

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Papiliotrema flavescens* BI281, UMA
NOVA LEVEDURA OLEAGINOSA ISOLADA NO SUL DO BRASIL.**

TESE DE DOUTORADO

MAURICIO RAMÍREZ CASTRILLÓN

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Valente da Silva

Porto Alegre

Março de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Papiliotrema flavescens* BI281, UMA
NOVA LEVEDURA OLEAGINOSA ISOLADA NO SUL DO BRASIL.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Celular e Molecular

MAURICIO RAMÍREZ CASTRILLÓN

Biólogo (Universidad del Valle, Colômbia/2009)

Mestre em Biologia Celular e Molecular (UFRGS/2012)

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Valente da Silva

Porto Alegre

Março de 2017

LABORATÓRIOS PARTICIPANTES E FINANCIAMENTO DA TESE

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (ICBS), no Laboratório de Reparo de DNA em Eucariotos do Departamento de Biofísica, no Laboratório de Novos Materiais Orgânicos e Química Forense do Instituto de Química, e no Laboratório de Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálise do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), todos localizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi financiado pelo CNPq (Processos 304870/2013-7, 445207/2014-0), FAPERGS (Processo 11/2047-0) e pelo “Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnologia e Innovación COLCIENCIAS” (Bolsa, Conv. 512). Também incluiu período sanduíche no “Westerdijk Fungal Biodiversity Institute” (Utrecht, Países Baixos), com bolsa oferecida pelo programa Ciência sem Fronteiras (CNPq 201285/2015-0)

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos a toda minha segunda família no Brasil, professores e alunos do laboratório de Micologia do ICBS/UFRGS, todos aqueles que participaram ou participam no lab., e que fizeram parte integral dos meus dias, meses, anos em Porto Alegre. Foram todos vocês quem me vieram crescer, tanto profissional como humanamente durante seis anos. Foram vocês que aperfeiçoaram meu português e gauchês.

Agradeço à Patricia, quem acreditou, confiou, e responsabilizou em mim todo o seu conhecimento para a minha formação desde o mestrado. Foi ela quem permitiu que eu acreditasse na idéia de estudar no exterior e deu a força e apoio necessário para ingressar no mestrado, seis anos atrás, e que hoje se representa na finalização de um doutorado. Além disso, de ser uma segunda mãe para mim, ela preocupou-se com meu bem-estar e pelos altos e baixos emocionais, momentos de saudades, de tristeza, de alegrias e felicidade.

Agradeço à Maria Lúcia porque foi a minha terceira mãe. Aceito que tive muitas pessoas que estavam sempre ao meu redor apoiando, mas somente a Maria Lúcia oferecia ou pedia para fazer café, principalmente se era café colombiano. Do jeito que a Maria Lúcia é, controversial para algumas pessoas, afetiva para outras, ela soube compreender as necessidades dos seus estudantes e fornecer o máximo dela para todos nos sentirmos confortáveis na Universidade. Coisas que a experiência ensina para as pessoas, e das quais aprendi muito.

Agradeço a minha família, eles conseguiram suportar a idéia de estar fora da Colômbia por seis anos e ainda assim estavam prestes a me dar amor e

suporte para os momentos de fraqueza, ou estar presentes na hora de compartilhar as minhas alegrias. Lembro muito do momento que falei para minha mãe que estava indo embora para o Brasil e quase dá um surto ao dizer que pensava ficar, no mínimo, seis anos. Ela sabia, no fundo, que era o melhor para mim e aceitou a idéia no final, apesar de ter alguns natais e viradas do ano fora de casa.

Agradeço ao pessoal de todos os laboratórios nos quais participei: lab. da Biofísica, Química, ICTA, labs. do PPGMAA, ICBS e o CBS (agora chamado Westerdijk Institute), na Holanda. Nunca pensei que meu doutorado fosse tão interdisciplinar, e aprendi que os resultados nunca seriam interessantes se não tivesse a opinião e apoio científico de outras pessoas, outros pensamentos, outras disciplinas. A todos eles, obrigado.

Agradeço aos meus amigos colombianos residentes em Porto Alegre. Todos sabemos que os colombianos somos muito patriotas e morremos de saudades da nossa terra estando fora do país. Todas essas pessoas que vieram e ficaram, ou que foram embora, aportaram um pouquinho de alegria e felicidade, seja dançando, jantando, ou defendendo nossos direitos desde o exterior. Meus amigos que não são colombianos, mas que tem alma de latinos e portanto são os meus irmãos, agradeço muito pela oportunidade de conhecer vocês e por oferecer suas casas em viagens ou quando estiver planejando mais uma viagem.

Em quatro anos de doutorado são muitas as pessoas que vem e vão embora das nossas vidas, umas oferecem sua amizade, outras são conhecidas mas estão presentes, umas apaixonam e chegam compartilhar momentos doces contigo, e as vezes é importante para madurar como pessoa, para saber o que

errou e o que deve melhorar. Entretanto, a Camila chegou no minuto 45 do segundo tempo, como eu digo, para oferecer mais do que tudo isso, e tem me apoiado muito na etapa final do doutorado e na minha volta à Colômbia. Sim, volto à Colômbia, acho que eu mesmo sabia que ficar no Brasil não ia ser para sempre. Não foi pela crise, mesmo que tenha influenciado bastante. Tive uma bolsa que exige isso como condição, e acho certo. Porém, conheci uma guria que além de amor, apoio e fortaleza, sabia dessa condição, aceitou o desafio e agora esta ansiosa para conhecer a Colômbia, e se dá tudo certo, mudari a vida dela, a nossa vida. Vamos ver no que resulta, e estarei contando sobre ela para os netos. Eu voltarei para meu segundo lar, Brasil, em algum momento, e se o destino permite, tal vez more, viva, de novo no Brasil.

Finalmente, devo agradecer a todas aquelas agências que financiaram meu projeto, seja COLCIENCIAS ou CNPq. Graças ao seu apoio econômico consegui estudar fora do país de origem, consegui fazer meu doutorado sanduíche na Holanda, consegui financiamento para a minha tese. Este trabalho foi planejado, executado, desenvolvido e escrito graças a eles. Obrigado.

Muito obrigado a todos

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT: Acil-CoA:colesterol aciltransferases

ACC: acetil-CoA carboxilase

ACL: ATP citrato liase

AMP: adenosina monofosfato

A-Gly: Meio de Cultura A-glicerol

BHT: Butil hidroxi tolueno

CCD: *Central Composite Design*

CMC: Concentração mínima micelar

CMR: *Consecutive Measurement Ratio*

C/N: razão carbon/nitrogênio

DAG: diacilglicerídeo

DGAT: Acetil CoA:diacilglicerol aciltransferase

DMSO: Dimetil sulfóxido

EM: enzima málica

ESIPT: Transferência de prótons intramolecular no estado excitado

FAME: metil éster de ácido graxo

FID: *flame ionization detector*

GD: Gaúcho's Dye

GND1: 6-fosfogluconato desidrogenase

HTI: *High-throughput improvement*

HTS: *High-throughput screening*

MS: Espectrometria de massas.

MUFA: Ácido graxo mono insaturado

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

OD: Densidade ótica

PBS: tampão fosfato salino.

PDAT: Fosfolipideo:diacilglicerol transferase

PUFA: Ácido graxo poli insaturado

RFU: Unidade de Fluorescência Relativa

ROS: espécies oxigênio-reativas (*reactive oxygen species*)

RS: Rio Grande do Sul, Brasil

SCO: óleo microbiano (*single cell oil*)

SFA: Ácido graxo saturado

TAG: triacilglicerídeos

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

- Figura 1.** Comparação entre diesel, biodiesel de primeira e segunda geração....27
- Figura 2.** Matérias primas utilizadas na produção de biodiesel no Brasil.28
- Figura 3.** Produção mensal de biodiesel no Brasil expressa em metros cúbicos..29
- Figura 4.** Número de linhagens de leveduras reportadas na literatura como oleaginosas ao longo do último século.....39
- Figura 5.** Número de linhagens oleaginosas reportadas por espécie de levedura.40
- Figura 6.** Regulação do acúmulo de lipídios em fungos oleaginosos baseado em dados de transcriptômica, proteômica e fluxômica. As espécies analisadas foram *Y. lipolytica*, *R. toruloides*, *T. oleaginosus*, *Mortierella alpina*, *L. starkeyi* e *Mucor circinelloides*.....54

Capítulo 1

- Figure 1.1.** Fluorescence intensity of yeast strains grown in medium A using Nile Red dye (50 mg mL⁻¹). 77
- Figure 1.2.** Growth curve of *P. flavescens* BI281 using glucose as carbon source. 79
- Figure 1.3.** (a, b) Comparison of different temperatures in optical density (OD_{600nm}) and lipid production (mg/L) of *P. flavescens* BI281. (c, d) Assessment

of glucose and glycerol as carbon source, and (e, f) different nitrogen sources in *P. flavescens* BI281 biomass (g/L) or lipid (mg/L) production after 72 h of cell growth, 26 °C, 150 rpm (medium A)..... 81

Figure 1.4. (a) Response surface plot for the effect on time cultivation, C/N ratio and their mutual effect on the lipid production in *P. flavescens* BI281. (b) Response surface plot for the effect on C/N ratio, stirring (rpm) and their interaction on the lipid production for *P. flavescens* BI281. 85

Figure 1.5. Growth curve (OD600nm) and kinetics of lipid production (mg L⁻¹) of *P. flavescens* BI281..... 88

Figure 1.S1. Assessment of lipid content in *P. flavescens* BI281 and DEC79 as candidate oleaginous yeasts compared to *Y. lipolytica* QU21..... 99

Figure 1A.1. Growth curve of *P. flavescens* BI281 using glycerol as carbon source.. 102

Figure 1A.2. Growth curve and Fluorescence intensity using Nile red of *P. flavescens* BI281 in A-Gly and YM culture media..... 103

Figure 1A.3. Fluorescence intensity of yeast strains grown in medium A-glycerol using Nile Red dye (50 mg mL⁻¹) and medium A-glycerol as solvent.. 104

Figure 1A.4. Fluorescence intensity of yeast strains grown in medium A using Nile Red dye (50 mg mL⁻¹) and medium A-glycerol as solvent..... 105

Figure 1A.5. Growth (a) and fluorescence (b) curves of *P. flavescens* strains. (a). 106

Capítulo 2

Figure 2.1. Nile red fluorescence intensity (expressed as Relative Fluorescence Units) against time incubation of dye with each treatment (min).. 112

Figure 2.2. Box-plot of Nile red fluorescence measurements, independently of solvent used, against time incubation..... 115

Figure 2A.1. Nile red fluorescence intensity (expressed as Relative Fluorescence Units) against time incubation of dye with each treatment (min). Treatments included absence or presence of cells (*Y. lipolytica* QU21 grown for 7 days in A-Gly culture medium) with $OD_{600nm} = 0.03$119

Figure 2A.2. Growth curve of *P. flavescens* BI281 in pure glycerol (a,b) or raw glycerol derived from biodiesel industry (c).. 120

Capítulo 3

Figura 3. 1. Estrutura química de 2- (1,3-benzothiazol-2-yl)-5-(N,N-diethylamino)phenol. 128

Figura 3. 2. Espectro de absorção de GD. Os dois picos de máxima absorbância tiveram comprimentos de onda de 372nm (luz Ultravioleta) e 400nm..... 129

Figura 3. 3. Espectro de emissão do corante GD com diferentes solventes. 130

- Figura 3. 4.** Espectro de emissão do corante GD com diferentes solventes e células de *P. flavescens* BI281..... 131
- Figura 3. 5.** Espectro de emissão do corante GD com diferentes solventes e células de *S. cerevisiae* MRC164..... 132
- Figura 3. 6.** Espectro de emissão do corante GD com células de *P. flavescens* BI281 e meio de cultura A-Glicerol como solvente..... 133
- Figura 3. 7.** Espectro de emissão do corante GD com diferentes solventes e células de *P. flavescens* BI296 (esquerda) e BI283 (direita)..... 133
- Figura 3. 8.** (a) *Y. lipolytica* QU21 corado com GD. (b) *Y. lipolytica* QU21 corado com GD e Brometo de etídio (c) *P. flavescens* BI281 corado com GD. (b) *P. flavescens* BI281 corado com GD e Brometo de etídio (e) *S. cerevisiae* MRC164 corado com GD e Brometo de etídio. 135
- Figura 3. 9.** Efeito do tempo de incubação do corante GD e solventes sobre a intensidade da fluorescência. (a) Ausência de células, (b) Presença de células de *Y. lipolytica* QU21, (c) Presença de células de *P. flavescens* BI281..... 136
- Figura 3. 10.** Razão de medida consecutiva (CMR) para os corantes GD (a, b, primeira linha) e vermelho de Nilo (c, d, linha inferior), na presença de células de *Y. lipolytica* QU21 (a, c) ou em ausência de células (b, d). 138
- Figura 3. 11.** Razão de medida consecutiva (CMR) para os corantes GD (esquerda) e vermelho de Nilo (direita). 139

LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1. Espécies de leveduras oleaginosas pertencentes ao filo Ascomycota. 34

Tabela 2. Espécies de leveduras oleaginosas pertencentes ao filo Basidiomycota.
..... 35

Tabela 3. Unidades usadas para descrever produção de lipídios em leveduras. 60

Tabela 4. Corantes lipofílicos para detectar lipídios intracelulares.. 62

Capítulo 1

Table 1. Coded values of independent variables at different levels used in Central Composite Design 74

Table 2. *Papiliotrema flavescens* BI281 growth at six different combinations of carbon or nitrogen sources..... 82

Table 3. Experimental design to improve *P. flavescens* BI281 lipid content, and comparison of observed data, data predicted by the model and residues..... 83

Table 4. Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model for optimization of cellular lipid production ($P < 0.05$). $R^2 = 0.8306$ 85

Table 5. Fatty acid methyl esters profile of lipids produced by *P. flavescens* BI281 grown in pure glycerol (5 and 12 days) or raw glycerol (12 days).. 87

Table S1. Strains tested in this work..... 98

Table 1 A. Candidate oleaginous Yeasts belonging Tremellales clade grown in medium A-glycerol..... 106

INDICE

RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO	23
REVISÃO DE LITERATURA	26
BIOCOMBUSTÍVEIS E BIODIESEL	26
PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE TERCEIRA GERAÇÃO.....	30
LEVEDURAS OLEAGINOSAS.....	31
COMPOSIÇÃO LIPÍDICA EM LEVEDURAS OLEAGINOSAS	42
BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS EM LEVEDURAS	43
A PARTICIPAÇÃO DAS ÔMICAS EM LEVEDURAS OLEAGINOSAS.....	47
FATORES QUE INFLUENCIAM O ACÚMULO DE LIPÍDIOS.....	55
MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO E/OU QUANTIFICAÇÃO DE ÓLEO.....	59
OBJETIVO	65
OBJETIVO GERAL.....	65
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
CAPÍTULO 1	66
TRIAGEM “HIGH THROUGHPUT” E REPORTAGEM DE QUATRO NOVAS LEVEDURAS OLEAGINOSAS ISOLADAS NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO DE PAPILOTREMA FLAVESCENS BI281.....	66
1.1 ABSTRACT	67
1.2 INTRODUCTION	68

1.3 METHODS	69
1.3.1 MICROORGANISMS.....	69
1.3.2 MEDIA	69
1.3.3 HIGH THROUGHPUT SCREENING (HTS) METHODOLOGY.....	70
1.3.4 CALIBRATION CURVE.....	71
1.3.5 GRAVIMETRIC DETERMINATION OF BIOMASS	71
1.3.6 GRAVIMETRIC DETERMINATION OF TOTAL LIPIDS	72
1.3.7 LIPID PROFILE.....	72
1.3.8 OPTIMIZATION OF LIPID PRODUCTION.....	73
1.3.9 STATISTICAL ANALYSIS	75
1.4 RESULTS	76
1.4.1 THE USE OF HTS METHODOLOGY FOR YEAST SCREENING AND THE SELECTION OF P. FLAVESCENS BI281.....	76
1.4.2 OPTIMIZATION OF LIPID PRODUCTION BY P. FLAVESCENS BL281 USING A HTI APPROACH.....	78
1.4.3 OPTIMIZATION OF LIPID PRODUCTION BY P. FLAVESCENS BL281	83
1.5 DISCUSSION.....	88
1.8 REFERENCES	92
1.9 SUPPLEMENTARY MATERIAL	98
1A. APENDICE	101
1A.1 GROWTH CURVE OF P. FLAVESCENS BI281 IN A-GLYCEROL.....	101
1A.2 DETECTION OF ANOTHER OLEAGINOUS YEAST STRAINS.....	103
CAPITULO 2.....	107

QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE LIPÍDIOS NEUTROS DE LEVEDURAS POR LEITURAS DE FLUORESCÊNCIA COM O CORANTE VERMELHO DE NILO DEVE SER FEITA APÓS A ESTABILIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA	107
2A APÊNDICE	119
CAPITULO 3.....	121
UTILIZAÇÃO DO CORANTE 2- (1,3-BENZOTHAZOL-2-YL)-5-(N,N-DIETHYLAMINO)PHENOL PARA DETECÇÃO DE GOTAS LIPÍDICAS EM LEVEDURAS OLEAGINOSAS.....	121
3.1 ABSTRACT	122
3.2 INTRODUÇÃO.....	122
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	124
3.3.1 CORANTES UTILIZADOS	124
3.3.2 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCOPICA USANDO SOLUÇÕES BIOLÓGICAS.....	124
3.3.3 CARACTERIZAÇÃO USANDO LEVEDURAS OLEAGINOSAS	125
3.3.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	126
3.3.5 ESTABILIDADE DAS LEITURAS DE FLUORESCÊNCIA	126
3.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	127
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	128
3.4.1 PROPRIEDADES FLUORESCENTES DO CORANTE	128
3.4.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	133
3.4.3 ESTABILIDADE DA FLUORESCÊNCIA.....	135
3.5 REFERENCIAS	140
DISCUSSÃO GERAL	142

