosas

A síntese e acumulação de lipídeos em leveduras envolve dois processos metabólicos diferentes. A síntese de lipídeos “*de novo*” envolve a síntese de precursores de ácidos graxos, tais como acetil e malonil-CoA e seu alongamento

subsequente a um nível intermediário (C14-C16). Os graxos acil-CoA da via de biossíntese de armazenamento de lipídeos, se integram para formar triacilgliceróis (TAG) e ésteres de esteril (EE). Os lipídeos neutros são então estocados dentro dos corpos lipídicos (CL) para o armazenamento de energia. A síntese de ácidos graxos “*de novo*” em levedura é realizada pelo complexo enzimático de ácidos graxos sintetase (AGS) no citosol e requer o fornecimento constante de acetil-CoA e malonil-CoA (Beopoulos *et al.*, 2011).

A via “*ex novo*” envolve a quebra dos ácidos graxos, óleos e triaglicerídeos para posterior incorporação e armazenamento dentro da célula. Esta via exige a hidrólise de substrato hidrofóbico (SH) e incorporação / transporte dos ácidos graxos libertados sob a forma de tioésteres-CoA, que alimentam a via lipídica de armazenamento para gerar lipídeos neutros (Ratledge e Wynn, 2002; Beopoulos *et al.*, 2011).

Os ácidos graxos produzidos em ambas vias são esterificados usando moléculas de glicerol ou esterol para formar TAGs e EE e seus produtos finais formam as frações lipídicas da célula dentro dos CL (Ratledge, 2004; Beopoulos *et al.*, 2011).

3.6 Métodos Existentes para Extração de Lipídeos Microbianos

A extração de lipídeos microbianos é caracterizada por múltiplos passos de processamento que são intensivos em energia e tempo. Geralmente, o primeiro passo antes da extração é a secagem para remover a água. A secagem é um passo que demanda uso de energia, de modo que métodos alternativos que usam biomassa úmida e não seca podem ser utilizados para a redução de custos (Probst *et al.*, 2015).

Métodos desenvolvidos por Folch *et al.* (1957) e Bligh e Dyer (1959) são sistemas de drenagem líquido-líquido e são os mais utilizados e efetivamente baseados em laboratório. Originalmente foram desenvolvidos para tecidos de animais úmidos que usam clorofórmio, metanol e água para separar lipídeos de outras moléculas não lipídicas. Porém, o clorofórmio apresenta natureza tóxica e indesejável a processos de extração com o intuito de utilização de óleos comestíveis (Halim *et al.*, 2012; Probst *et al.*, 2015).

Logo a identificação de alternativas de outros solventes mais adequados pode ser vital em operações de escala comercial. Outra opção é o uso do dióxido de carbono supercrítico (CO₂) para extração renovável, pois o CO₂ é um solvente inerte, facilmente disponível e GRAS. Porém, a extração supercrítica com CO₂ representa

alto consumo de energia, o que torna este método caro e pouco atraente para processos em grande escala (Hegel *et al.*, 2011).

A maioria dos trabalhos publicados recentemente demonstra o uso de métodos de extração para microalgas oleaginosas, mas poucos trabalhos se concentraram no desenvolvimento de tecnologias para leveduras oleaginosas (Halim *et al.*, 2012). Em geral, as principais considerações na aplicação de tecnologias de extração são: o baixo custo reduzindo o uso de energia e a utilização de solventes renováveis que minimizem a geração de resíduos (Probst *et al.*, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

As leveduras testadas foram recuperadas de uma coleção de culturas de leveduras localizadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil). Foram utilizadas *Yarrowia lipolytica* QU21 (Poli *et al.*, 2013) e a *Meyerozyma guilliermondii* BI281 (Ramírez-Castrillón *et al.*, 2017) que foram identificadas anteriormente pelo nosso grupo de estudo.

4.2 Pré-inóculo

A ativação das células das leveduras foi realizada em meio GYP (0,5% extrato de levedura, 2% glicose, 1% peptona) em frascos de Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de meio, durante 24h em *shaker* com rotação de 150 rpm e temperatura de 26 °C. O crescimento celular foi avaliado através de espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 660nm em absorbância de 1 g/L. Uma alçada do meio líquido (1×10^6 células) foi transferida para o pré-inóculo contendo o meio C (0,5% extrato de levedura, 0,7% KH_2PO_4 , 0,25% Na_2HPO_4 , 0,15 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,015% CaCl_2 , 0,002% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5% glicose) em pH 6, este mesmo meio foi usado para posterior fermentação em biorreator. Então, as leveduras foram cultivadas em biorreator de tanque agitado de 5L BIOSTAT B (B. Braun Biotech International, Alemanha) equipado com controle de temperatura, pH, agitação e aeração. O cultivo foi realizado durante 120 h e as condições de operação foram de 26 °C, agitação de 400 rpm, taxa de aeração de $10\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. O pH não foi controlado durante o processo e para evitar a formação de espuma foi adicionado $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de antiespumante (Antifoam 204, Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

4.3 Determinação da Biomassa das Leveduras

Para a análise gravimétrica da biomassa, após crescimento em biorreator as células de cada levedura foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL e centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e o *pellet* foi lavado duas vezes com água destilada. As células, então receberam três pré-tratamentos diferentes antes da extração do óleo. Algumas células foram mantidas úmidas/frescas, onde somente o sobrenadante foi retirado e o *pellet* conservado a -

80 °C. Outras amostras foram secas em estufa a 40 °C por 24h. E finalmente outras amostras de células de ambas leveduras foram liofilizadas (Liotop L 1001) a -30 °C durante 24h. A biomassa foi determinada usando uma balança analítica (Shimadzu AY220). Todos os experimentos foram realizados em triplicada.