CONCLUSÕES.....	147
PERSPECTIVAS.....	149
REFERÊNCIAS.....	150
CURRICULUM VITAE	165

RESUMO

O biodiesel de terceira geração, cuja matéria prima é obtida a partir de microrganismos, é a alternativa promissora para substituir grandes cultivos com finalidade combustível. Os organismos oleaginosos mais estudados são microalgas e leveduras, onde a levedura mostra algumas vantagens que conferem viabilidade e potencial para ser aplicada em nível industrial. Porém, o esforço de triagem de leveduras selvagens com capacidade acumuladora de lipídio não é suficiente e novas metodologias devem ser desenvolvidas para acelerar o processo de seleção. Além disso, a biodiversidade de leveduras do Rio Grande do Sul (Brasil) tem sido pouco explorada, apesar dos relatos na literatura do grande potencial de acúmulo de lipídios em leveduras da região. Neste sentido, o objetivo principal desta tese foi avaliar a habilidade de acumulação de lipídios em leveduras de uma coleção, cujas fontes de isolamento foram (1) estruturas de plantas bromélias do parque Itapuã (Viamão, RS), e (2) plantas macrófitas associadas a marismas da lagoa dos Patos, Rio Grande (RS). De 55 leveduras recuperadas e avaliadas, quatro linhagens mostraram capacidade oleaginosa a partir de determinação gravimétrica, observação em microscopia de fluorescência e leituras de cinética do acúmulo de lipídios usando intensidade de fluorescência. Três linhagens foram identificadas como *Papiliotrema flavescens* (BI281, BI283, BI296) e uma linhagem como *Vishniacozyma sp.* BI237. Estas espécies são descritas pela primeira vez como oleaginosas. Foi testado o corante fluorescente 2-(1,3-benzothiazol-2-yl)-5-(N,N-dyethylamino)phenol, denominado nessa tese como “Gaúcho Dye (GD)”. Este corante foi comparado com o

vermelho de Nilo em duas leveduras oleaginosas e uma levedura não oleaginosa. Os resultados sugerem que o corante GD é lipofílico, marca fluorescência nas gotas lipídicas, e em espectrofluorimetria mostra duas bandas de emissão, o que é relacionado com a sua natureza química. O mecanismo de transferência de prótons intramolecular no estado excitado (ESIPT em inglês) pode ser evidenciado de acordo com o solvente empregado e células com acúmulo de lipídios. Os resultados sugeriram a segunda banda de emissão com maior afinidade lipofílica à molécula. Por tudo isso, as propriedades espectroquímicas são vantajosas quando comparadas com o vermelho de Nilo, principalmente pela sua fotoestabilidade. Assim, esta tese envolveu a ampliação da lista de leveduras relatadas como acumuladoras de lipídios, a otimização da produção de lipídios em *P. flavescens* B1281 e obtenção do seu perfil lipídico. *P. flavescens* B1281 está sendo proposta como matéria prima para produção de biodiesel. Além disso, um novo corante para marcação de leveduras oleaginosas com propriedades fotoquímicas melhoradas foi avaliado.

ABSTRACT

Third generation biodiesel, where the feedstock are oleaginous microorganisms, is an promissor alternative to replace vegetable crops to produce fuel. The most studied oleaginous organisms are microalgae and yeasts, where yeast showed advantages that offer economic viability and potential to be applied in industry. However, the effort of native yeast screening with lipid-accumulating ability is not enough, and new methodologies should be developed to accelerate the selection process. Moretheless, the yeast biodiversity in Rio Grande do Sul (Brazil) had been little explored besides reports literature of great potential lipid-accumulating ability in yeasts of the region. In this sense, the objective of this thesis was to assess the lipid-accumulating ability in our yeast collection, with focus in two isolation sources: (1) bromeliads plants and structures from Itapuã park (Viamão, RS), and (2) macrophyte plants associated to a marshland in “lagoa dos Patos”, Rio Grande (RS). From 55 recovered and assessed yeasts, four strains showed oleaginous ability using gravimetric determination, observation in fluorescence microscopy and fluorescence kinetics readings. Three strains were identified as *Papiliotrema flavescens* (BI281, BI283, BI296) and the other one as *Vishniacozyma sp.* BI237. These species are described for first time as oleaginous in this Thesis. We tested the fluorescent dye 2-(1,3-benzothiazol-2-yl)-5-(N,N-dyethylamino)phenol, and was called “Gaúcho Dye (GD)”. This dye was compared to Nile red in two oleaginous strains and one non-oleaginous strain. Our results suggested that “GD” dye is lipophilic, stain lipid droplets, presents ES IPT property only in presence of oleaginous yeast and showed advantageous characteristics

when compared to Nile red., being photostable. Therefore, this thesis involved list expansion of novelty oleaginous species, optimization of lipid production in *P. flavescens* BI281 and obtained their lipid profile. *P. flavescens* BI281 is proposed as feedstock for biodiesel. Furthermore, a new fluorescent dye to stain oleaginous yeasts, called GD, with improved photochemical properties, was assessed.

INTRODUÇÃO

Numerosas espécies de microrganismos têm sido relatadas na literatura como fonte de óleo microbiano, incluindo bactérias, fungos filamentosos, microalgas e leveduras (THEVENIEAU *et al.*, 2013). A produção de óleo microbiano é de interesse devido à capacidade de vários microrganismos de sintetizar lipídios de importância médica e nutricional, por exemplo, o ácido graxo poli-insaturado γ -linolênico (MATTANNA *et al.*, 2014a; SITEPU *et al.*, 2014), ou para processos biotecnológicos, como produção de biodiesel (POLI *et al.*, 2013, 2014a).

A produção de biodiesel de terceira geração é uma alternativa promissora para sobrepor a competição entre combustível e alimento para produção de biodiesel de primeira geração (SITEPU *et al.*, 2014). A produção de biodiesel no Brasil usa principalmente óleo de soja como matéria prima, competindo com alimentação humana. Como numerosas linhagens de leveduras são consideradas uma fonte de óleo microbiano (SITEPU *et al.*, 2014), conseguindo acumular até 70% do seu peso seco em lipídios (ANGERBAUER *et al.*, 2008), vários estudos foram realizados no Brasil com o objetivo de avaliar sua capacidade produtora de lipídios, seja para biodiesel ou como suplemento alimentício (por exemplo, DUARTE *et al.*, 2013, POLI *et al.*, 2013, 2014b, MATTANNA *et al.*, 2014a, 2014b, VIEIRA *et al.*, 2014, ROSA *et al.*, 2015). Algumas das espécies de leveduras descritas na literatura como oleaginosas e com possível utilidade na produção de biodiesel são *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula toruloides*,

Lipomyces starkeyi, *Cutaneotrichosporon curvatus*, *Occultifur externus* e *Sporobolomyces pararoseus* (AGEITOS *et al.*, 2011, GARAY *et al.*, 2016).

Os métodos convencionais de extração de lipídios propostos por FOLCH *et al.* (1957) e BLIGH & DYER (1959) se baseiam em determinação gravimétrica do conteúdo relativo à biomassa seca. A extração envolve reagentes analíticos e solventes orgânicos, tais como metanol ou clorofórmio (SITEPU *et al.*, 2012, POLI *et al.*, 2013, 2014b, MATTANNA *et al.*, 2014a, DALLE DA ROSA *et al.*, 2014). Por outro lado, vários métodos têm sido propostos baseados em fluorescência para avaliar conteúdo lipídico dentro da célula. Para isso, vários corantes têm sido testados para quantificação dos lipídios, tais como Sudan Black (DUARTE *et al.*, 2013), vermelho de Nilo (GREENSPAN *et al.*, 1985, KIMURA *et al.*, 2004, CHEN *et al.*, 2009) e BODIPY 505/515 (4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, GOVENDER *et al.*, 2012). Estas metodologias demonstraram ser efetivas e rápidas na hora de estimar a produção de lipídios em fungos, microalgas, ciliados e macrófagos. Porém, metodologias “high throughput” para avaliar leveduras oleaginosas são escassas na literatura (KIMURA *et al.*, 2004, SITEPU *et al.*, 2012, POLI *et al.*, 2014a). CAPUS *et al.* (2016) propôs uma nova tecnologia usando microscopia confocal para testar diferentes estágios (relativo ao tempo de cultivo) de produção de lipídio em diferentes células oleaginosas. Porém, esse equipamento é difícil de ser encontrado na maioria de laboratórios e é difícil aplicar uma triagem de alto desempenho com técnicas de imagem.

A aplicação de metodologias de triagem, seleção, otimização e analíticas na área de produção de lipídios em leveduras facilita o entendimento do mecanismo de acúmulo de lipídios em cada espécie. A integração de várias análises ômicas, tais como genômica (CHERRY *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013), transcriptômica (WANG *et al.*, 2009; ROSSOUW *et al.*, 2010), proteômica (CHEN & SNYDER, 2010; ROSSOUW *et al.*, 2010), metabolômica (SMEDSGAARD & NIELSEN, 2005; JEWISON *et al.*, 2011), e fluxômica (FENG & ZHAO, 2013; WINTER & KROMER, 2013) permitem o maior entendimento do metabolismo lipídico, e colaboram na criação de ferramentas de engenharia metabólica para otimização de uma linhagem na fase produtiva industrial (SHENG & FENG, 2015).

Esta tese propõe a caracterização de uma nova levedura oleaginosa isolada no Rio Grande do Sul, Brasil. A primeira parte da caracterização, microbiológica, envolve a aplicação de uma metodologia de triagem “high throughput” para o isolamento de uma nova levedura oleaginosa. Na segunda parte, foi avaliado um corante fluorescente microscópica e espectrofluorimetricamente para a marcação de gotas lipídicas em leveduras oleaginosas.

REVISÃO DE LITERATURA

Biocombustíveis e biodiesel

Os biocombustíveis são combustíveis produzidos direta ou indiretamente de biomassa (FAO, 2004). Entre eles são catalogados a lenha, carvão vegetal, bioetanol, biodiesel, biogás (metano) e/ou biohidrogênio. Biomassa é o material de origem biológica excluindo material incorporado em formações geológicas e transformadas em fóssil (FAO, 2004). Entre elas encontra-se cultivos, resíduos e subprodutos agroindustriais ou silviculturais, adubo ou biomassa microbiana.

Os biocombustíveis são agrupados em três categorias, dependendo da matéria prima e tecnologia de conversão usada: (1) primeira geração, produzidos de cultivos dedicados à produção de bioenergia. Os mais utilizados são açúcar, amido e óleo vegetal; (2) segunda geração, são produtos bio-baseados que vêm de matérias primas não alimentícias e incluem resíduos agroindustriais, tais como biomassa lignocelulósica ou biomassa descartada; (3) terceira geração, sendo biocombustíveis produzidos de matérias primas obtidas por microrganismos. Os mais usados são algas e leveduras (SALADINI *et al.*, 2016).

O biodiesel pode ser definido como um combustível de acil-ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzidos pela transesterificação de gorduras e ácidos graxos de origem vegetal, animal ou microbiana (SITEPU *et al.*, 2014). A Lei brasileira 11.097 de 13 de janeiro de 2005 definiu biodiesel como um combustível derivado de biomassa renovável que é usado em motores de combustão interna com ignição por compressão (FREITAS *et al.*, 2013). O biodiesel apresenta várias características vantajosas quando comparado ao diesel tradicional. Ele causa menor quantidade de emissão de gases, tais como dióxido

de enxofre, dióxido de carbono (em até 78%), material particulado (até 66,7%) e hidrocarbonetos não queimados (45,2%) (GEN *et al.*, 2014).

O biodiesel mais usado na indústria atualmente usa óleo vegetal como fonte de matéria prima, implicando no amplo uso de terra cultivável para produção, dependência de sazonalidade, competição com alimentos para os seres humanos, entre outros motivos, que levam à procura de fontes alternativas de óleo (Figura 1).

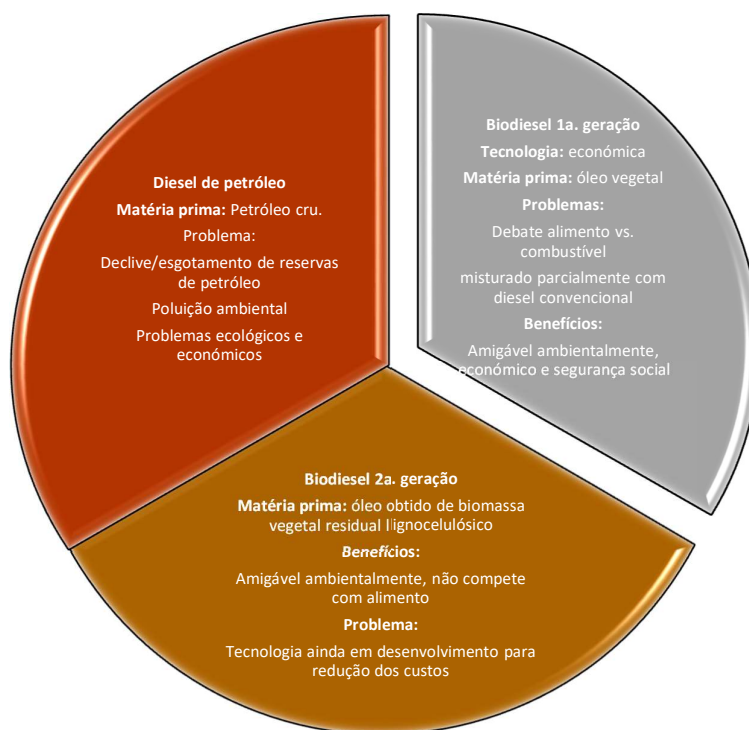


Figura 1. Comparação entre diesel, biodiesel de primeira e segunda geração (modificado de: NAIK *et al.*, 2010)

Os cultivos mais usados no mundo para produção de biodiesel são canola (84 %), girasol (13 %), óleo de palma (1 %), soja e outros (2 %) (ATABANI *et al.*, 2012).

Os óleos apresentados por esses cultivos estão compostos principalmente por

ácido oleico, e portanto, fornecem qualidade de ignição superior, ponto de fusão e viscosidade ideais e estabilidade oxidativa (SITEPU *et al.*, 2014).

No Brasil, o principal cultivo utilizado é a soja (Figura 2), usando 21% do cultivo nacional para extração de óleo (BONATO *et al.*, 2000). Em 2014, houve um incremento de 26% na produção de biodiesel, passando de 2,7 a 3,4 milhões de metros cúbicos (Figura 3, BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2015).

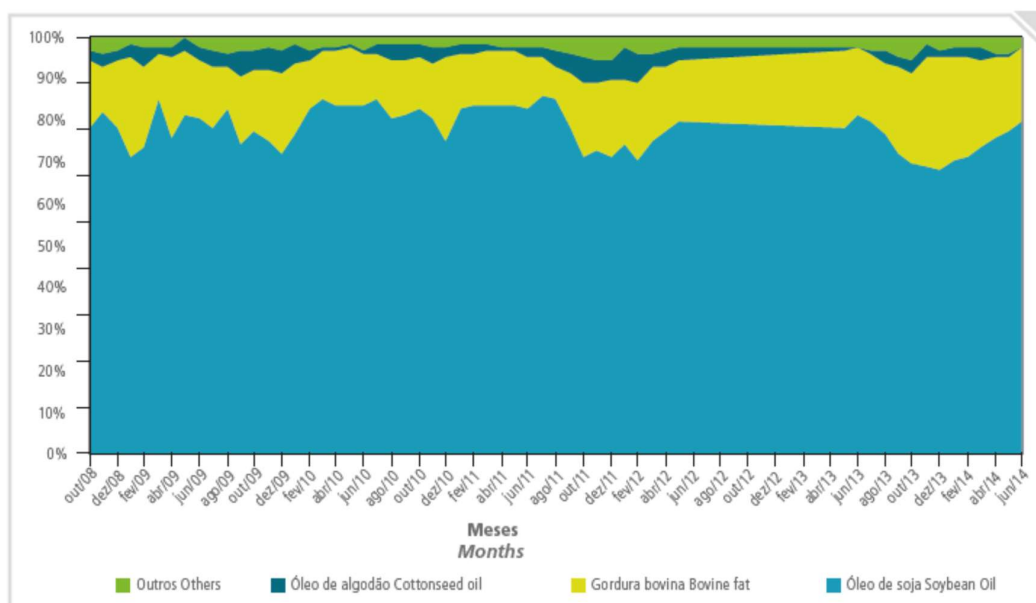


Figura 2. Matérias primas utilizadas na produção de biodiesel no Brasil. Tomado de: BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2015.

Apesar da grande produção de soja no Brasil, a produção de biodiesel apresenta vários problemas. A soja está sujeita a variações de preços significativas dependendo da sazonalidade, afetando os seus produtos. Por outro lado, o incremento na demanda energética aparece como uma oportunidade para diversificar a matriz energética (NETO *et al.*, 2016).

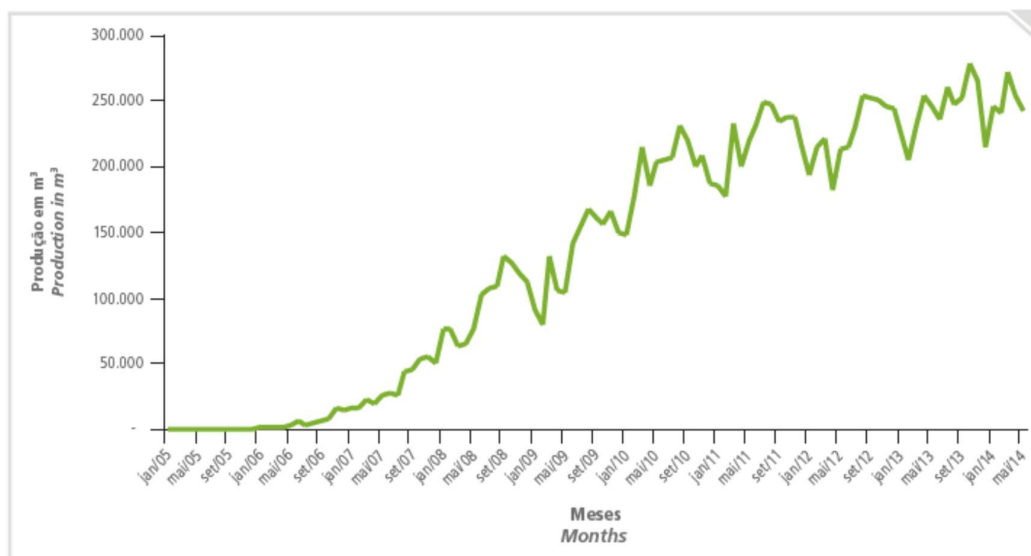


Figura 3. Produção mensal de biodiesel no Brasil expressa em metros cúbicos. Tomado de: BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2015.