4.4 Determinação das Condições de Extração

Uma mistura padrão de solventes foi determinada através da metodologia modificada de Bligh e Dyer (1959) e Folch *et al.* (1957), a biomassa foi suspensa em clorofórmio: metanol (2: 1, v / v) e a lise celular ocorreu usando vários processos de extração intensificados (Turrax, homogeneizador Braun com *bead milling* e ultrasonicação). Após cada extração, a mistura foi agitada em *shaker* durante 30 minutos a 150 rpm e foi feita uma diluição adicional com 1:1 de clorofórmio e sulfato de sódio anidro 1,5%. Então, a biomassa foi separada do solvente com centrifugação 5000 rpm durante 5 minutos, a camada aquosa superior contendo metanol, água e compostos não lipídicos foi descartada e a camada inferior foi recuperada utilizando pipeta de Paster, filtrada em papel de filtro Whatman contendo 1,0 g de sulfato de sódio anidro e recolhida em frascos pré-pesados. A fase inferior recolhida e a evaporação dos solventes foi realizada em evaporador rotatório a 60°C por 24 h. O peso lipídico extraído foi medido usando balança analítica (Shimadzu AY220). Foram determinados o rendimento lipídico como concentração (g / L) e o teor lipídico como porcentagem do peso lipídico em relação ao peso da biomassa. Cada extração foi realizada em triplicada. Além disso, o tempo para cada aparelho foi determinado em um experimento preliminar conforme mostrado na Figura 1 abaixo, sendo definido como tempo padrão extração de seis minutos em cada aparelho.

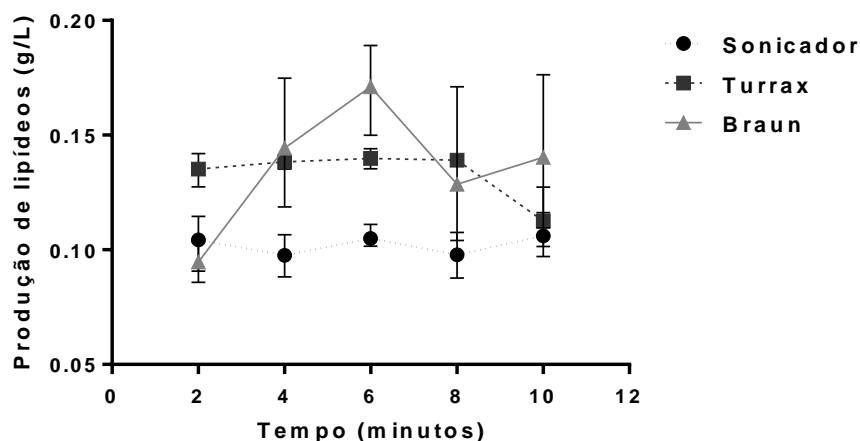


Figura 1. Experimento preliminar para avaliação do tempo de extração de óleo em cada aparelho.

4.5 Homogeneizador Turrax

Após 120h de cultivo em biorreator, as amostras de ambas leveduras foram transferidas para tubos de falcon (50 mL) e centrifugadas a 5000 rpm em uma centrífuga refrigerada por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensa na mistura padrão de solventes, clorofórmio/ metanol (2:1, v/v). A lise celular foi realizada com o homogeneizador Turrax (BASIC ULTRA-TURRAX T18; IKA), com ciclos de homogeneização durante 6 minutos a 4000 rpm e arrefecimento com gelo a cada 2 min para evitar o aquecimento da amostra.

4.6 Sonicador Ultrassônico

Após 120h de cultivo em biorreator, as amostras de ambas leveduras foram transferidas para tubos de falcon (50 mL) e centrifugadas a 5000 rpm em uma centrífuga refrigerada por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensa na mistura padrão de solventes, clorofórmio/metanol (2:1, v/v). Então, as amostras foram submetidas a extração assistida por ultrassom realizada usando o Sonicador ultrassônico (Qsonica, Sonicator Ultrasonic Processor Q700) por 6 minutos com pulsos de 60 segundos e 60 segundos de pausa a frequência de 30 kHz. Os frascos com as amostras foram mantidos em gelo durante todo o processo de extração para evitar o aquecimento dos lipídeos.

4.7 Homogeneizador Celular Braun MSK e *bead milling*

Após 120h, o cultivo foi transferido para tubos de falcon (50 mL) e centrifugado a 5000 rpm em uma centrífuga refrigerada por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensa na mistura padrão de solventes, clorofórmio/ metanol (2:1, v/v) e um volume de 0,3 g de microesferas de vidro (*bead milling*, diâmetro 200 mm) foi adicionado. As amostras foram submetidas à lise celular com o Braun homogeneizador celular (MSK 953030, B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemanha) por 6 minutos com pausa de 2 em 2 minutos para que o frasco com a amostra fosse refrigerada em gelo para evitar o aquecimento dos lípideos. Após a extração, as microesferas de vidro (*bead milling*) foram separadas cuidadosamente da amostra antes da separação por centrifugação.