O governo Brasileiro criou em 2003 a Comissão Executiva Interministerial do Biodiesel (CEIB) e em dezembro de 2004, o governo federal lançou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), com o objetivo inicial de introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira. A mistura ao diesel fóssil teve início em 2004 e a Lei nº 11.097/2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira, postulou a mistura de 2% de biodiesel (B2), entrando em vigor em janeiro de 2008. Com o amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual tem sido incrementado sucessivamente até 7,0% (novembro de 2014) (NETO *et al.*, 2016). A Lei nº 13.263/2016 determinou o cronograma de aumento do teor de biodiesel até março de 2019, quando a percentagem deverá ser de 10% (B10) (ANP, 2017). Na Argentina, o biodiesel B10 foi implementado em dezembro de 2013 (NETO *et al.*, 2016). Finalmente, não existem dados estatísticos oficiais relacionados à produção de biodiesel de segunda geração no

Brasil. Porém, vários esforços têm sido realizados pelo governo para procurar alternativas aos problemas de produção de biodiesel de primeira geração (CREMONEZ *et al.* 2015).

Produção de biodiesel de terceira geração

O biodiesel de terceira geração está em desenvolvimento usando microrganismos que acumulam óleo, tais como microalgas, bactérias, leveduras e outros fungos. Óleos provenientes de uma célula (Single cell oils ou SCO), ou sistemas microbianos que produzem e acumulam óleo, têm chamado a atenção da pesquisa científica, principalmente em resposta à elevação do preço do petróleo. Microrganismos oleaginosos podem converter substratos como dióxido de carbono, açúcares e ácidos orgânicos a lipídio. Enquanto algumas espécies produzem lipídios intracelulares continuamente, a maioria das células precisa de condições estressantes como privação de determinados nutrientes para estimular a síntese de lipídios em altas quantidades. Uma vez que as células produzem o lipídio, elas são coletadas e lisadas por diversas metodologias (solventes, lise mecânica, enzimática e outros), liberando o lipídio. Estes lipídios são separados da fração celular e refinados quimicamente para produzir um éster, liberando glicerol dos ácidos graxos. Tipicamente, isso é feito por uma hidrólise ácida ou básica na presença de um álcool. Enquanto o atual sistema leva a um custo de produção alto, o estabelecimento de um sistema robusto é necessário para ser competitivo com combustíveis baseados em petróleo.

Neste sentido, a estimativa do custo tem sido difícil e as projeções variam entre USD\$1 a USD\$80 por galão (DAVIS *et al.*, 2011). RATLEDGE & COHEN (2008) examinaram projeções para lipídios de algas e leveduras. Eles calcularam que o preço de óleo proveniente de células de levedura, baseado nas tecnologias em 2008, deveria ser de USD\$3000 por tonelada (excluindo o custo de matéria-prima), o qual deve ser duas vezes o valor do óleo vegetal usado para biodiesel. Até então, foi concluído que o óleo de levedura não seria viável economicamente até o preço do petróleo e óleo vegetal aumentar o suficiente. Outro estudo na China estimou o custo de produção de óleo de levedura a partir de biomassa lignocelulósica em USD\$1230 por tonelada, incluindo o custo da matéria prima (HUANG *et al.*, 2013a). Portanto, até 2014, os custos e projeções de custo de produção de biodiesel de terceira geração continuavam altos (GEN *et al.*, 2014), necessitando pesquisas em desenvolvimento tecnológico para que sejam reduzidos. Entretanto, NETO *et al.* (2016) aponta que a produção de biodiesel por leveduras é sustentável, mais eficiente que biodiesel de primeira geração e tem aproximadamente os mesmos custos de produção. De fato, experimentos de SOCCOL *et al.* (2017) sugeriram um custo de produção mais competitivo usando leveduras (U\$0,76/L) quando comparado com vegetal (U\$0,81/L). Assim, a viabilidade econômica do biodiesel de terceira geração está perto de ser uma realidade industrialmente.

Leveduras oleaginosas

Uma levedura é considerada oleaginosa quando a razão em peso seco dos lipídios totais em relação à biomassa é igual ou maior a 20% (SITEPU *et al.*,

2014). Sendo assim, as leveduras oleaginosas têm sido estudadas como uma fonte microbiana de óleo para oleoquímicos, incluindo combustíveis, plataformas químicas através de tecnologias integradas de biomassa, e ingredientes de alimentação (WOODBINE, 1959). As vantagens de usar leveduras em comparação com algas são que as primeiras possuem um crescimento mais rápido, em maior densidade, são menos suscetíveis à infecção viral e conseguem crescer em pH baixo, o que evita a contaminação bacteriana. Com as condições de cultivo otimizadas, tem sido reportado que acumulam até 70% de óleo por peso seco (ANGERBAUER *et al.*, 2008).

Os tipos de lipídios que podem ser produzidos por leveduras incluem triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos, ésteres esteril, esteróis livres, glicerofosfolipídios, cardiolipinas, esfingolipídios, glicolipídios, hidrocarbonetos (tipo esqualeno e carotenoides), álcoois de cadeia longa, polipropinóis, quinonas isoprenoides, entre outros (BLAGOVIĆ *et al.*, 2001; LÖSEL, 1988; RATTRAY, 1988; SCHWEIZER, 2004). Algumas espécies podem acumular somente triacilgliceróis nos corpos lipídicos, enquanto que outras podem acumular somente ésteres esterol. Ainda outras, como *Saccharomyces cerevisiae*, podem acumular ambos (CZABANY *et al.*, 2008; MURPHY, 2012). Ácidos graxos mono-insaturados, principalmente ácido oléico, são os mais utilizados na indústria de biodiesel, pela estabilidade que forcenem à reação de transesterificação, fluidez, ponto de névoa, ponto de entupimento de filtro ao frio, viscosidade, entre outros (BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2015)

Sob o ponto de vista ecológico, muitas leveduras que são reportadas como oleaginosas são isoladas de habitats relativamente secos ou pobres em nutrientes, tais como as superfícies das plantas (KURTZMAN *et al.*, 2011), onde a capacidade de usar uma grande variedade de fontes de carbono deve ser uma vantagem (SITEPU *et al.*, 2014). Portanto, a maioria de leveduras oleaginosas pode utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono. Por outro lado, as leveduras oleaginosas não conseguem fermentar carboidratos, sendo aeróbias estritas. Essas características permitem que a levedura consiga sobreviver por longos períodos de tempo em nichos secos ou pobres em nutrientes e opte por armazenar reservas de carbono como estratégia adaptativa para sobrevivência em habitats adversos.

Por muitas décadas, a maioria dos estudos em produção de lipídios por leveduras foi concentrada em poucas espécies, principalmente *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces spp.*, *Rhodotorula glutinis*, *R. graminis*, *C. curvatus*, *N. albida* e *R. toruloides* (Tabela 1 e Tabela 2). Porém, dezenas de novas leveduras oleaginosas têm sido descritas atualmente, mas poucas têm sido estudadas em profundidade. Alguns critérios de seleção têm sido recentemente utilizados, como assimilação de carboidratos, osmotolerância ou tolerância a baixo pH. Na Tabela 1 são relatadas as leveduras oleaginosas pertencentes ao filo Ascomycota e na Tabela 2 as leveduras oleaginosas pertencentes ao filo Basidiomycota descritas na literatura até o momento.

Tabela 1. Espécies de leveduras oleaginosas pertencentes ao filo Ascomycota. Modificado e atualizado de SITEPU *et al.* (2014)

Espécie	Número de linhagens	% de óleo	Referência
<i>Candida diddensiae</i>	1	37	MALKHAS'IAN <i>et al.</i> (1982)
<i>Candida freyschussii</i>	1	32	AMARETTI <i>et al.</i> (2012)
<i>Candida sp.</i>	1	20-56	DUARTE <i>et al.</i> (2013)
<i>Candida tropicalis</i>	1	23	ANDREEVSKAYA E ZALASHKO (1979)
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	2	20-30	SCHMIDT (1947), JIGAMI <i>et al.</i> (1979)
<i>Cyberlindnera saturnus</i>	1	25	BOULTON & RATLEDGE (1981)
<i>Debaryomyces etchellsii</i>	1	22	AROUS <i>et al.</i> (2016)
<i>Galactomyces candidum</i>	1	50	GEFFERS (1937)
<i>Galactomyces pseudocandidum</i>	1	28	FRANKLIN <i>et al.</i> (2011)
<i>Geotrichum histeridarum</i>	1	33,77	FRANKLIN <i>et al.</i> (2011)
<i>Kodamaea ohmeri</i>	2	22,9-53,28	KITCHA & CHEIRSILP (2011), POLBUREE <i>et al.</i> (2015)
<i>Kurtzmaniella cleridarum</i>	1	33	SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Lipomyces doorenjongii</i>	1	72,3	OGURI <i>et al.</i> (2012)
<i>Lipomyces kockii</i>	1	77,8	OGURI <i>et al.</i> (2012)
<i>Lipomyces lipofer</i>	2	40-43	KLEINZELLER (1944), MCELROY & STEWART (1967)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	5	21-62	STARKEY (1946), CHEN <i>et al.</i> (2009), SIGNORI <i>et al.</i> (2016)
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	1	66,5	EROSHIN & KRYLOVA (1983)
<i>Magnusiomyces magnusii</i>	1	27	ZHELIFONOVA <i>et al.</i> (1983)
<i>Metschnikowia gruessii</i>	1	34	STANIER (1946)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1	30	PAN <i>et al.</i> (2009)
<i>Metschnikowia sp.</i>	6	25-48	MAINA <i>et al.</i> (2016)
<i>Meyerozyma caribbica</i>	1	37,6	POLBUREE <i>et al.</i> (2015)
<i>Myxozyma melibiosi</i>	1	23	SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Myxozyma udenii</i>	1	20,6	DIEN <i>et al.</i> (2016)
<i>Pichia manshurica</i>	1	64,8	POLBUREE <i>et al.</i> (2015)
<i>Saturnispora silvae</i>	1	30,1	POLBUREE <i>et al.</i> (2015)
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	2	23-41,90	GUERZONI <i>et al.</i> (1985), LAMERS <i>et al.</i> (2016)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1	40	FRANKLIN <i>et al.</i> (2011)
<i>Trigonopsis variabilis</i>	1	20-43,7	SENTHESHANMUGANATHAN & NICKERSON (1962)
<i>Wickerhamomyces</i>	1	30	SOUZA <i>et al.</i> (2017)

Espécie	Número de linhagens	% de óleo	Referência
<i>anomalous</i>			
<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	1	22	HOPTON & WOODBINE (1960)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	26	37,6-70	BATI <i>et al.</i> (1984), POLI <i>et al.</i> (2013), MATTANNA <i>et al.</i> (2014), QIAO <i>et al.</i> (2015), LEIVA-CANDIA <i>et al.</i> (2014), SOUZA <i>et al.</i> (2017)

Tabela 2. Espécies de leveduras oleaginosas pertencentes ao filo Basidiomycota. Modificado e atualizado de SITEPU *et al.* (2014)

Espécie	Número de linhagens reportadas	% de óleo	Referência
<i>Apiotrichum brassicae</i>	1	20,34	FRANKLIN <i>et al.</i> (2011)
<i>Apiotrichum cacaoliposimilis</i>	2	64,50	GUJJARI <i>et al.</i> (2011), MATSUO <i>et al.</i> (1981)
<i>Apiotrichum domesticum</i>	1	35,16	FRANKLIN <i>et al.</i> (2011)
<i>Apiotrichum loubieri</i>	1	22,39	FRANKLIN <i>et al.</i> (2011)
<i>Apiotrichum montevidense</i>	1	25,60	FRANKLIN <i>et al.</i> (2011)
<i>Apiotrichum porosum</i>	1	24,5	SCHULZE <i>et al.</i> (2014)
<i>Colacogloea terpenoidalis</i>	1	27	FRANKLIN <i>et al.</i> (2011)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	21,3	ITOH <i>et al.</i> (1975)
<i>Cutaneotrichosporon curvatus</i>	5	32-69	MOON <i>et al.</i> (1978), THIRU <i>et al.</i> (2011), LEIVA-CANDIA <i>et al.</i> (2014), JIRU <i>et al.</i> (2016), SIGNORI <i>et al.</i> (2016)
<i>Cutaneotrichosporon cutaneum</i>	2	20-39,8	MOON <i>et al.</i> (1978), CHEN <i>et al.</i> (2009)
<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>	2	40,1-60,8	MATSUO <i>et al.</i> (1981), HUANG <i>et al.</i> (2012)
<i>Cutaneotrichosporon guehoae</i>	1	37	SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Cutaneotrichosporon oleaginosus</i>	2	51	GUJJARI <i>et al.</i> (2011), MOON <i>et al.</i> (1978)
<i>Cystobasidium laryngis</i>	1		VIÑARTA <i>et al.</i> (2016)
<i>Cystobasidium minuta</i>	1	24,62	PAN <i>et al.</i> (2009)
<i>Cystobasidium oligophagum</i>	1	36,46	VYAS & CHHABRA (2017)
<i>Cystobasidium slooffiae</i>	1	N.D.*	CAPUS <i>et al.</i> (2016)
<i>Filobasidium oeirense</i>	1	25	SITEPU <i>et al.</i> (2013)

Espécie	Número de linhagens reportadas	% de óleo	Referência
<i>Filobasidium wieringae</i>	1	23-53	SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Hannaella sp.</i>	1	25	SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Leucosporidiella creatinivora</i>	2	49-62	ROSSI <i>et al.</i> (2009), SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Moesziomyces aphidis</i>	1	44	GILL <i>et al.</i> (1977)
<i>Moesziomyces parantarcticus</i>	1	43,54	AREESIRISUK <i>et al.</i> (2015)
<i>Moniliella spathulata</i>	1	41,5	KITCHA & CHEIRSILP (2011)
<i>Naematelia encephala</i>	1	41	SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Naganishia adeliensis</i>	4	32,10	LI <i>et al.</i> (2012)
<i>Naganishia albida</i>	3	25-40,1	HANSSON & DOSTALEK (1986a), FEI <i>et al.</i> (2011), SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Occultifur externus</i>	1	57 ± 2.2	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Papiliotrema aurea</i>	1	21,10	ENEBO <i>et al.</i> (1944)
<i>Papiliotrema laurentii</i>	2	23-30	GUERZONI <i>et al.</i> (1985), POLBUREE <i>et al.</i> (2015)
<i>Papiliotrema flavescens</i>	4	52	Este trabalho.
<i>Phenoliferia glacialis</i>	1	68	AMARETTI <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudohyphozyma bogoriensis</i>	1	29,2 ± 2,9	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	7	25	TANIMURA <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodospordiobolus colostri</i>	1	26,89	SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhodospordiobolus fluvialis</i>	1	25	SITEPU <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhodotorula araucariae</i>	1	60,1 ± 4,1	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodotorula babjevae</i>	1	65	SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhodotorula dairenensis</i>	1	33,44	JIRU <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodotorula diobovata</i>	4	20-41	SITEPU <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhodotorula glacialis</i>	2	73-77	AMARETTI <i>et al.</i> (2010), VIÑARTA <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	4	35,4-57,2	NILSSON <i>et al.</i> (1943), YOON & RHEE (1983), VIÑARTA <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodotorula graminis</i>	2	40-52	GALAFASSI <i>et al.</i> (2012), SITEPU <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	2	40	PATEL <i>et al.</i> (2014), JIRU <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	15	28-67,5	ATAMANYUK <i>et al.</i> , 1978, SITEPU <i>et al.</i> (2012), JIRU <i>et al.</i> (2016), GARAY <i>et al.</i>

Espécie	Número de linhagens reportadas	% de óleo	Referência
<i>Rhodotorula paludigenum</i>	2	31	(2016) SITEPU <i>et al.</i> (2012), GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodotorula sp. 1</i>	1	57,2 ± 2,2	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodotorula sp. 2</i>	1	53,4 ± 1,6	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodotorula sphaerocarpa</i>	2	37-43	FRANKLIN <i>et al.</i> (2011), SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	15	21,9-71	POLBUREE <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhodotorula toruloides</i>	11	19-67	HUSAIN & HARDIN (1952), TATSUMI <i>et al.</i> (1977), SITEPU <i>et al.</i> (2012), CHEN <i>et al.</i> (2009), WANG <i>et al.</i> (2012), LI <i>et al.</i> (2007), SIGNORI <i>et al.</i> (2016), SARAN <i>et al.</i> (2017)
<i>Saitozyma podzolica</i>	6	34,6-55	TANIMURA <i>et al.</i> (2014), SCHULZE <i>et al.</i> (2014)
<i>Saitozyma sp.</i>	1	64,4	POLBUREE <i>et al.</i> (2015)
<i>Solicoccozyma aerea</i>	1	63,3	EROSHIN & KRYLOVA (1983)
<i>Solicoccozyma terreus</i>	1	51	SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Solicoccozyma terricola</i>	1	69,30	PEDERSEN (1961)
<i>Sporobolomyces johnsonii</i>	2	24,8-43,4	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	4	53,2-60,4	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodospordiobolus ruineniae</i>	5	21,3-66	POLBUREE <i>et al.</i> (2015), GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	4	22,2-43,3	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Sporobolomyces bannaensis</i>	4	27,3-38,8	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Sporobolomyces sp. 1</i>	2	40,8-55,8	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Sporobolomyces sp. 2</i>	1	45,9 ± 0,8	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	3	47,1-61,4	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	34,8	CUI <i>et al.</i> (2012)
<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	1	34,6 ± 0,4	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodospordiobolus odoratus</i>	2	48,7-56,7	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhodospordiobolus poonsookiae</i>	1	50,4 ± 3,6	GARAY <i>et al.</i> (2016)
<i>Tausonia pullulans</i>	3	29,3-46	NILSSON <i>et al.</i> (1943), TATSUMI <i>et al.</i> (1977), MARTINEZ <i>et al.</i> (2016)
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	1	37,8	HUANG <i>et al.</i> (2013b)
<i>Trichosporon fermentans</i>	1	52,2	LI <i>et al.</i> (2011)
<i>Vanrija albida</i>	2	23	SITEPU <i>et al.</i> (2012)

Espécie	Número de linhagens reportadas	% de óleo	Referência
<i>Vanrija humicola</i>	3	23-35	ZOTOVA <i>et al.</i> (1985), SITEPU <i>et al.</i> (2013), SOUZA <i>et al.</i> (2017)
<i>Vanrija musci</i>	1	44,7	TANIMURA <i>et al.</i> (2014)
<i>Vishniacozyma sp. 1</i>	1	37	SITEPU <i>et al.</i> (2013)
<i>Vishniacozyma sp. 2</i>	1	33,27	Este trabalho
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	1	22	SITEPU <i>et al.</i> , (2012)

* Determinado a partir de microscopia confocal, proposto por CAPUS *et al.* (2016)

Desde o relato de *Galactomyces candidum* por GEFERS *et al.* (1937) como levedura oleaginosa, várias pesquisas foram focadas em triagem de leveduras produtoras de óleo. A Figura 1 mostra uma série histórica de pesquisas com leveduras oleaginosas. Por exemplo, entre 1942-1948, 1960-1962 e 1974-1986 foram relatadas várias espécies oleaginosas e que continuam sendo avaliadas e melhoradas até a atualidade. Porém, desde 2008 até 2016 tem sido observado um crescimento exponencial das pesquisas reportadas para a seleção de novas linhagens oleaginosas. Nesse sentido, entre Janeiro e o Outubro de 2016 foram relatadas 70 novas linhagens oleaginosas, mostrando o grande interesse científico em descobrir o potencial oleaginoso de leveduras.

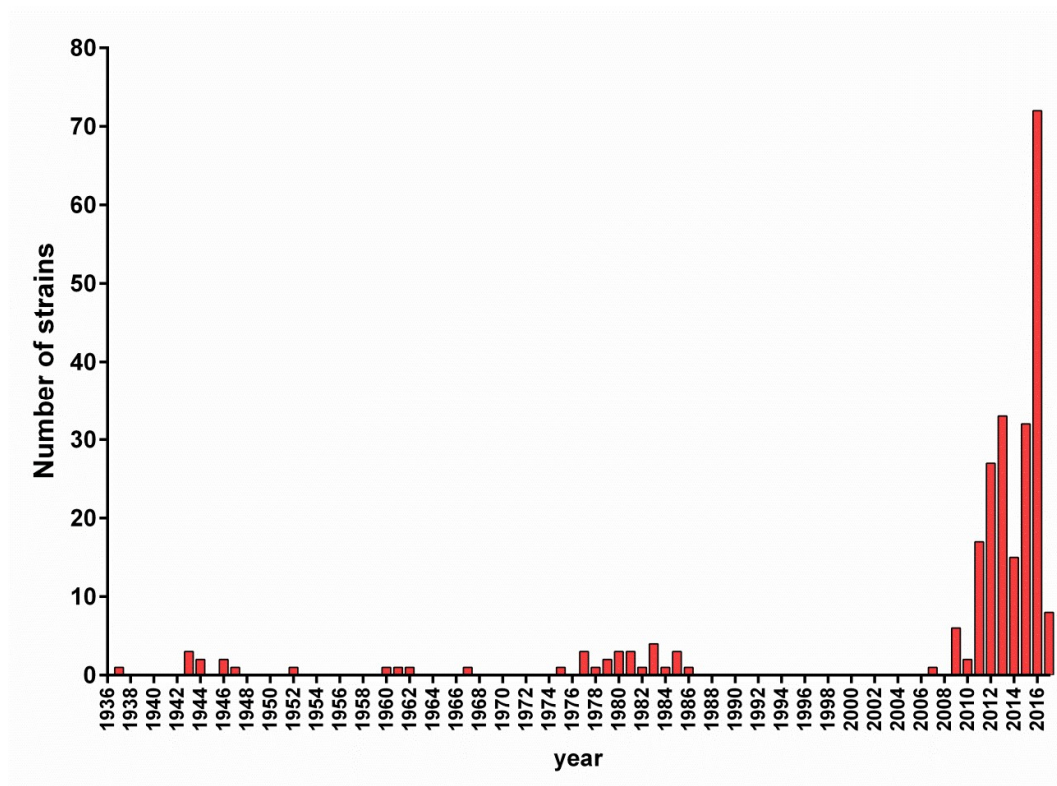


Figura 4. Número de linhagens de leveduras reportadas na literatura como oleaginosas ao longo do último século.

Ao mesmo tempo, a maioria de espécies de leveduras oleaginosas foi relatada somente com um ou dois isolados, enquanto outras espécies apresentam várias linhagens oleaginosas, podendo chegar até 26 linhagens diferentes de *Yarrowia lipolytica* (Figura 2). *Y. lipolytica*, um microrganismo considerado “seguro” para uso na indústria (GROENEWALD *et al.*, 2014), é a levedura preferida para produção de lipídios (LEDESMA-AMARO *et al.*, 2016). Outras espécies ricas em linhagens oleaginosas são *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. toruloides* e *R. taiwanensis*, mostrando uma associação filogenética na capacidade oleaginosa (KURTZMAN *et al.*, 2015). Algumas espécies como *Lipomyces spp.*, *R. glutinis*, *R.*

graminis, *C. curvatus*, *N. albida*, e *R toruloides* têm sido exploradas com maior profundidade para produção de lipídios em escala industrial (SITEPU *et al.*, 2014).

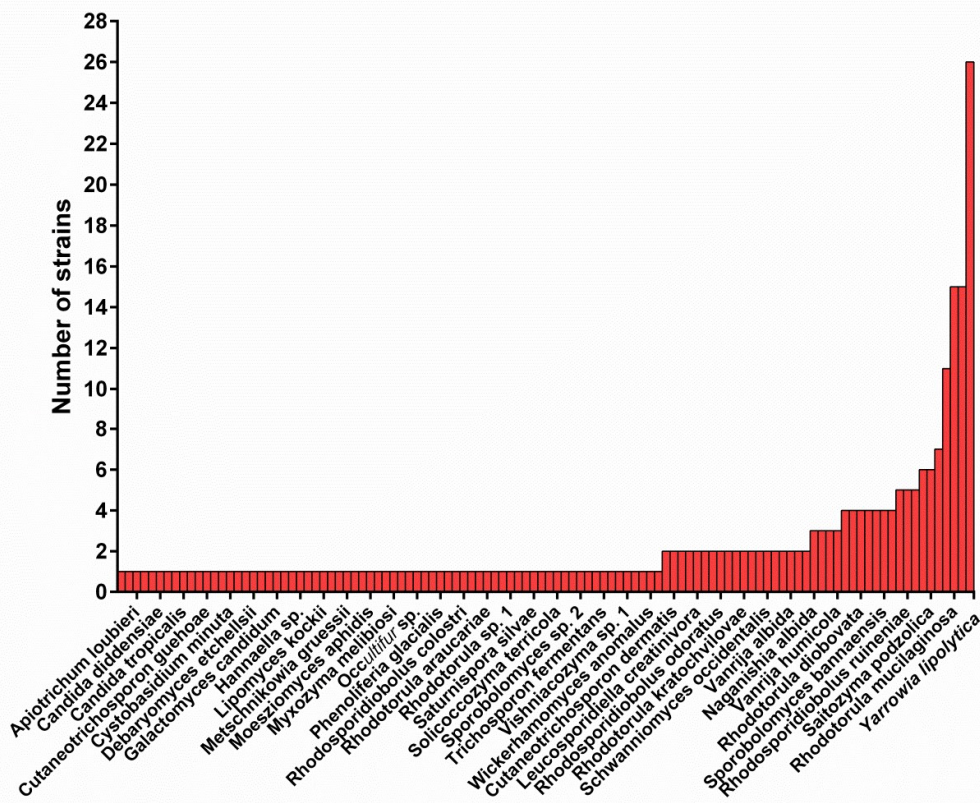


Figura 5. Número de linhagens oleaginosas reportadas por espécie de levedura.

Dois tipos de estratégias podem ser utilizadas para avaliação de novas leveduras oleaginosas. A primeira estratégia consiste em avaliar grupos filogenéticos próximos a espécies já reportadas. Por exemplo, OGURI *et al.* (2012) reportaram a capacidade oleaginosa de *L. doorenjongii* e *L. kockii*, que são espécies próximas a *L. starkeyi*. Da mesma forma, GARAY *et al.* (2016) reportaram alta percentagem de novas linhagens oleaginosas quando avaliaram um clado específico do filo Basidiomycota. Outra estratégia é baseada em propriedades fisiológicas que podem estar presentes em leveduras oleaginosas. Por exemplo, a

seleção de leveduras que armazenam lipídios, posteriormente crescem em meios livres de carbono. Com esta estratégia foi detectado *N. adeliensis* como linhagem oleaginosa (LI *et al.*, 2012). Leveduras que respondem ao enriquecimento de meios de cultivo com glicerol como fonte de carbono já foi testado por alguns autores, como PAN *et al.* (2009), que relataram que 32,5% das linhagens foram oleaginosas. Também, o crescimento de leveduras em meios pobres em nitrogênio ofereceu um rendimento de 28,23% de linhagens oleaginosas (KRAISINTU *et al.*, 2010). Finalmente, características semelhantes em coleções de cultura podem ser associadas com oleaginidade. Por exemplo, SITEPU *et al.* (2012) avaliou com sucesso leveduras que flutuavam no tubo de ensaio quando era adicionado glicerol 20% para criopreservação da coleção de culturas Phaff da Universidade de Davis (USA), tendo reportado que 73,33% de leveduras eram oleaginosas.

Quanto à taxonomia de leveduras, em dezembro de 2015, foram publicadas várias mudanças na taxonomia dentro do filo Basidiomycota, devido a várias inconsistências filogenéticas de acordo com o grupo avaliado, tais como a existência de grupos polifiléticos (LIU *et al.* (2015, WANG *et al.* 2015a,b). Por exemplo, a polifilia é claramente evidenciada na tabela apresentada por SITEPU *et al.* (2014). Os trabalhos reportados por LIU *et al.* (2015) e WANG *et al.* (2015a,b) reorganizaram os grupos filogenéticos de leveduras dentro das classes *Tremellomycetes*, *Pucciniomycotina* e *Ustilaginomycotina*, e a maioria dos gêneros foi reagrupada em grupos monofiléticos. Desta forma, as Tabelas 1 e 2 são apresentadas com a classificação atualizada (gêneros e epítetos específicos).

SITEPU *et al.* (2014) descreveram três postulados para leveduras oleaginosas: (1) não são clado-específicas, tendo leveduras oleaginosas pertencentes à Ascomycota (Tabela 1) e Basidiomycota (Tabela 2); (2) o potencial de acumulação de lipídio varia entre espécies próximas e entre linhagens dentro da mesma espécie. Por exemplo, MATTANA *et al.* (2014a) e GARAY *et al.* (2016) mostraram que diferentes linhagens dentro da mesma espécie têm diferentes conteúdos lipídicos e perfis de ácidos graxos diferentes, o que enfatiza a importância de citar qual linhagem foi utilizada nas publicações; (3) novas leveduras oleaginosas estão sendo descobertas e descritas.

Composição lipídica em leveduras oleaginosas

Os ácidos graxos mais comuns em leveduras contêm entre 16 e 18 carbonos, sendo a maioria deles saturados (por exemplo C16:0) ou monoinsaturados (por exemplo C18:1). Em leveduras oleaginosas, os ácidos graxos mais frequentes são ácido oléico (C18:1), ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0) (MEESTERS *et al.*, 1996), sendo os mesmos ácidos graxos dominantes na produção de biodiesel a partir de óleo vegetal, como canola ou girassol (WOODBINE, 1959; RATTRAY, 1988; AGEITOS *et al.*, 2011). Durante a fase exponencial de crescimento, o ácido linoléico (C18:2) aparece em grandes quantidades, mas diminui na fase estacionária, quando os ácidos esteárico (C18:0) e oléico (C18:1) chegam ser prominentes e é adicionada uma ligação dupla no C18:0 para C18:1 pela enzima Δ^9 dessaturase (YKEMA *et al.*, 1988; HASSAN *et al.*, 1993; MEESTERS *et al.*, 1996)

FIRESTONE (2013) sugeriram que a fração oleína (óleos de 18C) é a preferida para a produção de biodiesel, por apresentar diversas propriedades que são favoráveis para a estabilidade do biocombustível, tais como estabilidade oxidativa, viscosidade, calor de combustão, ponto de ebulição e número cetano (indicador de qualidade, SITEPU *et al.*, 2014). Quando comparados, os óleos vegetais e de leveduras são semelhantes em composição. Porém, uma vantagem do óleo microbiano é que a composição do ácido graxo pode ser modificada dependendo da fonte de nutrientes (LEIVA-CANDIA *et al.*, 2014), o que confere um potencial de uso sustentável e renovável na indústria de biodiesel.

Biossíntese de lipídios em leveduras

A síntese *de novo* de lipídios é um processo bioquímico anabólico no qual acetil-CoA, proveniente de diferentes vias metabólicas intermediárias, gera ácidos graxos, que são esterificados com glicerol, produzindo lipídios estruturais (fosfolipídios, etc) e de reserva (triacilgliceróis). Os precursores do triacilglicerol (TAG) são glicerol-3-fosfato e acil-CoA, formada a partir dos ácidos graxos pela acil-CoA sintetase. A primeira etapa da síntese de triacilgliceróis é a produção de diacilglicerol-3-fosfato (ácido fosfatídico) a partir de glicerol-3-fosfato e duas moléculas de acil-CoA. O ácido fosfatídico é hidrolisado a diacilglicerol (DAG) por uma fosfatase, que é então convertido a triacilglicerol por uma transesterificação com uma terceira molécula de acil-CoA. A produção de TAG como moléculas de reserva energética é comum a vários seres vivos, porém apenas alguns são capazes de acumular TAG em altas concentrações sem que aparentemente haja citotoxicidade (GARAY *et al.*, 2014).

Para que haja síntese de lipídios, é necessário um grande suprimento intracelular de acetil-CoA e de NADPH. A ATP-citrato-liase catalisa a reação entre o citrato e coenzima A (CoA), formando acetil-CoA e oxaloacetato. A limitação de nitrogênio leva a um aumento na atividade de AMP-desaminase, diminuindo o conteúdo de AMP na célula. Essa diminuição na quantidade de AMP resulta na inibição da enzima isocitrato-desidrogenase, que é dependente de AMP nos microrganismos oleaginosos. Portanto, o isocitrato não é metabolizado e é equilibrado com citrato via ação da aconitase, havendo acúmulo de citrato na mitocôndria. Quando o citrato atinge um valor crítico, é exportado da mitocôndria por meio de um sistema de translocação malato-citrato, entrando no citosol e sendo utilizado pela ATP-citrato-liase na formação de oxaloacetato e acetil-CoA, que é utilizada na síntese de ácidos graxos. O oxaloacetato é convertido em malato, que é utilizado no sistema de efluxo para saída do citrato da mitocôndria (PAPANIKOLAU & AGGELIS, 2011).

A produção de lipídios *de novo* em leveduras oleaginosas é usualmente ativada por limitação do nitrogênio. Durante a fase exponencial ou de crescimento, elas produzem lipídios estruturais, como constituintes de membrana celular, e somente uma pequena proporção é armazenada. Porém, quando o nitrogênio começa a esgotar, elas começam a acumular lipídios neutros, tais como triacilglicerol (TAG), em grande quantidade (PARK *et al.*, 2017). O “switch” metabólico que representa esse fenômeno tem sido estudado extensivamente.

Vários trabalhos reportados pelo grupo liderado pelo Dr. Colin Ratledge (BOTHAM & RATLEDGE, 1979; BOULTON & RATLEDGE, 1981; RATLEDGE, 2002; RATLEDGE & WYNN, 2002) mencionam que a enzima ATP-citrato-liase (ACL) é chave na característica oleaginosas, controlando o fluxo de carbono para armazenamento de lipídios (VORAPREEDA *et al.*, 2012, OCHOA-ESTOPIER *et al.*, 2014, SITEPU *et al.*, 2014). Porém, PARK *et al.* (2017) mostraram que duas linhagens oleaginosas das espécies *Y. lipolytica* e *R. toruloides*, quando comparadas com outras linhagens oleaginosas, estão “down” reguladas, revolucionando o conceito que tem sido reportado até agora sobre a importância desta enzima. Outras enzimas reportadas como fortemente induzidas no processo de acúmulo de lipídios são a enzima málica e a acetil-CoA carboxilase (OCHOA-ESTOPIER *et al.*, 2014).

O outro componente essencial é o NADPH, que é produzido nos microrganismos oleaginosos via enzima málica. Esta enzima catalisa a reação entre o malato e NADP⁺, formando piruvato e NADPH. Enzimas alternativas geradoras de NADPH também podem estar presentes (RATLEDGE, 2004). O resultado final dessas reações é a formação de ácidos graxos a partir da acetil-CoA, que serão utilizados na síntese dos diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG).

Em leveduras, os TAG podem ser sintetizados por duas classes de DAG aciltransferases, uma dependente de acetil-CoA, catalisada pela acetil CoA:diacilglicerol aciltransferase (DGAT), e uma via independente de acetil-CoA, catalisada pela fosfolipideo:diacilglicerol transferase (PDAT). Existem duas famílias principais de DGAT ligadas à membrana, DGAT1 e DGAT2, e uma

família solúvel, DGAT3, cuja presença em *Rhodotorula glutinis* já foi sugerida (Rani et al., 2013). A família DGAT1 tem alta similaridade com acil-CoA:colesterol aciltransferases (ACAT), que catalisam reações de esterificação em mamíferos. Em *Saccharomyces cerevisiae*, dois membros da família ACAT, Are1p e Are2p, são os responsáveis por reações de esterificação do esterol. Os homólogos ARE1 e ARE2 de *Y. lipolytica* parecem ter papéis diferentes na síntese e metabolismo de lipídios neutros. A proteína Are1p de *Y. lipolytica* pertence à família ACAT, com atividade de esterificação de esterol, enquanto a proteína Are2p pertence à DGAT.