4.8 Microscopia

Para a verificação da lise celular após a extração usando os três diferentes métodos, as células foram centrifugadas em 3000 rpm e lavadas duas vezes com água destilada para a observação em microscópio óptico Olympus CX 40, com as objetivas de 40X e 100x. As amostras foram observadas em microscópio de marca BEL Photonics INV-100 FL Plus com sistema de Epi-Fluorescência (MF) com filtros Azul, Verde, Violeta e Ultravioleta, e equipado com câmera CCD Blacklight. O material foi examinado usando objetiva de 10X e de 20X com luz reduzida e filtro verde para a observação da ruptura celular.

4.9 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5 % de significância utilizando o software Prism6 –Graph Pad.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microrganismos oleaginosos têm sido objeto de várias pesquisas nas últimas décadas. O óleo microbiano é interessante principalmente pela possibilidade de substituição de óleos de origem animal e vegetal e pode ser utilizado para diversas finalidades, tais como a produção de biocombustíveis e a utilização nas indústrias farmacêutica e alimentícia (Ratledge, 2002; Rosa *et al.*, 2015). As leveduras oleaginosas são particularmente atrativas para o desenvolvimento de pesquisas devido a sua alta capacidade de síntese e acumulação de lipídeos intracelulares (Beopoulos *et al.*, 2011; Garay *et al.*, 2016).

Neste estudo, a média de rendimento da biomassa foi de 0,79 g.L⁻¹ para *Yarrowia lipolytica* QU21 e de 0,9 g.L⁻¹ para *Meyerozyma guilliermondii* BI281 em biomassa fresca/úmida. Os valores de concentração das biomassas seca e liofilizada foram de 0,4 a 0,5 g.L⁻¹ para ambas linhagens (Tabela 1).

Tabela1. Médias das concentrações de biomassa de cada levedura nos três pré-tratamentos

	Biomassa Úmida (g.L ⁻¹)	Biomassa Seca (g.L ⁻¹)	Biomassa Liofilizada (g.L ⁻¹)
BI281	0,939	0,5361	0,4650
QU21	0,795	0,5201	0,4382

Concentrações de biomassa (úmida, seca, liofilizada) expressas em g.L⁻¹

O fato da biomassa fresca apresentar valores de concentração superiores deve-se a não retirada total da umidade que pode corresponder até 25% a mais do peso da amostra (Yellapu *et al.*, 2016). Além disso, os valores apresentados são referentes à biomassa recolhida em frascos de 50 mL para utilização nos ensaios para a lise celular das leveduras. Quando comparado com o rendimento total da produção nas condições de biorreator, os valores de biomassa correspondem a 8 e 18 g.L⁻¹ para BI281 e 8 e 15,8 g.L⁻¹ para QU21, respectivamente.

No presente trabalho, o cultivo em biorreatores foi realizado para se obter maior concentração de biomassa para possível aumento de produtividade de lipídeos para extração. Além disso, os diferentes tratamentos da biomassa (úmida, seca, liofilizada) antes da lise celular foram pensados com o intuito de minimizar custos relacionados a demanda de energia. Alguns estudos demonstram que a extração de

biomassa seca apresenta mais eficiência em comparação com a recuperação de lipídios de biomassa úmida, devido a presença de água influenciar na eficiência de processos de extração baseados em solventes, podendo reduzir a transferência de massa e aumentar a possível formação de emulsão (Dong *et al.*, 2016). Entretanto, a secagem ou desidratação (liofilização) da biomassa antes da extração é economicamente custosa para aplicações em larga escala (Yellapu *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2016).

A maior produção de lipídeos foi de 0,14 g.L⁻¹ obtida da extração com o sonicador ultrassônico a partir da biomassa seca de *M. guilliermondii* BI281 (Tabela 2 e Figura 2), apresentando diferença significativa ($p = < 0,0001$), pelo Teste de Tukey em nível de significância de 5%. O valor de rendimento lipídico menos expressivo foi resultante da extração com o homogenizador Braun e *bead milling* na mesma linhagem *M. guilliermondii* BI281, obtendo-se apenas 0,029 g.L⁻¹ de biomassa úmida (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2. Resultados obtidos a partir da extração de óleo nas linhagens BI281 e QU21 das concentrações de biomassa úmida, seca e liofilizada

	BI281 Sonicador (g.L ⁻¹)	BI281 Turrax (g.L ⁻¹)	BI281 Braun (g.L ⁻¹)	QU21 Sonicador (g.L ⁻¹)	QU21 Turrax (g.L ⁻¹)	QU21 Braun (g.L ⁻¹)
Úmida	0,095±0,034*	0,043±0,010	0,036±0,007	0,061±0,005	0,074±0,034	0,029±0,012
Seca	0,149±0,076**	0,042±0,004	0,030±0,002	0,037±0,005	0,060±0,009	0,036±0,002
Liofil.	0,042±0,021	0,081±0,001*	0,006±0,006	0,103±0,013*	0,075±0,005	0,031±0,010