ZHANG *et al.* (2012) estudaram a participação das DAG aciltransferases na síntese de TAG usando mutantes de *Y. lipolytica*, enquanto Beopoulos *et al.* (2012) descreveram uma nova DAG aciltransferase, homóloga aos genes ARE de *S. cerevisiae*. A expressão das DAG aciltransferases é tão importante para a síntese de TAG que Kamisaka *et al.* (2013) demonstraram que a super-expressão de uma variante desta enzima foi capaz de transformar a levedura não-oleaginosa *S. cerevisiae* em oleaginosa, capaz de acumular até 45% de lipídios. Essa abordagem abre caminho para novas estratégias visando o melhoramento do acúmulo de lipídios em leveduras.

O conhecimento da bioquímica da síntese de lipídios em fungos também pode ser aproveitado em prol do melhoramento genético de leveduras oleaginosas. Assim, a expressão heteróloga tem sido focada no melhoramento de precursores e suplementos de cofatores para a produção de ácidos graxos. Outra possibilidade

é modificar elementos regulatórios do metabolismo para aumentar a expressão de enzimas limitantes e otimizar a produtividade. Neste sentido, a engenharia de rotas endógenas e heterólogas permitiram o incremento da produtividade (SHENG & FENG, 2015). Por exemplo, a expressão da enzima málica heteróloga de *Mucor circinelloides* em *Rhodotorula glutinis* foi capaz de aumentar o conteúdo lipídico da levedura de 18,74% para 39,35% (LI et al., 2013) e a superexpressão do gene da acetil-CoA carboxilase de *Mucor rouxii* aumentou o conteúdo de ácidos graxos em *Hansenula polymorpha* (RUENWAI et al., 2009). Também, *S. cerevisiae* tem sido transformada para tornar esta espécie oleaginosa (TANG et al., 2015, KAMISAKA et al., 2016, SHI et al., 2016). Também, a superexpressão de Ole1p, uma dessaturase- $\Delta 9$, teve efeitos significativos no conteúdo de ácido palmitoleico e oleico (KAMISAKA et al., 2016). Por outro lado, SHI et al. (2016) propuseram uma metodologia de triagem de genes relacionados ao acúmulo de lipídios em *Y. lipolytica* para tornar *S. cerevisiae* JV03 como oleaginosa. Segundo esses autores, enzimas como a proteína-ancorada-Glicosilfosfatidilinositol, malato-desidrogenase, gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenase, ácido-graxo-hidroxilase, farnesiltransferase, anoctamina, dihidrolipoamida-deshidrogenase e a proteína que liga a fosfatidiletanolamina conseguiram incrementar até 2,5 vezes a produção de ácidos graxos quando avaliadas individualmente.

A participação das ômicas em leveduras oleaginosas

Até 2015, nenhuma abordagem em biologia de sistemas conseguiu satisfazer completamente as demandas para desenvolver um hospedeiro produtor de ácidos graxos para biocombustíveis (SHENG & FENG, 2015). Por isso, esforços para a

integração de várias ômicas têm sido o foco de estudos recentemente para a otimização da produtividade na escala industrial. A genômica (CHERRY *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2013), transcriptômica (WANG *et al.*, 2009; ROSSOUW *et al.*, 2010), proteômica (CHEN & SNYDER, 2010; ROSSOUW *et al.*, 2010), metabolômica (SMEDSGAARD & NIELSEN, 2005; JEWISON *et al.*, 2011), e fluxômica (FENG & ZHAO, 2013; WINTER & KROMER, 2013), junto com aplicações racionais e apropriadas de engenharia genética, podem oferecer um avanço para criar um hospedeiro ideal para produção de biocombustíveis (SHENG & FENG, 2015).

VORAPREEDA *et al.* (2012), usando análise genômica comparativa entre fungos não-oleaginosos (*S. cerevisiae*, *Candida albicans* e *Ashbya gossypii*) e fungos oleaginosos (*Y. lipolytica*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae* e *Mucor circinelloides*), identificaram rotas potencialmente envolvidas na geração de precursores da síntese de lipídios. Os autores sugeriram uma relação entre o metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos na biossíntese de acetil-CoA, contribuindo para a produção de lipídios em microrganismos oleaginosos. Considerando o metabolismo de carboidratos, quatro principais rotas de síntese de acetil-CoA a partir do piruvato foram encontradas tanto nos fungos oleaginosos quanto nos não-oleaginosos, envolvendo as enzimas piruvato-cinase, piruvato-desidrogenase, enzima málica, lactato-desidrogenase e acetil-CoA-sintetase. Além dessas rotas gerais, foi identificada uma rota adicional em fungos oleaginosos com a participação da enzima ATP-citrato-liase, não encontrada nos fungos não oleaginosos. Além do metabolismo de carboidratos, a acetil-CoA pode ser gerada por outras vias metabólicas, como através da degradação dos lipídios

pela β -oxidação de ácidos graxos e pela degradação de aminoácidos ramificados (leucina e lisina).

LIU *et al.* (2011) analisaram o proteoma da levedura oleaginosa *L. starkeyi* durante diferentes estágios de um processo típico de acúmulo de lipídios e viram que respostas globais ocorriam quando as células eram expostas a um ambiente deficiente em nitrogênio (indutor da síntese de lipídios). Muitas das proteínas com expressão reduzida eram relacionadas à glicólise, enquanto a maioria das proteínas superexpressas estavam envolvidas na proteólise e peptidólise, metabolismo de carboidrato e de lipídios. Os autores não observaram atividade da enzima málica, mas a 6-fosfogliconato desidrogenase, que catalisa uma reação que gera NADPH na via das pentoses, foi superexpressa. A superexpressão dessa enzima também foi encontrada em estudos anteriores de proteômica de *R. toruloides* pelos mesmos autores (LIU *et al.*, 2009). Portanto, a via das pentoses fosfato parece ser importante para gerar poder redutor para a síntese de lipídios em leveduras.

MORIN *et al.* (2011) estudaram a expressão gênica de *Y. lipolytica* durante a transição entre as etapas de produção de biomassa e acúmulo de lipídios pela técnica de microarranjo. A maior parte da resposta de *Y. lipolytica* refletiu uma diminuição da taxa de crescimento em condições de limitação de nitrogênio. A maioria dos genes que governam a síntese de ácidos graxos em *Y. lipolytica* não parece ser diretamente controlada em nível de transcrição, não sendo descartado um controle pós-traducional da expressão desses genes. Por outro lado, nessa

levedura os genes relacionados ao alongamento e dessaturação dos ácidos graxos parecem ser controlados em nível de transcrição.

ZHU *et al.* (2012) apresentaram os resultados de uma análise multi-ômica de *R. toruloides* e relataram que os dados transcriptômicos (RNA-seq) e proteômicos sugeriram que o acúmulo de lipídios em condições limitantes de nitrogênio correlaciona com a indução da lipogênese, reciclagem de compostos nitrogenados, metabolismo de macromoléculas e autofagia. Os autores reconstruíram o metabolismo central e o metabolismo de lipídios dessa levedura e viram que ela expressa ATP: citrato liase e β -oxidação de ácidos graxos, que podem ser fontes de acetil-CoA para síntese de TAG. Foi encontrada uma nova enzima chamada ácido graxo sintase. Os genes com expressão reduzida foram relacionados ao metabolismo primário e de macromoléculas. A limitação de nitrogênio ativou uma série de vias que incluem indução da assimilação de nitrogênio, utilização de fontes alternativas de nitrogênio, degradação de proteínas vacuolares, autofagia e inibição da biossíntese de macromoléculas nitrogenadas. A regulação da enzima málica foi complexa, com a transcrição sendo reduzida, porém o nível da proteína sendo aumentado nas condições de limitação de nitrogênio. A glicólise foi aumentada, porém as enzimas do ciclo de Krebs tiveram a expressão reduzida; com isso, o piruvato foi canalizado para acetil-CoA, precursora dos lipídios.

SHI *et al.* (2013) realizaram a análise de proteômica comparativa entre a levedura não oleaginosa *S. cerevisiae* e duas espécies oleaginosas (*N. albidus* e *R.*

toruloides) em diferentes estágios de acúmulo de lipídios, utilizando marcação com iTRAQ acoplada com 2D-nano-LC-MS/MS. Os autores identificaram as proteínas diferencialmente expressas em oito grupos funcionais, sendo que 15 proteínas foram *up*-reguladas nas leveduras oleaginosas em relação à *S. cerevisiae*, entre elas a NADP-GDH3p (envolvida na biossíntese do glutamato e que poderia atuar fornecendo suprimento de nitrogênio em condições de baixa concentração de nitrogênio no meio externo), a GND1p (catalisa a reação de descarboxilação oxidativa do 6-fosfogluconato a ribulose 5-fosfato acoplada à redução de NADP a NADPH, essencial para reações de biossíntese, em especial a biossíntese de lipídios), AAC2p (importa ADP para dentro da mitocôndria e bombeia ATP para o citosol) e ATP2p mitocondrial (converte a energia do gradiente de prótons em ATP). GND1p, AAC2p and ATP2p foram *up*-reguladas em *R. toruloides* em relação à *N. albidia*, o que pode explicar o maior acúmulo de lipídios na primeira espécie em relação à segunda.

PARK *et al.* (2017) desenharam um mapa das rotas metabólicas para leveduras oleaginosas, baseadas em dados de genômica, proteômica e fluxômica quando comparadas em condições limitantes e não limitantes de nitrogênio (Figura 3). Como é mostrado no mapa, a glicólise e ciclo de Krebs são geralmente expressos negativamente independente da espécie ou nível ômico analisado, implicando que o controle é na transcrição. Também, é mostrada a superexpressão de piruvato desidrogenase e piruvato-cinase, o que está de acordo os relatos de acúmulo de citrato na mitocôndria, o qual seria transportado ao citoplasma pela ATP-citrato-liase (que já é considerada um *fingerprint* para leveduras oleaginosas; PARK *et*

al., 2017). Porém, como dito anteriormente, foi observado que essa enzima estava sub-expressa em *Y. lipolytica* Po1g e *R. Toruloides* NP11, o que sugere que ACL pode não ser o único mecanismo de acúmulo de acetil-CoA para essas espécies. Foi sugerido que a fonte de acetil-CoA para *R. toruloides* se deriva da superexpressão das rotas de degradação e β -oxidação de ácidos graxos (ZHU *et al.*, 2012). No mesmo sentido, acetil-CoA carboxilase foi encontrada como superexpressa, exceto para *Y. lipolytica* e *R. toruloides*. Esta enzima direciona diretamente a produção de ácidos graxos a partir de acetil-CoA citoplasmática, pelo que é alvo principal de engenharia metabólica (TAI *et al.*, 2013, QIAO *et al.*, 2015).

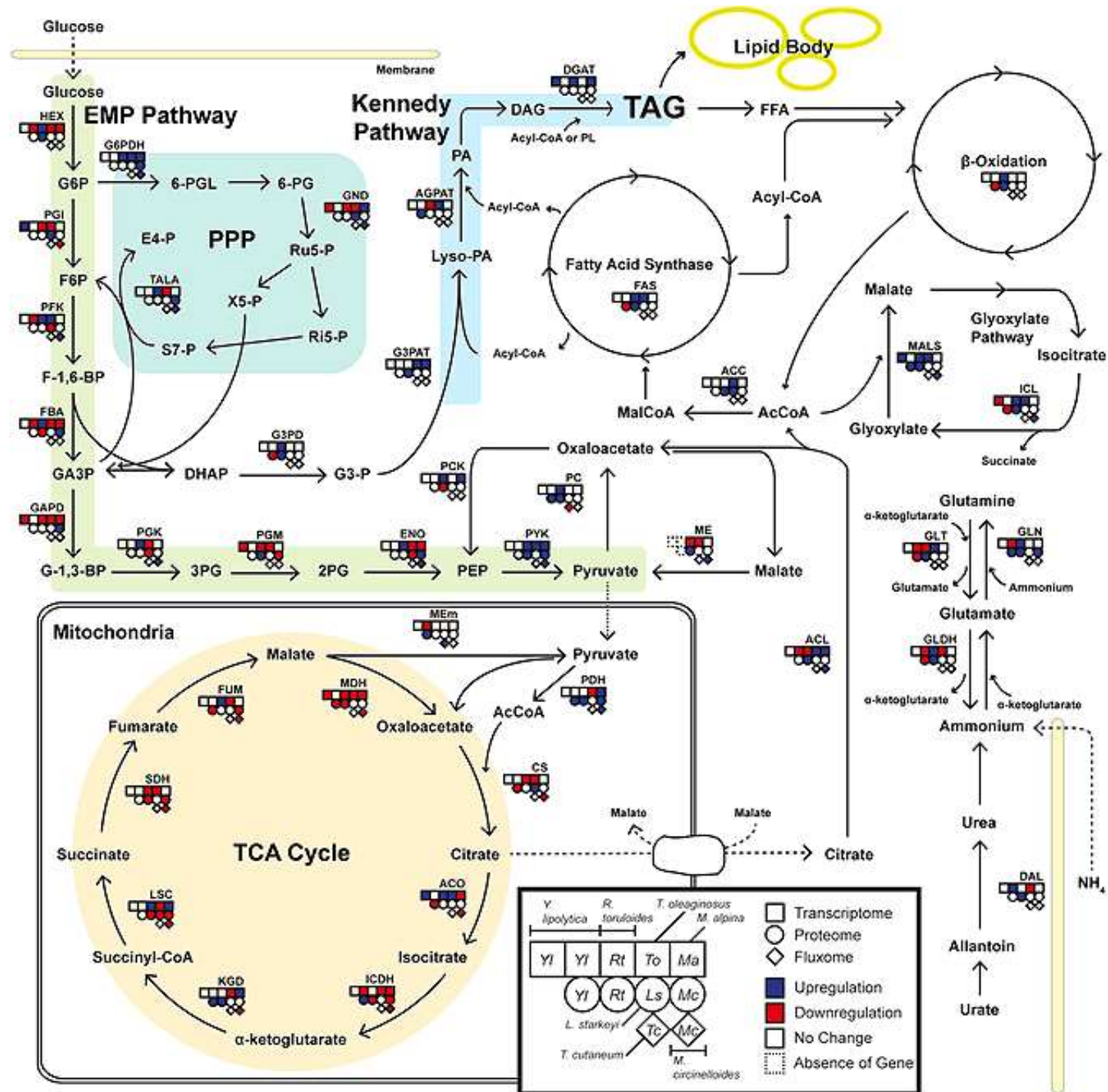


Figura 6. Regulação do acúmulo de lipídios em fungos oleaginosos baseado em dados de transcriptômica, proteômica e fluxômica. As espécies analisadas foram *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula toruloides*, *Cutaneotrichosporon oleaginosum*, *Mortierella alpina*, *Lypomyces starkeyi* e *Mucor circinelloides*. Tomado de PARK *et al.* (2017).

Outra via metabólica chave identificada no mapa proposto por PARK *et al.* (2017) é a rota de Kennedy (ou via Diacilglicerol fosfato), que tem sido observada como superexpressa em produção de lipídios *ex novo*. PARK *et al.* (2017) sugerem que a superexpressão dessa rota se deve ao redirecionamento do fluxo metabólico devido à subexpressão da glicólise e não pela superexpressão em si. Juntos, Diacilglicerol o-acyltransferase e acetil-CoA carboxilase são focos de estudos para melhoramento da produção de lipídios (TAI *et al.*, 2013, QIAO *et al.*, 2015).

A produção de NADPH, chave para a biossíntese de lipídios, foi proposta como sendo realizada através da enzima málica. Porém, no mapa proposto por PARK *et al.* (2017) não foi observada uma expressão coerente. Desta forma, foi proposto que glicose-6-fosfato-desidrogenase possa ser um importante gerador de NADPH ao ser superexpressa significativamente (ZHANG *et al.*, 2013, RATLEDGE 2014).

Finalmente, as rotas do glioxilato e assimilação de nitrogênio são mostradas com mudanças nas comparações de transcriptômica e proteômica (Figura 6). Mesmo não fazendo parte do metabolismo central, têm sido alvo recente para produção de lipídios.

Fatores que influenciam o acúmulo de lipídios

Razão C/N

A maioria de leveduras oleaginosas conhecidas acumula mais lipídios quando a razão Carbono/Nitrogênio atinge certo ponto (variável dependendo da linhagem), e o acúmulo de lipídio é desencadeado quando o nitrogênio é esgotado do meio de cultivo (SANTAMAURO *et al.*, 2014). Por exemplo, KRAISINTU *et al.* (2010) mediram a biomassa seca e produção de lipídios de *R. toruloides* DMKU3-TK16 sob várias condições, incluindo a razão C/N. O incremento da razão C/N diminuiu a biomassa celular, porém, incrementou o conteúdo lipídico. Quando a razão molar foi de 115 (valor considerado alto), a produtividade aumentou somente levemente. Também, devem ser esperadas variações nos valores de conteúdo lipídico se as medidas foram realizadas em diferentes pontos do tempo após o consumo do nitrogênio (GARAY *et al.*, 2016).

OCHOA-ESTOPIER *et al.* (2014) identificaram a proporção exata de C/N para o acúmulo de lipídios e excreção de ácido cítrico em *Y. lipolytica*. Assim, demonstraram que foi possível acumular lipídios sem ter ácido cítrico como subproduto na razão C/N de 0,085 moles de N/moles de C. Também, a presença de mais de uma fonte de carbono no meio afeta grandemente a produtividade. Em *Y. lipolytica*, a razão ótima de C/N para produção de lipídio foi 35 se era usado glicose unicamente, mas foi 180 se combinado com glicerol (WORKMAN *et al.*, 2013).

Uso potencial de resíduos agroindustriais como fontes nutritivas

A utilização de substratos de baixo custo é um dos parâmetros chave para a produção de óleos unicelulares (Single Cell Oil ou SCO, HUANG *et al.*, 2013a). A procura por matéria prima de baixo custo ou que seja negativa em outros processos tem sido considerada para uso como fonte de nutrientes para produção de óleo microbiano. Por exemplo, o glicerol derivado de biodiesel (MOUSTOGIANNI *et al.*, 2015), açúcares industriais (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2010), hidrolisados lignocelulósicos (ECONOMOU *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2013b) e resíduos agroindustriais, tais como água residual de fábrica de azeite (BELLOU *et al.*, 2014; YOUSUF *et al.*, 2010), efluentes de fábricas de óleo de palma (SAENGE *et al.*, 2011), esgotos sólidos (GHANAVATI *et al.*, 2015), lama de esgoto (ANGERBAUER *et al.*, 2008), águas residuais da fermentação de butanol (CHEN *et al.*, 2012), entre outros. Assim, a bioconversão de resíduos a lipídios poderia reduzir o custo de produção e ao mesmo tempo, impedir que resíduos altamente poluentes atinjam o ambiente (AROUS *et al.*, 2016).

Glicerol, um subproduto da indústria de biodiesel, tem sido mostrado como uma fonte de carbono promissora para produção de óleo microbiano em muitas leveduras oleaginosas. Porém, a forma pura do glicerol como matéria prima para produção de lipídios em leveduras possui custo proibitivo para produção em grande escala (LEIVA-CANDIA *et al.*, 2014). Por este motivo, o uso de glicerol bruto derivado da produção de biodiesel como matéria prima para produção de lipídios por leveduras encontra-se no foco das pesquisas nos últimos anos (PAPANIKOLAOU & AGGELIS, 2002; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008a; AMARETTI

et al., 2010; SESTRIC *et al.*, 2014). MUNCH *et al.* (2015) não observaram efeitos negativos para duas espécies de *Rhodotorula* quando compararam a metabolização de glicerol derivado de biodiesel e glicerol puro. A produção de biomassa seca foi maior usando glicerol residual derivado de biodiesel, porém o acúmulo de lipídios foi menor. A explicação oferecida por MUNCH *et al.* (2015) para este resultado foi que impurezas, como ácido oléico presente no glicerol derivado de biodiesel, melhoraram os níveis de biomassa ao agirem como surfactante na fermentação e, subsequentemente, ajudaram a assimilação de nutrientes pelas células. Outra possibilidade de aumento na produção de biomassa é a presença de sais inorgânicos, oferecendo um efeito positivo. Além disso, a combinação de glicerol bruto combinado com outros resíduos, tais como hidrolisados de sementes oleaginosas da mesma indústria de biodiesel, tem sido testada como matéria prima para produção de óleo microbiano com resultados promissores (LEIVA-CANDIA *et al.*, 2014).

AROUS *et al.* (2016) avaliaram a produção de lipídios usando bebidas de soda fora da validade e resíduos de fábricas de óleo ou soro de queijo como substrato para *Debaromyces etchellsii*, removendo até 58,35% da demanda de oxigênio químico (COD) dos resíduos e produzindo 1,2g/L de lipídios. O amido de mandioca também foi testado para produção de lipídios usando duas leveduras em co-cultivo: uma levedura oleaginosa, *R. toruloides*, e uma levedura produtora de amilase imobilizada, *Saccharomycopsis fibuligera*, alcançando 65% (p/p) de lipídios, sugerindo um potencial uso desse resíduo para a produção de óleo (GEN *et al.*, 2014).

Minerais e outros fatores de crescimento

Os efeitos de compostos contendo fósforo ou enxofre não têm sido estudados extensivamente na produção de lipídios. Entretanto, LUNDIN (1950) e RATTRAY & SCHEIBECI (1975) sugeriram que existe, ao menos, algum efeito.

Algumas leveduras podem crescer em meios livres de vitaminas porque conseguem sintetizá-las, sendo mais comum entre basidiomicetos do que ascomicetos (KURTZMAN *et al.*, 2011a). Por exemplo, leveduras oleaginosas do gênero *Myxozyma* requerem meios suplementados com vitamina (KURTZMAN & SMITH, 2011), enquanto que a maioria das espécies de *Rhodotorula* conseguem sobreviver sem a suplementação (KURTZMAN *et al.*, 2011).

pH e temperatura

Em uma escala industrial, o controle de pH adiciona custos na produção (SITEPU *et al.*, 2014). Em geral, o pH do meio de cultivo baixa durante o crescimento e produção de lipídios. Porém, não têm sido observados efeitos deletérios do pH baixo no processo de acúmulo de óleo em leveduras oleaginosas (TURCOTTE & KOSARIC, 1989). Também, operar a baixas temperaturas (inferior a 20 °C) em uma escala de produção é proibitivo devido à necessidade de esfriamento e encarecimento deste processo (SITEPU *et al.*, 2014). Nesse caso, a temperatura ótima de produção em escala industrial será aquela que exija menor fornecimento de energia (20-26°C).

Métodos para extração e/ou quantificação de óleo

Duas metodologias gerais são usadas para avaliar a capacidade acumuladora de lipídios em leveduras. A metodologia tradicional, ou baseada em extração de lipídios usando solventes orgânicos, e a metodologia baseada em fluorescência, na qual a triagem é realizada pela avaliação do conteúdo lipídico diretamente dentro da célula.

Método gravimétrico

Dois protocolos são usados amplamente para extração de lipídios totais em leveduras. Os métodos de BLIGH & DYER (1959) e FOLCH *et al.* (1957) consistem na separação da fase lipídica de outras macromoléculas usando solventes orgânicos como metanol e clorofórmio em diferentes proporções. O resultado deve ser interpretado como relativo à biomassa seca produzida pela levedura. Diversas variáveis-resposta podem ser calculadas a partir desse tipo de metodologia, entre as quais se destacam a massa de lipídios totais por unidade de massa celular ou massa de lipídios totais por unidade de volume/massa de células secas por hora. Finalmente, a oleaginicidade é determinada como a percentagem em peso seco da produção de lipídios sobre a biomassa celular (SITEPU *et al.*, 2014). Outras unidades descritas na literatura são massa final de lipídios por litro de cultura, produção de lipídio por dia, proporção de carbono adicionado convertido a lipídio, entre outros (SITEPU *et al.*, 2014). A Tabela 3 mostra as principais medidas e unidades calculadas para produção de lipídios usando metodologias de extração de lipídios com solventes orgânicos.

Tabela 3. Unidades usadas para descrever produção de lipídios em leveduras. Tomado de SITEPU *et al.* (2014).

Medidas de lipídios	Definição	Unidades
Produção de biomassa celular	Quantidade de biomassa celular microbiana relativa ao volume de cultivo	Grama de biomassa celular seca por litro de cultivo (g/L)
Rendimento de biomassa celular	Proporção de biomassa celular produzida relativa ao açúcar consumido	Gramas de levedura por gramas de açúcar consumido (g/g)
Conteúdo lipídico	Peso do lipídio extraído relativo ao peso da biomassa celular seca	% (p/p), gramas de lipídio por 100g de levedura seca.
Rendimento de lipídio	Lipídio produzido relativo a carbono adicionado ou carbono consumido, expressado como proporção.	Gramas de lipídio por grama ou 100g de carboidrato consumido (g/g) ou por grama ou 100g de glicose inicial no meio (g/g).
Produção de lipídios	Produção de lipídios por volume de cultivo.	Grama de lipídio por litro de cultivo (g/L).
Produtividade	Taxa de produção de óleo.	Massa ou volume de lipídio por volume de cultivo por tempo: gramas de lipídio por litro por dia (g/L/d), gramas de lipídio por m ³ por dia para biorreatores (g/m ³ /d), etc.
Taxa específica de formação de lipídios	Taxa de acúmulo de lipídios relativo à biomassa celular	Gramas de lipídio por hora por grama de células (g/h/g)

Uma das principais desvantagens da extração de lipídios é o rompimento da parede celular (SITEPU *et al.*, 2014), que é, em alguns casos, um passo crítico para a determinação correta das unidades descritas na Tabela 3. Várias técnicas têm sido desenvolvidas para o rompimento eficiente da parede, tais como

congelamento em nitrogênio líquido, ultrassom, pérolas de vidro, rompimento enzimático, homogenizadores, entre outros (DALLE DA ROSA *et al.*, 2014, BYREDDY *et al.*, 2015). A maioria das extrações lipídicas requer a desidratação da biomassa para uma maior eficiência da separação de fases por solventes orgânicos. Porém, YELLAPU *et al.* (2016) sugeriram o rompimento da parede com N-lauroil sarcosina (N-LS) assistida com clorofórmio e metanol, com uma eficiência de extração de 95,43% (p/p) em 10min de processo, na qual a temperatura de incubação e a concentração de N-LS/g de biomassa seca foram os parâmetros mais importantes. Assim, espera-se que novas tecnologias, como a proposta por YELLAPU *et al.* (2016), permitam otimizar o procedimento de rompimento de células. No mesmo sentido, BREIL *et al.* (2016) propuseram avaliar novos solventes para substituir o hexano no método gravimétrico usando simulações de solvatação e solubilidade, sugerindo que este passo pode ser otimizado também com solventes menos agressivos para o meio ambiente.

Métodos baseados em fluorescência

Vários corantes hidrofóbicos ou lipofílicos são usados para visualizar os corpos lipídicos dentro das células de levedura, usando instrumentos como espectrofluorímetros ou microscópio de fluorescência (ELLE *et al.*, 2010; YEN *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2011; FINK *et al.*, 2012; RADULOVIC *et al.*, 2013;). A Tabela 4 mostra os diferentes corantes e metodologias usadas para visualizar corpos lipídicos em leveduras.

Tabela 4. Corantes lipofílicos para detectar lipídios intracelulares. Modificado de SITEPU *et al.* (2014).

Corante e condição requerida para detecção de lipídio	Taxon	Instrumento	Vantagem ou desvantagem
BODIPY 505/515	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i> (PATEL <i>et al.</i> , 2014)	Microscopia de fluorescência	Não acontece fotobranqueamento. Somente cora corpos lipídicos (GOVENDER <i>et al.</i> , 2012)
BODIPY 493/503	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (SANTOMAURO <i>et al.</i> , 2014)	Citômetro de fluxo	
Vermelho de Nilo, emissão máxima após 5min de adição, 488nm	<i>L. starkeyi</i> , <i>R. toruloides</i> , <i>C. curvatus</i> (KIMURA <i>et al.</i> , 2004)	Espectrofluorometria (KIMURA <i>et al.</i> , 2004, SITEPU <i>et al.</i> , 2012, POLI <i>et al.</i> , 2014a), microscopia de fluorescência (POLI <i>et al.</i> , 2013, DALLE DA ROSA <i>et al.</i> , 2014)	Forte perda da fluorescência (minutos), solvatocromismo, amplo espectro de emissão e excitação (KIMURA <i>et al.</i> , 2004, RADULOVIC <i>et al.</i> , 2013), quantificação por curva de calibração (POLI <i>et al.</i> , 2014a, esta tese), triagem de alto desempenho (SITEPU <i>et al.</i> , 2012, POLI <i>et al.</i> , 2014a), possibilidade de observação de lipídios polares (MAK <i>et al.</i> , 2012).
	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	Análise de imagens de alto conteúdo (HCA), microscopia confocal de escaneamento por laser.	Avalia a dinâmica de acúmulo de lipídios em uma célula simples, processo automatizado (CAPUS <i>et al.</i> , 2016).
Sudan Black B, Absorbância 580nm	<i>L. starkeyi</i> , <i>C. curvatus</i> , <i>C. cutaneum</i> (EVANS <i>et al.</i> , 1985), <i>R.</i>	Técnica do repicador	Não funciona com leveduras pigmentadas (EVANS <i>et al.</i> , 1985)

Corante e condição requerida para detecção de lipídio	Taxon	Instrumento	Vantagem ou desvantagem
Oil red O, 543 ou 561nm de excitação, 550-570 ou 570-650nm de emissão	<i>glutinis</i> (DAI <i>et al.</i> , 2007) <i>S. cerevisiae</i>	Microscopia fluorescência	de As células precisam ser fixadas (ADEYO <i>et al.</i> , 2011).

Apesar que as metodologias de fluorescência apresentarem variações entre as linhagens analisadas e na literatura reportada, várias vantagens são observadas quando comparadas com o método gravimétrico (POLI *et al.*, 2014a):

(1) Tempo curto para preparação das amostras e análise. Por exemplo, a metodologia gravimétrica restringe a avaliação para até seis amostras (dois tratamentos em triplicata) por um técnico em um dia de trabalho. Além disso, deve ser incluído o tempo de processamento *overnight* (tempo total: 21h). Usando a técnica de fluorescência *high-throughput*, podem ser processadas 96 amostras em um fluorímetro leitor de placas em até 4h de trabalho. Além disso, pode ser avaliada uma leitura cinética mais do que em um tempo determinado, permitindo assim saber qual o tempo onde o acúmulo de lipídio é máximo para cada linhagem (SITEPU *et al.*, 2012). Em alguns casos, pode ser eliminado até o passo de lavagem com PBSKCl, dependendo do meio que foi usado para o acúmulo de lipídios (sem autofluorescência, SITEPU *et al.*, 2012).

(2) Quantidades e tipos de solventes amigáveis para o meio ambiente: O método gravimétrico precisa de metanol e clorofórmio (razão 1:2 respectivamente),

enquanto que a fluorescência precisa de volumes em termos de microlitros de Acetona (para dissolver o corante) e de isopropanol (para melhorar a penetração do corante na célula). Também, se eliminam vários passos de centrifugação e evaporação de solventes, pelo que a fluorescência emprega solventes menos agressivos e demandantes de energia.

(3) Possibilidade de automatização: A possibilidade de realizar uma triagem de leveduras oleaginosas de alto desempenho faz com que a fluorescência seja mais rápida que a metodologia gravimétrica para processos de triagem de leveduras oleaginosas.

OBJETIVO

Objetivo geral

Selecionar e caracterizar uma nova linhagem de levedura oleaginosa.

Objetivos específicos

- Selecionar uma linhagem de levedura oleaginosa a partir da coleção de culturas isoladas de plantas no Rio Grande do Sul, Brasil. ;
- Otimizar as condições de cultivo para produção de lipídios para uma levedura oleaginosa promissora;
- Avaliar o comportamento de diferentes corantes fluorescentes com afinidade lipídica para caracterização da cinética de acúmulo de lipídios na levedura selecionada usando espectrofluorimetria.

CAPITULO 1**TRIAGEM “HIGH THROUGHPUT” E REPORTAGEM DE QUATRO NOVAS
LEVEDURAS OLEAGINOSAS ISOLADAS NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO
DE *Papiliotrema flavescens* BI281.**

Mauricio Ramírez-Castrillón, Victoria P. Jaramillo-Garcia, Priscila Dallé da Rosa,
Melissa Fontes Landell, Mariana F. Fabricio, Marco Antônio Záchia Ayub, João
Antonio Pegas Henriques, Duong Vu, Vincent Robert, Patrícia Valente

Submetido à revista

Frontiers in Microbiology

**THE OLEAGINOUS YEAST *Papiliotrema flavescens* BI281 AS A NEW
POTENTIAL BIODIESEL FEEDSTOCK: SELECTION AND LIPID PRODUCTION
OPTIMIZATION**

Mauricio Ramírez-Castrillón^{1,2,3}, Victoria P. Jaramillo-Garcia¹, Priscila Dallé da Rosa⁴, Melissa Fontes Landell⁵, Duong Vu⁶, Mariana F. Fabricio⁷, Marco Antônio Záchia Ayub⁷, Vincent Robert⁶, João Antonio Pegas Henriques¹, Patrícia Valente^{2*}

¹Graduate program in Cell and Molecular Biology, Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Research Center in Environmental Basic Sciences (CICBA), Research group in Mycology (GIM), Faculty of Basic Sciences, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.

⁴Graduate program in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS Brazil.

⁵Genetics Section/ICBS, Federal University of Alagoas, Maceió, AL, Brazil.

⁶Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands

⁷Biotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*** Correspondence:**

Patricia Valente da Silva

patricia.valente@ufrgs.br

1.1 Abstract

High-throughput screening methodologies allowed to accelerate the assessment of new oleaginous yeasts with a biodiesel lipid profile. We proposed a new oleaginous yeast *Papiliotrema flavescens* BI281, selected from a Brazilian phylloplane yeast collection. The evaluation of cellular lipid content based on Nile red fluorescence reads using black background 96-wells test plates and a plate reader equipment allowed a rapid intracellular lipid quantification of 43 yeast

strains. The gravimetric determination of total lipids was 52.38% for glucose or 34.97% for pure glycerol (relative to dry weight), confirming as oleaginous strain. The lipid production was optimized obtaining 108mg/L of neutral lipids using pure glycerol as carbon source. The lipid profile showed monounsaturated fatty acids (MUFA) varying between 56 or 74% pure or raw glycerol, respectively. *P. flavescens* BI281 has been reported for the first time as an oleaginous yeast, bearing potential as a new biodiesel feedstock.

Keywords

Biodiesel; fatty acids, raw glycerol; lipid production, Nile Red.

1.2 Introduction

Second-generation biodiesel production employing oleaginous microorganisms (Sitepu *et al.* 2014) is a promising alternative to overcome the critical bottlenecks of the first-generation biodiesel, which uses vegetable oil as raw material and competes with human food. Yeasts are a promising source of microbial oil (Poli *et al.* 2013, 2014a, Sitepu *et al.* 2014), since these microorganisms can accumulate up to 70 % of their dry weight as lipids (Angerbauer *et al.* 2008). Several oleaginous yeasts have been described in literature as potential producers of oil as raw material for biodiesel (Ageitos *et al.* 2011, Duarte *et al.* 2013, Garay *et al.* 2016, Poli *et al.* 2013, 2014b), however biofuel production from yeast oil is not yet a reality. Efforts are necessary to assess new lipid-producing yeasts and to enhance their lipid production to turn yeast oil applications cost-effective.