Resultados das concentrações de lipídeos expressos em g.L⁻¹, com média ± desvio padrão; * ** representam os valores significativos pelo Teste de Tukey

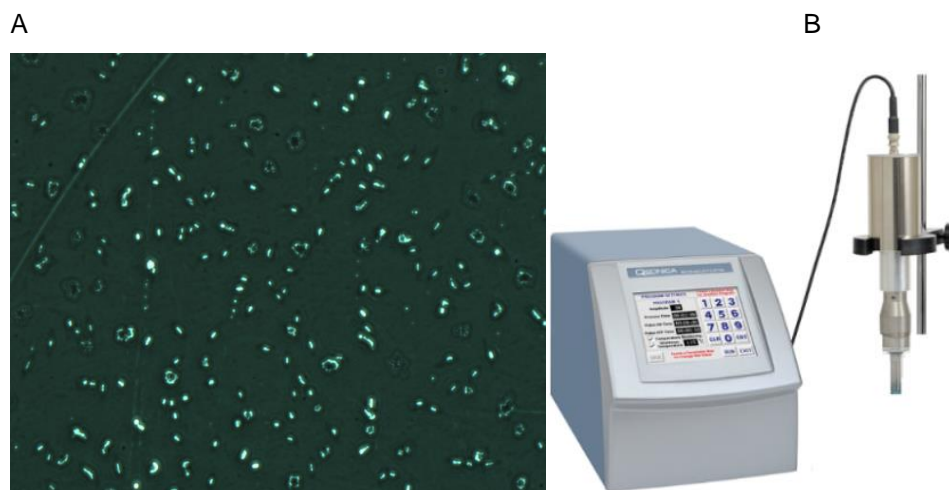


Figura 2. Imagem de microscopia com epifluorescência (filtro verde) (A), mostrando as células rompidas da cepa BI281 após a extração com o Sonicador ultrassônico Qsonica Q700 (B) em aumento de 20X.

A Figura 3 representa a média dos mesmos valores de produção de lipídeos nos diferentes métodos de extração apresentados na tabela 2, onde pode-se notar que o Sonicador foi o que obteve melhores rendimentos na ruptura de células para a liberação do óleo, seguido pelo método utilizando Turrax e o homogenizador Braun e *bead milling* que foi o que demonstrou menos eficiência de extração de todos os métodos aplicados. Zhang *et al.* (2014) já relataram em um estudo que ultrassonicação é uma das técnicas mais eficientes para a recuperação lipídica de *Y. lipolytica*.

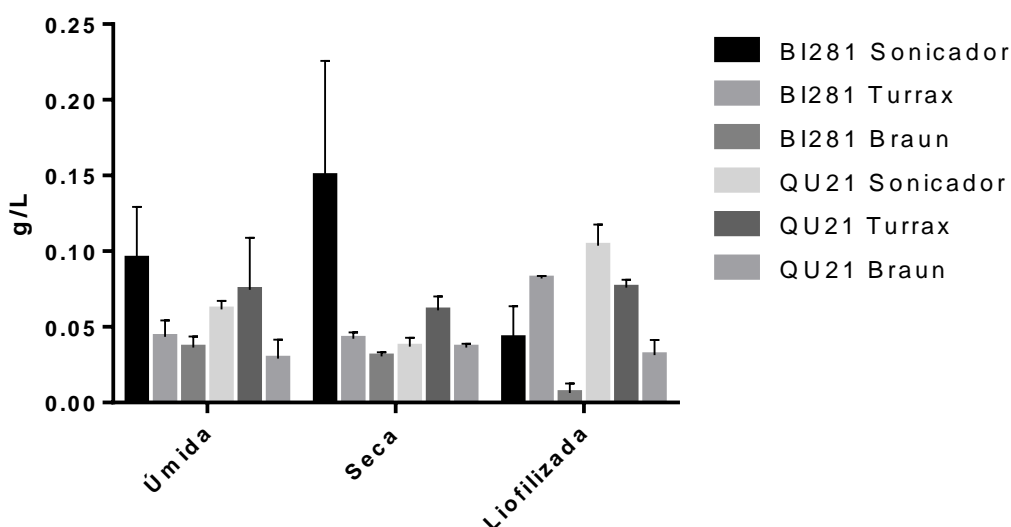


Figura 3. Comparação dos diferentes métodos de extração nos três tratamentos de biomassa em BI281 e QU21

Com relação ao teor de rendimento lipídico entre os diferentes métodos testados, o homogenizador celular Braun e *bead milling* foi o que apresentou os menores valores de produção de óleo, com os rendimentos equivalentes a 4% para BI281 e 6% para QU21, nos três pré-tratamentos de biomassa, enquanto que a extração com o Sonicador apresentou o maior rendimento 20% em BI281 em biomassa seca, seguido do processo com Turrax com produção lipídica de 16% em QU21 (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3. Relação do rendimento de lipídeos extraídos % (p/p) com os diferentes métodos de extração em cada levedura (BI281 e QU21) nos três pré-tratamentos de biomassa