In the light of these considerations, the main objective of this study was to use a high throughput screening (HTS) method for the comprehensive evaluation of the lipid-accumulating ability of yeast strains isolated in South Brazil. Using the HTS methodology, it was possible to select a new oleaginous yeast, identified as *Papiliotrema flavescens* BI281, and culture conditions were optimized for improving its lipid production.

1.3 Methods

1.3.1 Microorganisms

The yeast strains tested were isolated from the phylloplane of bromeliads (Landell *et al.* 2006) and decomposed macrophytes in the southern region of Brazil (Table S1). We used *Y. lipolytica* QU21 as a reference strain of oleaginous yeast (Poli *et al.* 2013). *S. cerevisiae* CBS 1171 was used as negative control in the experiments. *Papiliotrema flavescens* BI281 was deposited at the Collection of Microorganisms, DNA and Cells of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) under the accession number CM-UFMG-Y6124.

1.3.2 Media

GYP medium (10 g/L yeast extract, 10 g/L peptone, 20 g/L glucose) or YM medium (3 g/L yeast extract, 3 g/L malt extract, 10 g/L peptone, 20 g/L glucose) were used for pre-cultivation of the strains. Media A, A-glycerol, and A-raw glycerol had the following composition: 1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, plus 100 g/L glucose, 15 % (v/v) glycerol or 15% (v/v) raw glycerol,

respectively. Raw glycerol was supplied by an oil-based biodiesel factory (Canoas, Brazil), and contains: (as weight percentage) 82.97 % glycerol, 10.62 % moisture, 5.72 % NaCl, 0.75 % mono-glycerides, and trace-concentration of ashes and residual methanol.

1.3.3 High throughput screening (HTS) methodology

The HTS methodology was based on Sitepu et al. (2012) with modifications. The strains were initially grown in GYP or YM medium for 48 h at 28 °C to obtain metabolically active cells. Afterwards, each strain was transferred to 25 mL of medium A (glucose) in a 125 mL flask and grown for 24 h at 28 °C and 150 rpm. 1 mL of the pre-culture (7×10^7 cells/mL) was inoculated in 75 mL of A medium in a 250 mL flask (to maintain a ratio of 2/3 as free volume as mentioned by Poli *et al.* 2014a) for 72 h, 28 °C and 150 rpm on shaker.

A volume of 2 mL of culture was centrifuged (4,293 *g* for 5 min) and the cell pellet was resuspended in a solution of PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄), isopropanol 5 % (v/v) and Tween 20 in a Critical Micelle Concentration (CMC 0.06 mM). An aliquot of 150 µL (10^7 cells/mL) was transferred to a black background 96-wells test plate (Jet Biofil, China) and the relative fluorescence was measured in a Perkin Elmer Enspire Multimode Plate Reader 2300 equipment (488 nm of excitation, 585 nm of emission). After measuring the basal fluorescence intensity in each sample without dye, we added 50 µL of Nile Red (50 mg/L) to the reaction, incubated inside the equipment for 10 min with shaking, and finally measured the samples with dye. The differences in

readings of the samples with dye, without dye, and the blank (without sample) were the relative fluorescence expressed as RFU (Relative Fluorescence Units). Each sample had technical and biological triplicates. We used *Y. lipolytica* QU21 as positive control, and *S. cerevisiae* CBS 1171 as negative control. We considered strains with RFU equal or higher than QU21 as potential oleaginous yeasts.

1.3.4 Calibration curve

We constructed a calibration curve to obtain an estimation of the lipid content within yeast cells using a triolein solution ($C18:1_{\Delta}^9$, Sigma Aldrich), in the range of 10-50 mg/L dissolved in PBS 1X, isopropanol 5% (v/v), and Tween 20 in CMC (0.06 mM). The lipid content was estimated in comparison with the calibration curve and expressed as mg lipids/ L medium.

1.3.5 Gravimetric determination of biomass

For gravimetric analysis of biomass, we transferred 45 mL of the grown cultures to 50 mL conical tubes, and centrifuged at 4,233 g for 10 min to remove the supernatant, followed by two washings using 15 mL of PBS 1X each time. We dried the cell pellets at 60 °C until constant weight. We measured the biomass using an analytical balance (Shimadzu AY220), and the dry cells were used for lipid extraction. All experiments were performed in triplicate.

1.3.6 Gravimetric determination of total lipids

We extracted the lipids from the biomass following the method of Bligh and Dyer (1959). Dry biomass was suspended in chloroform/methanol (2:1, v/v) and cell lysis occurred using a Turrax homogenizer (ULTRA-TURRAX T18; IKA), with four cycles of homogenizing for 2 min and ice cooling for 1 min to avoid lipid heating. For determination of the total lipid content, solvents were evaporated at 60 °C using a rotatory evaporator (Laborota 4000eco) and dried at 60°C for 24 h. Finally, extracted lipid weight was measured using an analytical balance (Shimadzu AY220). We expressed the lipid yield as concentration (g/L medium), the lipid content as a percentage of the lipid weight relative to dry biomass weight (% w/w) and the productivity as g lipid / (g biomass x h).

1.3.7 Lipid profile

We transesterified the dried lipid extracts following the method of Hartman and Lago (1973). A volume of 1 mL of fatty acid methyl esters (FAME) was transferred to a 2 mL GC vial insert, which contained 0.5 mL of BHT (butylated hydroxytoluene) solution (0.4 mg/mL). The FAME profiling and quantification were performed using a gas chromatograph (GC-2010 PLUS, SHIMADZU) fitted with a split injector and a flame ionization detector (FID) with hydrogen as carrier gas with a flow of 57.1 mL/min, equipped with a SUPELCO SLB-IL100 Capillary GC Column (30 m length, internal diameter of 0.25 mm with fused-silica column coated with a 0.2 µm polyethylene glycol film) (Cat. # 28884-U, Sigma-Aldrich).

Samples of 1.0 μL were injected using a 10.0 μL syringe. The detector temperature was set to 250 $^{\circ}\text{C}$; the carrier gas was hydrogen at a flow-rate of 40 mL/min, an average velocity of 31 cm/sec, and a constant pressure of 46.0 kPa. The airflow was 400 mL/min. Initial temperature was 50 $^{\circ}\text{C}$, increasing to 240 $^{\circ}\text{C}$ at 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, held for 10 min at 240 $^{\circ}\text{C}$.

We processed the peak areas of the fatty acids using GC solution Postrun (version 2.42 SU1, Shimadzu), and determined the fatty acid methyl ester profile of each sample by comparing the retention time of each FAME peak present in the sample with the retention time of FAME reference standards contained in the reference standard mixture SUPELCO SLB-IL100 Capillary GC Column. We included BHT in the GC vial insert for each sample as the internal standard for quantification of fatty acids. We calculated the percentage of total fatty acid content as the ratio of individual FAME peak area to the sum of the all FAME peak areas, excluding the BHT peak.

1.3.8 Optimization of lipid production

We assessed four variables independently to improve the lipid production in *P. flavescens* BI281: carbon source (glucose or glycerol), nitrogen source (malt extract, peptone, tryptone, NH_4NO_3 , and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), time of cultivation (24-120 h) and temperature (20, 26, 28, 30, 37 $^{\circ}\text{C}$). To evaluate the carbon and nitrogen sources, we modified medium A to change the default carbon or nitrogen component in the preparation, respectively. For example, we changed 100 g/L of glucose by 15% (v/v) of glycerol. The response variables were dry biomass (g/L),

optical density (OD_{600 nm}), and lipid production (mg/L estimation from Relative Fluorescence). All experiments were measured in technical and biological triplicates.

Based on the univariate results, we chose three independent variables for the optimization of lipid production with glycerol and ammonium sulfate as carbon and nitrogen sources, respectively, using Central Composite Design (CCD) and Response Surface Methodology (RSM). The dependent variable selected for this study was lipid production (mg/L). The independent variables were cultivation time (X₁), medium C/N ratio (X₂), and stirring (rpm) (X₃). Each variable was studied in three levels (-α, 0, +α) with two axial points (-1.68 α and +1.68 α), and the range and levels of these variables are shown in Table 1.

Table 1. Coded values of independent variables at different levels used in Central Composite Design

Independent variable	Symbol	Level				
		-1.68α	-α	0	+α	+1.68α
Time (hours)	X3	36	48	72	96	120
C/N ratio*	X2	16:1	50:1	100:1	150:1	184:1
Stirring (rpm)	X1	0	50	150	225	276

* Glycerol/Ammonium sulfate ratio in the A-Glycerol medium

The experimental design included 15 runs with three replicates in the central point. The mathematical relationship between the response variable (lipid production) and variables X₁, X₂, X₃ was approximated by a quadratic model equation, according to the general second-degree polynomial equation (1):

$$Z = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

where Z is the predicted response (lipid production, mg/L); β_0 is the intercept, β_i the linear coefficient, β_{ij} the quadratic coefficient, β_{ii} is the linear interaction between X_i and Y_j regression coefficients, and X_i , Y_j are the assessed variables (X_1 , X_2 , X_3) that define the mathematical function of Z . The precision of the above polynomial model was evaluated by the coefficient of determination R^2 , and the statistical significance was determined by the F -test.

1.3.9 Statistical analysis

Statistical analyses of differences between the relative fluorescence units in the screening experiments were evaluated with paired t-student tests compared to positive or negative controls ($P < 0.05$). We compared carbon and nitrogen sources, and temperatures in the univariate tests with analysis of variance (ANOVA) and uncorrected Fishers LSD test ($P < 0.05$). The calibration curve was determined with a linear regression between relative fluorescence units and triolein concentration. Multivariate analysis was performed with a multivariate analysis of variance (MANOVA, $P = 0.05$). We performed a Chi-square test to compare lipid production in the optimal point with the predicted value given by the model. We performed all statistical analyses using the STATISTICA 13 software package (Statsoft, Dell, USA) and plotted the graphics using Prism 7 (GraphPad Software Inc, USA).

1.4 Results

1.4.1 The use of HTS methodology for yeast screening and the selection of *P. flavescens* BI281

A total of 43 yeast strains were screened for lipid production (Table S1). We established two criteria to search for a candidate oleaginous yeast: (1) exponential growth until 72 h and (2) fluorescence intensity in the HTS methodology higher than our positive control (*Y. lipolytica* QU21). Many of the strains assessed showed a delayed growth (19 isolates, sometimes one/two weeks), and were not further tested. After selecting the yeast group with exponential growth up to 72 h, we measured the Fluorescence Intensity using Nile Red dye according to the described HTS methodology to assess the lipid content of cells. We compared the average (technical and biological triplicates) RFU of yeast strains with the average RFU of the positive control (*Y. lipolytica* QU21; black horizontal line) and the negative control (*S. cerevisiae* CBS 1171; red horizontal line) using A-medium for cell growth (Figure 1). *P. flavescens* BI281 and DEC79 strains showed higher RFU than *Y. lipolytica* QU21.

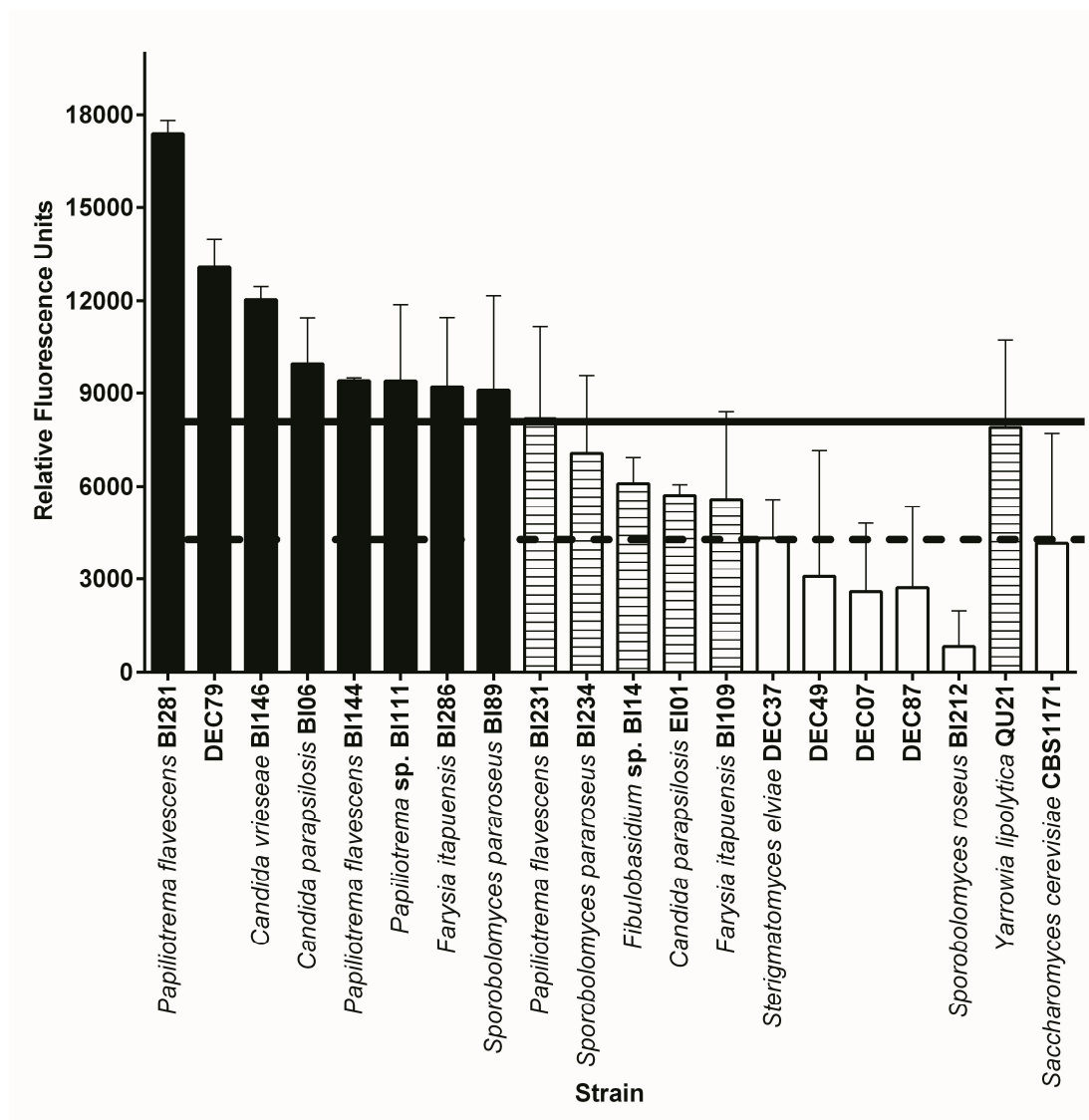


Figure 1.1. Fluorescence intensity of yeast strains grown in medium A using Nile Red dye (50 mg mL⁻¹). Absorption and Emission wavelengths were 488 nm and 585 nm, respectively. The horizontal solid line indicates the average Relative Fluorescence Units (RFU) of the positive control (*Y. lipolytica* QU21) and the horizontal dotted line indicates the average RFU of the negative control (*S. cerevisiae* CBS 1171). Strains with RFU above of positive control are black-filled, strains between positive control and negative control are pattern-filled and strains with RFU below of negative control are not filled. Strains without fluorescence emission were not included in the figure. All experiments were done in biological and technical triplicates.

To quantify the lipid production, we initially correlated a calibration curve of triolein concentrations with the fluorescence intensity with Nile Red, according to Poli *et*

al. (2014b), showing a strong correlation between the variables ($R^2 = 0.9477$, $P=0.001$). Using this calibration curve, the measurements of fluorescence intensity for strains BI281, DEC79, and QU21 (positive control) were transformed in lipid production (mg/L) (Figure S1). This result suggested that *P. flavescens* BI281 and DEC79 (unidentified pigmented species) are candidate oleaginous yeasts, but only BI281 showed higher lipid production than QU21 ($P<0.05$). For this reason, we selected BI281 to optimize the culture media.

1.4.2 Optimization of lipid production by *P. flavescens* BI281 using a HTI approach

We initially assessed four variables to improve lipid production in *P. flavescens* BI281 in independent experiments (univariate approach). First, we analyzed the cultivation time using medium A (glucose) to establish the growth curve and maximum time of lipid production (Figure 2). Secondly, we analyzed different temperatures at 72 h of cell growth (Figure 3a). We found statistical differences for biomass and lipid production (Figure 3b, ANOVA, $P<0.05$). The lowest biomass and lipid production were obtained at 20 °C, compared to other temperatures ($P<0.05$). However, there were no statistical differences between lipid production at 26, 28, 30 or 37 °C (P values between 0.1167-0.7391), and as temperatures between 25 and 28 °C demand less energy input, we chose 26 °C for the following experiments.