Métodos de extração	Lipídeos BI281 (%)	Lipídeos QU21 (%)
SBU	9	13
SBS	20**	11
SBL	9	12
TBU	8	13
TBS	11	13
TBL	8	16*
BBU	4	6
BBS	4	6
BBL	4	6

SBU= Sonicador Biomassa Úmida, SBS= Sonicador Biomassa Seca, SBL= Sonicador Biomassa Liofilizada, TBU= Turrax Biomassa Úmida, TBS= Turrax Biomassa Seca, TBL= Turrax Biomassa Liofilizada, BBU= Braun Biomassa Úmida, BBS= Braun Biomassa Seca, BBL= Braun Biomassa Liofilizada. Resultados expressos em %; * e ** representam os valores significativos pelo Teste de Tukey

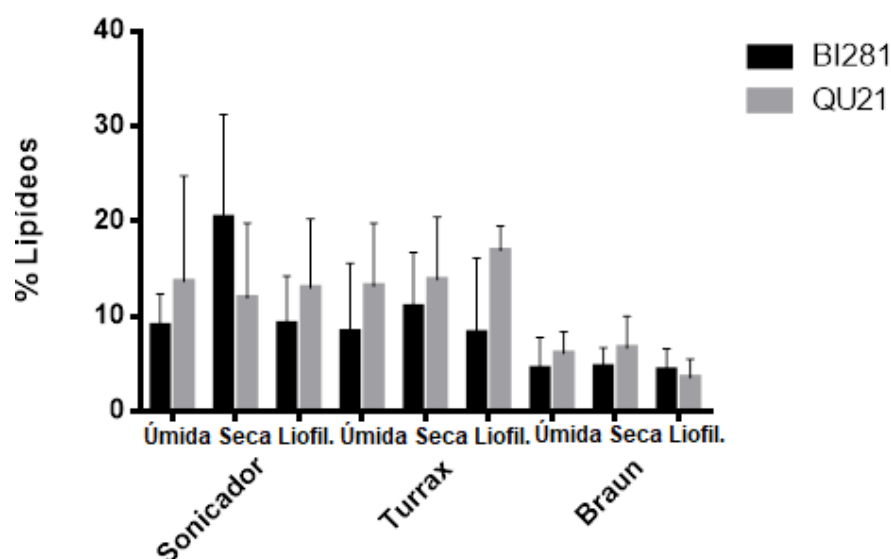


Figura 4. Porcentagem do conteúdo de lipídeos extraídos com os diferentes métodos de extração nos três tratamentos de biomassa em BI281 e QU21.

Castanha *et al.* (2012) analisaram o acúmulo de lipídeos em várias espécies de leveduras *Rhodotorula graminis*, *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus laurentii*, *Tricosporon sp.*, e *Lipomyces starkeyi* cultivadas em soro de queijo, onde o maior conteúdo obtido da produção de óleo a partir de biomassa seca foi em *Cryptococcus laurentii* 2,96 g.L⁻¹, correspondente a 14,63 % do rendimento de lipídeos totais. Em *Y. lipolytica*, os autores relataram o rendimento lipídico de 3,76 g.L⁻¹ correspondendo a apenas 2,41 % da biomassa seca, utilizando a técnica modificada de solventes Folch *et al.* (1957) e extração com maceração seguida de sonificador.

Meullemiestre *et al.* (2016) investigaram diferentes formas de extração de lipídeos em *Yarrowia lipolytica* para maximizar o rendimento da extração. Os autores testaram técnicas de extração semelhantes às usadas neste trabalho, incluindo ultrassonicação, Turrax com *bead milling* e microondas para intensificar a eficiência da recuperação de lipídios. Adicionalmente, vários pré-tratamentos foram aplicados, tais como congelamento / descongelamento, liofilização, *bead milling* e microondas para facilitar a ruptura da parede celular e liberação do óleo microbiano. Todos métodos também foram realizados com a mistura padrão de solventes (Bligh e Dyer, 1959; Folch *et al.*, 1957). Os resultados são semelhantes aos apresentados neste trabalho, onde a extração em biomassa liofilizada usando Turrax e *bead milling* representou o maior conteúdo de lipídeos 13,56%, seguida do sonificador 8,10% e microondas 7,13%. Os autores observaram ainda que a diferença de extração com microondas pode ser devida a uma degradação de lipídeos com as condições de calor empregadas durante o processo.

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa com cepas catalogadas e identificadas como oleaginosas em nossa coleção de leveduras localizada em nosso laboratório, os resultados obtidos por Poli *et al.* (2013) podem ser comparados com os encontrados neste trabalho. Os autores também utilizaram a mesma linhagem de *Yarrowia lipolytica* QU21, empregando o método de Folch *et al.* (1957) seguido de cinco métodos de extração diferentes. O maior rendimento de conteúdo lipídico foi de 26,5%, a extração foi com pré-tratamento da biomassa com nitrogênio líquido e maceração seguida de lise celular com sonificador. Nos processos

de lise celular com nitrogênio líquido e maceração, os valores corresponderam a 14,3 e 12,8% da biomassa. Em outro trabalho, Mattanna *et al.* (2014) relataram ótimos rendimentos da extração de óleos em linhagens de *Y. lipolytica* em meio glicose suplementado com peptona e/ou triptona, seguindo o método de extração de Bligh e Dyer, (1959) e lise celular com auxílio do Turrax. O rendimento lipídico da linhagem *Y. lipolytica* QU22 foi correspondente a um teor de 40,04%. Da mesma maneira, *Y. lipolytica* QU137 produziu conteúdo lipídico correspondendo a 40,30% da biomassa total seca. Utilizando glicerol e *Y. lipolytica*, Papanikolau e Aggelis (2002) realizaram um trabalho usando o processo de extração de acordo com Folch *et al.* (1957), produzindo um conteúdo de lipídeos equivalente a 43% da biomassa seca.

Em outros estudos realizados por Ramírez-Castrillón *et al.* (2017), a linhagem *Meyerozyma guilliermondii* BI281 também foi investigada para a produção de lipídeos, o cultivo foi realizado em meio contendo glicose mais glicerol, utilizando o método de extração de Bligh e Dyer (1959) e Turrax. Os rendimentos lipídicos resultaram em valores de 34,97% a 52,38% do peso seco da biomassa total.

Em um segundo trabalho Poli *et al.* (2014), utilizaram novamente a cepa *Yarrowia lipolytica* QU21, porém com cultivo em glicerol e extração com sonificador, obtendo produção de lipídeos de 30,1% da biomassa seca.

Nota-se que as condições de cultivo como fontes de carbono, disponibilidade de nitrogênio e as concentrações de minerais influenciam o acúmulo de lipídeos em leveduras oleaginosas (Ratledge e Wynn, 2002; Beopoulos *et al.*, 2011). Portanto, o óleo obtido a partir de diferentes espécies de leveduras oleaginosas pode ser influenciado de acordo com as diferentes condições de cultivo e do meio. Porém, a manipulação das condições de cultivo, como a fonte de carbono e de nitrogênio utilizadas, velocidade de agitação, pH e temperatura, não foram objetivos deste estudo.

A literatura relata que não existe um método de extração que seja 100% eficaz em rendimento de óleos oriundos de microrganismos (Jacob 1992, Ageitos *et al.*, 2011). A extração de lipídeos em leveduras é muitas vezes limitada pela resistência da parede celular, acessibilidade lipídica e transferência de massa. Além disso, a quantidade de biomassa pode interferir na extração de lipídeos, sendo necessários mais ciclos para o rompimento celular (Ageitos *et al.*, 2011). Portanto, a escolha do método e as estratégias de cultivo são muito importantes para obtenção de um melhor rendimento de óleo microbiano para uso futuro nos processos

biotecnológicos.

Através da análise e comparação dos resultados, é notável que o processo de extração de óleo em leveduras ainda exige muitos estudos tais como pré-tratamentos alternativos em que tornem a estrutura lipídica mais acessível, pois embora uma etapa prévia de ruptura celular possa acrescentar mais um passo ao processo, isso poderia minimizar o tempo e energia gastos em escala industrial (Meullemiestre *et al.*, 2016).

Ainda, cabe destacar que os resultados obtidos deste estudo em comparação com a literatura, mostram que os trabalhos futuros do nosso grupo de pesquisa devem continuar investigando o uso de fontes de carbono renováveis e abundantes, como o glicerol residual e o soro de leite para produção de lipídeos de leveduras oleaginosas. Visto que vários autores já relataram rendimentos satisfatórios de produção de óleo microbiano utilizando estas fontes, diminuindo assim os gastos com a utilização de glicose como matéria-prima e visando o uso de resíduos industriais em processos biotecnológicos de larga escala (Xu *et al.*, 2012; Ramírez-Castrillón *et al.* 2017).

6. CONCLUSÃO

Este trabalho teve foco a avaliação de diferentes métodos para produção e extração de lipídeos de duas leveduras oleaginosas, podendo-se concluir a partir dos resultados obtidos:

- Nos processos de pré-tratamento da biomassa (úmida, seca e liofilizada) não foi verificada diferenças de rendimento de óleo após a extração de lipídeos, demonstrando que a biomassa fresca/úmida pode ser usada para minimizar os custos da demanda de energia em escala industrial.

- A metodologia que apresentou maior eficiência para o rompimento da parede celular foi a extração com o Sonicador ultrassônico, seguida do processo com Turrax, e o valor de rendimento lipídico menos expressivo foi resultante da extração com o homogenizador Braun e *bead milling*. Apesar disso, o rendimento de óleo obtido após a extração de lipídeos foi considerado abaixo dos da literatura e maiores estudos são necessários para otimizar esta etapa.

7. Perspectivas de Trabalhos Futuros

Com base nos resultados obtidos, sugere-se algumas propostas para trabalhos futuros, tais como:

- A utilização de fontes de carbono alternativas como, por exemplo, resíduos industriais para redução de custos no processo de produção de óleos microbianos.

- A investigação quanto a outros pré-tratamentos de biomassa, bem como o aumento dos ciclos do processo de extração para aumentar a eficiência da lise celular para a liberação de lipídeos.

- A realização de mais estudos com as duas cepas *M. guilliermondii* BI281 e *Y. lipolytica* QU21, pois estas demonstram potencial para a aplicação industrial como fonte de óleo. Maiores estudos devem ser realizados para uma maior produção e otimização de óleo, manipulação genética, além de estudos de metabolismo e fisiologia celular, principalmente da *Meyerozyma guilliermondii* que ainda possui poucos trabalhos publicados na literatura.

8. REFERÊNCIAS

- Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo, P. et al. 2011. Oily Yeasts as Oleaginous Cell Factories. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90: 1219. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3200-z>.
- Akpinar-bayazit A, Ozcan T, Yilmaz-ersan L, & Basoglu F. 2014. Single cell oil (SCO) production by *Fusarium* species using cheese whey as a substrate. *Academic Journal*, 64(2), 111–118.
- Athenaki M, Gardeli C, Diamantopoulou P, Tchakouteu SS, Sarris D, Philippoussis A and Papanikolaou S. 2018. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *J Appl Microbiol*, 124: 336–367. doi:10.1111/jam.13633.
- Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R, Nyayanit NV. 2014. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front Microbiol*; 5:697. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697> PMID: 25566213; PubMed Central PMCID: PMC4264478.
- Bandhu S, Khot MB, Sharma T, Sharma OP, Dasgupta D, Mohapatra S, Hazra S, Khatri OP, and Ghosh D. 2018. Single Cell Oil from Oleaginous Yeast Grown on Sugarcane Bagasse-Derived Xylose: An Approach toward Novel Biolubricant for Low Friction and Wear. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 6 (1), 275-283. DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b02425.
- Beopoulos A, Nicaud JM, Gaillardin C. 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1193–1206.
- Bligh EG, and Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. doi: 10.1139/o59-099.
- Castanha RF, Mariano AP, de Moraes LAS, Scramin S, & Monteiro RTR. 2014. Optimization of lipids production by *Cryptococcus laurentii* 11 using cheese whey with molasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 379–387.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian, M, 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 34, 540-560.

- Dey P, Maiti MK. 2013. Molecular characterization of a novel isolate of *Candida tropicalis* for enhanced lipid production. *J. Appl. Microbiol.* 2013;114:1357–1368. doi: 10.1111/jam.12133.
- Dong T, Knoshaug EP, Pienkos PT, Laurens LML. 2016. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Appl. Energy*, 177, 879–895.
- Dowhan W, and Bogdanov M. 2013. “Functional roles of lipids in membranes,” in *Encyclopedia of Biophysics*, ed G. C. K. Roberts (Berlin; Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 868–875.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH, A simple method for the isolation and 2 purifications of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497-509.
- Garay LA, Sitepu IR, Cajka T, Chandra I, Shi S, Lin T, ... Boundy-Mills KL. 2016. Eighteen new oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(7), 887–900. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1765-3>.
- Garlapati VK, Shankar U, & Budhiraja A. 2016. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnology Reports*, 9, 9–14. <http://doi.org/10.1016/j.btre.2015.11.002>.
- Gao D, Zeng J, Zheng Y, Yu X, Chen S. 2013. Microbial lipid production from xylose by *Mortierella isabellina*. *Bioresour Technol*, 133, pp. 315-32.
- Gouda MK.; Omar SH.; Aouad, LM. 2008. Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes. *World J. Microb. Biotechnol.* 24, 1703–1711.
- Halim R, Danquah MK, Webley PA. 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. *Biotechnol Adv*, 30, 709–32.
- Hegel PE, Camy S, Destrac P, et al. 2011. Influence of pretreatments for extraction of lipids from yeast by using supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent. *J Supercrit Fluid*, 58, 68–78.
- Jacob Z. 1992. Yeast lipids: Extraction, quality analysis and acceptability. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 12: 463-491.
- Kavšček M, Stražar M, Curk T, Natter K, Petrovič U. 2015 Yeast as a cell factory: current state and perspectives. *Microb Cell Fact.* 2015; 14:94. doi: 10.1186/s12934-015-0281-x.

- Johnravindar D, Karthikeyan OP, Selvamn A, Murugesan K, Wong JWC. 2017. Lipid accumulation potential of oleaginous yeasts: A comparative evaluation using food waste leachate as a substrate. *Bioresour. Technol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.151>.
- Leesing R. AND Baojungharn R. 2011 Microbial oil production by isolated oleaginous yeast *Torulasporea globosa* YU5/2. *Eng. and Technol.*, v. 5, p. 04-23.
- Li C, Lesnik K, Liu H. 2013. Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. *Energies*, 6(9), 4739-4768.
- Mattanna, P., da Rosa, P. D., Gusso, A. P., Richards, N. S. P. S., and Valente, P. 2014b. Enhancement of microbial oil production by alpha-linolenic acid producing *Yarrowia lipolytica* strains QU22 and QU137. *Food Sci. Biotechnol.* 23, 1929–1934. doi: 10.1007/s10068-014-0263-5.
- Martínez EJ, Raghavan V, González-Andrés F, Gómez X. 2015. New Biofuel Alternatives: Integrating Waste Management and Single Cell Oil Production. Clark JH, ed. *International Journal of Molecular Sciences*;16(5):9385-9405. doi:10.3390/ijms16059385.
- Mendoza-López MR, Velez-Martínez D, Argumedo-Delira R et al. 2016 Lipid Extraction from the Biomass of *Trichoderma Koningiopsis* MX1 Produced in a Non-Stirring Culture for Potential Biodiesel Production *Environ Sci Pollut Res.* doi:10.1007/s11356-016-6595-3.
- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energ.* 34(1), 1-5.
- Meullemiestre A, Breil C, Abert-Vian M, Chemat F. 2016. Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a biojetfuel application, *Bioresource Technology* 211 38. 190-199.
- Papanikolaou S, Aggelis G. 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol.* 82: 43-49.
- Papanikolaou S & Aggelis G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1052-1073.

- Pescuma M, de Valdez GF & Mozzi F. 2015. Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99: 6183. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6766-z>.
- Polburee P, Yongmanitchai W, Lertwattanasakul N, Ohashi T, Fujiyama K, Limtong S 2015. 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 Biol.* 119, 1194–1204. [10.1016/j.funbio.2015.09.002](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.002).
- Poli JS, Lützhøft HCH, Karakashev DB, Valente P, and Angelidaki I. 2014. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Bioresour. Technol.* 151, 388–391. doi: [10.1016/j.biortech.2013.09.128](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.128).
- Poli JS, Rosa PD, Senter L, Mendes SDC, Castrillón Mauricio Ramírez, Vainstein MH, Valente P. 2013 Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *Revista Brasileira de Biociências (Impresso)*, v. 11, p. 203-208.
- Poontawee R., Yongmanitchai W., Limtong S. 2017. Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. *Process Biochemistry*, 53, 44-60.
- Probst KV, Schulte LR, Durrett TP, Rezac ME, Vadlani PV. 2015. Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015, 36, 942-955, DOI: [10.3109/07388551.2015.1064855](https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1064855).
- Rabelo SC, Carrere H, Maciel Filho R, Costa C. 2011. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 2011;102(17):7887-95.
- Ramírez-Castrillón M, Jaramillo-García VP, Rosa PD, Landell MF, Vu D, Fabricio MF, Ayub MAZ, Robert V, Henriques JAP, Valente P. 2017. The Oleaginous Yeast *Meyerozyma guilliermondii* BI281A as a New Potential Biodiesel Feedstock: Selection and Lipid Production Optimization. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. 1776. ISSN 1664-302X.
- Rosa PD, Mattanna P, Valente P. 2015. Avaliação da síntese de lipídeo pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33 em meio de cultura com glicose e sulfato de amônio.. *Revista Brasileira de Biociências (Impresso)*, v. 13, p. 79-83.

- Ratledge C. 1988. Yeasts for lipid production. *Biochem Soc Trans* 16:108.
- Ratledge C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1047–1050. 10.1042/bst0301047.
- Ratledge C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86:807–815.
- Ratledge, C, Wynn J. 1976. Microbial production of oils and fats. 2nd ed. in: Food from waste, (Ed.) K.J.P. G.G. Birch, J.T. Worgan, Applied Science Publishers. London, UK, pp. 98-113.
- Ratledge C, Wynn JP. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol.* 2002;51:1–51. doi: 10.1016/S0065-2164(02)51000-5.
- Shi S e Zhao H. 2017. Metabolic Engineering of Oleaginous Yeasts for Production of Fuels and Chemicals. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2185. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02185>.
- Signori L, Ami D, Posterl R, Giuzzi A., Mereghetti P, Porro D, Branduardi P. 2016. Assessing an effective feeding strategy to optimize crude glycerol utilization as sustainable carbon source for lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Microb Cell Fact*, 15, 75.
- Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J, Ohkuma M, Shima J. 2014. *Cryptococcus terricola* is promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. *Scientific reports* 4, 4776, 1-6.
- Qin L, Liu L, Zeng A-P, Wei D. 2017. From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts, *Bioresource Technology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.163>
- Xu J. et al. 2012 Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochemical Engineering Journal*. p. 30-36. ISSN - 1369-703X.
- Wang GY, Chi Z, Song B, Wang ZP, And Chi ZM. 2012. High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. *Biores. Technol.*, v. 124, p. 77 - 82. ISSN - 0960-8524.
- Yousuf A, Khan MR, Islam MA, Wahid ZA, Pirozzi D. 2017. Technical difficulties and solutions of direct transesterification process of microbial oil for biodiesel

- synthesis. *Biotechnology letters*. DOI 10.1007/s10529-016-2217-x.
- Ye RW, Sharpe PL, Zhu Q. 2012. Bioengineering of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for lycopene production. *Methods Mol Biol* 898:153–159. doi:10.1007/978-1-61779-918-1_9.
- Yellapu SK, Bezawada J, Kaur R, Tyagi RD. 2016. Detergent assisted lipid extraction from wet yeast biomass for biodiesel: A response surface methodology approach. *Bioresour Technol.* 218:667-73. doi: 10.1016/j.biortech.2016.07.011.
- Zhou YJ, Buijs NA, Zhu Z, Qin J, Siewers V, Nielsen J. 2016. Production of fatty acid-derived oleochemicals and biofuels by synthetic yeast cell factories. *Nat Commun.* 2016; 7:11709. doi: 10.1038/ncomms11709.
- Zhu Z, Zhang S, Liu H, Shen H et al .2012 A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nat Commun* 3:1112. doi: 10.1038/ncomms2112.