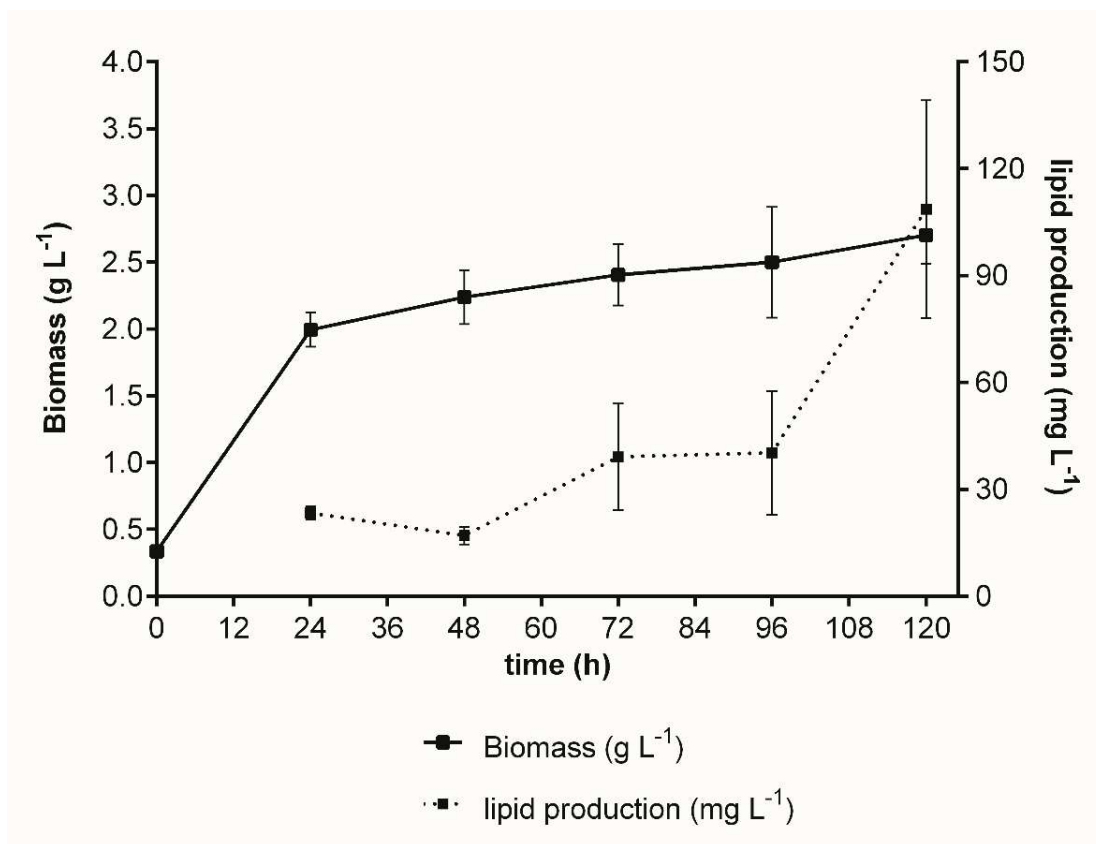


Figure 1.2. Growth curve of *P. flavescens* BI281 using glucose as carbon source. The solid line represents dry biomass (g/L) and the dotted line represents the lipid production (mg L⁻¹). All experiments were done in biological triplicate.

In the following step, we assessed different carbon and nitrogen sources to evaluate the ability of *P. flavescens* BI281 to assimilate, grow, and redirect the nutritional source to lipid production. For this purpose, we changed the composition of A-medium for each carbon or nitrogen source to be tested. We found that glycerol produced higher biomass than glucose (Figure 3c, $P < 0.05$), but we did not find significant differences in lipid production ($P = 0.6290$, Figure 3d). When we tested nitrogen sources, we found a higher biomass production (Figure 3e, $P < 0.05$) with peptone and tryptone, and lower production using malt extract and NH_4NO_3 when compared to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($P < 0.05$). However, no statistical

differences in lipid production were found when peptone (Figure 3f, $P=0.6622$), tryptone ($P>0.99$), or NH_4NO_3 ($P=0.8382$) were compared to ammonium sulfate. Peptone and tryptone are rich and variable sources of protein and amino acids for growing microorganisms (Gray *et al.* 2008), but their stoichiometric nitrogen composition cannot be controlled. For this reason, we decided to use ammonium sulfate as nitrogen source in the following experiments.

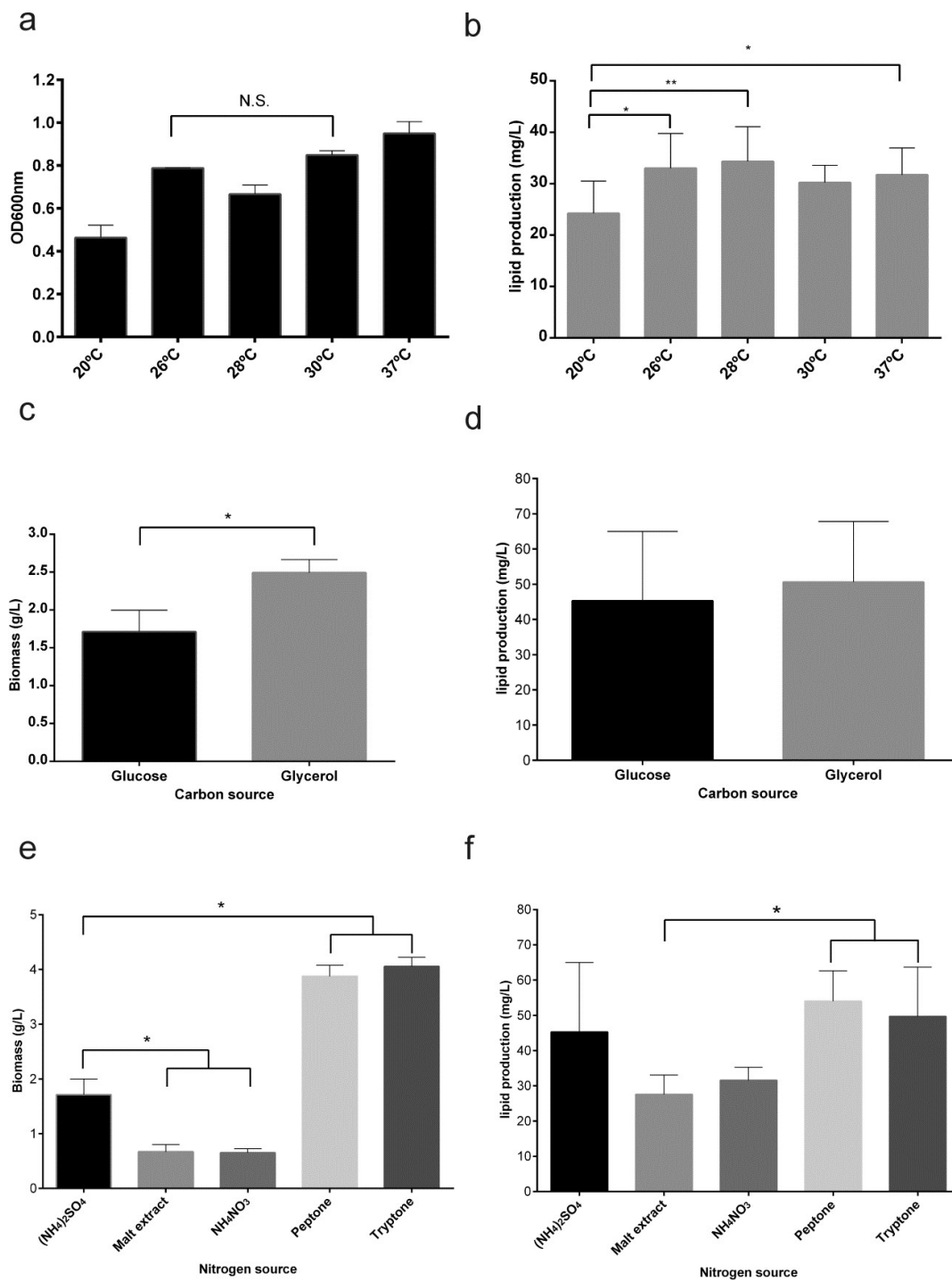


Figure 1.3. (a, b) Comparison of different temperatures in optical density (OD600nm) and lipid production (mg/L) of *P. flavescens* BI281. (c, d) Assessment of glucose and glycerol as carbon source, and (e, f) different nitrogen sources in *P. flavescens* BI281 biomass (g/L) or lipid (mg/L) production after 72 h of cell growth, 26 °C, 150 rpm (medium A). All experiments were assessed independently by biological and technical triplicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, N.S.: Non-significant.

In order to validate the results using the RFU, we determined the lipid yield and productivity gravimetrically (Table 2). We found a strong correlation between the lipid production obtained from fluorescence measurements (in mg/L) and the lipid yield obtained gravimetrically (in g/L) ($R^2 = 0.9958$), validating the measures using fluorescence (data not shown). In all treatments, *P. flavescens* BI281 proved to be a lipid producer (lipid content >37-52% w/w cell dry weight), except when malt extract and NH_4NO_3 were used as nitrogen sources. Moreover, the lipid productivity was highest using glucose in 24 h (Table 2). However, when we compared all the productivities at the same time (96 h), the values were similar (glucose=0.0055g/g/h; glycerol=0.0036g/g/h).

Table 2. *Papiliotrema flavescens* BI281 growth at six different combinations of carbon or nitrogen sources. Biomass (X), lipid production (L), lipid productivity (Y_{\max} L/X/t) and maximum concentration of cellular lipids (L_{\max}) (%), according to total cell dry weight) are represented. All culture media were supplemented with 0.1% KH_2PO_4 and 0.05% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. The culture conditions were 150 rpm, 26°C for 96 h for glucose and 120h for glycerol.

Carbon / Nitrogen source	Time (h)	X (g L ⁻¹)	L (g L ⁻¹)	Lmax (%)	Ymax L X ⁻¹ t ⁻¹ (g/g/h)
Glucose/(NH ₄) ₂ SO ₄	24	1,9953±0,1275	1,5247±0,2659	76,4116	0,0318
	48	2,2380±0,2008	1,4770±0,2984	65,9964	0,0137
	72	2,4067±0,2299	1,0580±0,6633	43,9612	0,0061
	96	2,5007±0,4146	1,3100±0,2348	52,3860	0,0055
glycerol/(NH ₄) ₂ SO ₄	24	2,3733±0,0811	0,6266±0,0277	26,4266	0,0110
	38	3,6944±0,1195	0,6353±0,0810	17,41396	0,0046
	48	4,2649±0,2804	0,7688±0,0539	18,7609	0,0039
	72	5,0889±0,4714	0,7590±0,0984	14,14572	0,0020
	96	3,5633±0,3523	1,2362±0,0387	34,97386	0,0036
	120	5,5484±1,1415	1,3450±0,3687	22,10171	0,0018
Glucose/Malt extract	96	0,9747±0,1897	0,5400*	ND	0,0077*
Glucose/NH ₄ NO ₃	96	0,9473±0,1099	0,1393±0,0133	14,71	0,0020±0,0017
Glucose/Peptone	96	5,6580±0,2910	2,6613±0,1453	47,04	0,0065±0,0069
Glucose/Tryptone	96	5,9173±0,2453	2,8953±0,2404	48,93	0,0068±0,0136

*Value without triplicate. For this reason, the estimation of L_{\max} is not shown (ND)

1.4.3 Optimization of lipid production by *P. flavescens* BI281

After defining the best combination of carbon and nitrogen sources and the temperature of incubation, we designed a multivariate experimental design (CCD) to improve the lipid production in *P. flavescens* BI281. Table 1 shows the maximum and minimum levels of variables chosen for trials in the CCD. The experimental responses are presented in Table 3, showing considerable variations in the amount of lipid production depending on the three independent variables tested. The response variable, lipid production expressed in RFU, was transformed to mg/L according to the calibration curve and varied from 10.13 mg/L to 198.79 mg/L. As shown in Table 3, there was a correspondence between observed and predicted values of the above parameters.

Table 3. Experimental design to improve *P. flavescens* BI281 lipid content, and comparison of observed data, data predicted by the model and residues.

Run	Time (h)	C/N ratio	Stirring (rpm)	Lipid production (mg/L)		Residues
				Observed value	Predicted value	
4 (c)	72	100:1	150	100.4719	126.4801	-26.0082
2	72	100:1	276	184.5952	162.8444	21.7508
12	96	50:1	225	57.2506	57.1579	0.0927
14	96	150:1	225	192.5581	185.1536	7.4045
5 (c)	72	100:1	150	198.7951	126.4801	72.3150
6 (c)	72	100:1	150	106.1470	126.4801	-20.3331
15	72	100:1	24	142.7192	90.1158	52.6034
8	72	16:1	150	16.8804	5.4506	11.4298
10	48	50:1	75	55.7712	113.4219	-57.6507
1	48	150:1	75	111.6914	119.8489	-8.1576
13	48	150:1	225	192.5581	190.2689	2.2892
16	32	100:1	150	110.2632	134.2331	-23.9699
9	112	100:1	150	14.0873	69.6156	-55.5284
11	96	50:1	75	72.8236	40.9963	31.8273
3	96	150:1	75	10.1330	18.1979	-8.0648

The experimental results of the CCD were fitted with a second-order polynomial regression. The values of the regression coefficients were calculated, and the fitted equation for predicting lipid production was simplified as equation (2):

$$Z=154.819-0.015X_1^2+1.433X_2+0.010X_3X_2-252.307 \quad (2)$$

where Z is the lipid production (in mg/L) and X₁, X₂, and X₃ are the variables expressed in Table 1. Fitting the above-optimized concentrations of the variables to Eq. (2), the model predicted that the lipid production could reach 264.7 mg/L. The MANOVA for lipid production (in mg/L) showed R² = 0.8306 (Table 4). To confirm the model adequacy for predicting maximum lipid production, three additional experiments using the optimum medium composition and cultivation conditions were performed. Biological triplicate experiments (with technical replicate) yielded an average highest lipid production of 169.51±18.13 mg/L. A Chi-square test between the predicted (126.48 mg/L) and experimental results showed a higher value in the experimental results (Chi-Square = 100.8339 df = 5 P<0.05), suggesting it is possible that *P. flavescens* BI281 can produce higher values than expected, possibly because of adaptation of the strain to the optimized medium (sub-culturing effect). As shown in Table 4, C/N ratio (positive linear effect), time of incubation (negative quadratic effect), and interaction of stirring and C/N ratio (positive effect) were statistically significant (P<0.05) on the model to determine lipid production. Therefore, the three-dimensional plot of the combined different C/N ratios by time of cultivation (Figure 4a), and C/N ratio by stirring (Figure 4b) centered in the optimal conditions were constructed with the model.

Higher C/N ratios and higher agitation speed positively affect the lipid production.

However, if the C/N ratio is lower than 80:1, the lipid production tends to decrease.

Table 4. Analysis of variance for the fitted quadratic polynomial model for optimization of cellular lipid production ($P < 0.05$). $R^2 = 0.8306$

Factor	SS*	df	MS	F	P
time (hours)(Q)	11500.52	1	11500.52	7.57393	0.028419
C/N ratio(L)	25209.70	1	25209.70	16.60243	0.004722
C/N ratio(Q)	4653.90	1	4653.90	3.06494	0.123468
stirring (rpm)(L)	104.96	1	104.96	0.06912	0.800186
time by C/N ratio	5893.70	1	5893.70	3.88143	0.089473
time by stirring	2386.91	1	2386.91	1.57196	0.250172
C/N ratio by stirring	12031.24	1	12031.24	7.92345	0.025964
Error	10629.04	7	1518.43		
Total SS	62746.97	14			

Q, quadratic effect; L, linear effect; SS, sum of squares; df, degrees of freedom; MS, mean squares.

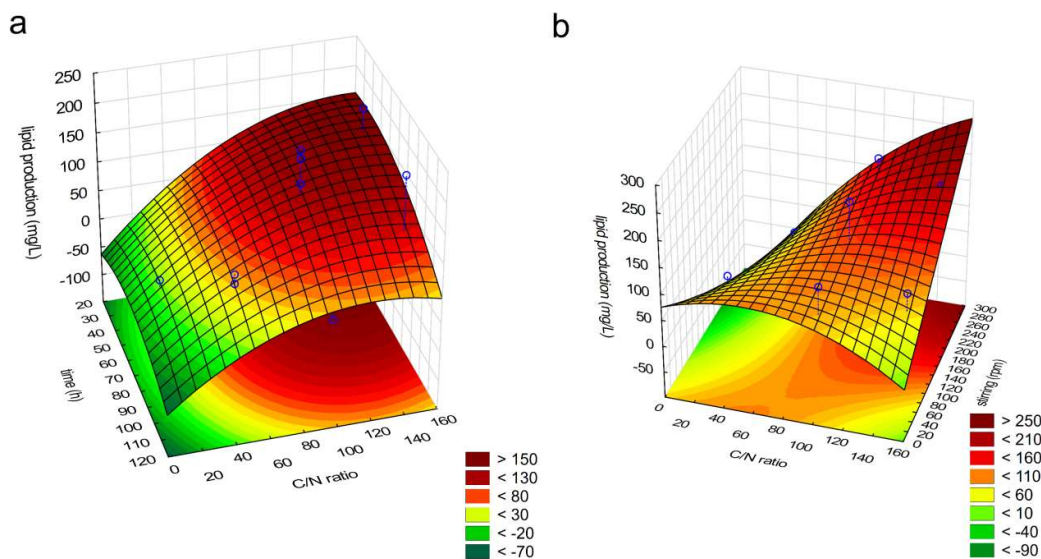


Figure 1.4. (a) Response surface plot for the effect on time cultivation, C/N ratio and their mutual effect on the lipid production in *P. flavescens* BI281. (b) Response surface plot for the effect on C/N ratio, stirring (rpm) and their interaction on the lipid production for *P. flavescens* BI281.

To validate the experimental design, we ran the growth kinetics of *P. flavescens* BI281 using the C/N ration and stirring in optimized conditions. The kinetics of BI281 changed slightly depending on the carbon source. The growth kinetics in glucose (Figure 2) showed that cells reached the stationary phase in 24 h. On the other hand, cells grown in glycerol reached the stationary phase in 48h with a maximum lipid production of 108.65 ± 30 mg/L in 120 h. Our results suggested that cells grown in glycerol 15% (v/v) (A-glycerol medium) by 120h was the optimized point of lipid production based on the proposed model. The production was three times higher than non-optimized conditions using A medium (glucose 10% v/v, 72h) (108.65 mg/L > 43.96 mg/L).

The FAME lipid profiles of *P. flavescens* BI281 were assessed in medium A-glycerol and A-raw glycerol, with results shown in Table 5. Also, we measured biomass and lipid production in 12 days of grown (Figure 5). The main types of FAME were monounsaturated fatty acids (MUFA), varying in a range of 35-73 % of total FAME, and saturated fatty acids (SFA), representing around 21 to 51% of total FAME. A low percentage of poly-unsaturated fatty acids were produced (4-15%). The main fatty acid methyl ester found in 5 days of growth was oleic acid (C18:1n9, 48.76%), which is completely converted to elaidic acid (C18:1n9 trans) in 12 days (53.70%). Palmitic, palmitoleic, and linolelaidic acids were present in all samples and replicates.

Table 5. Fatty acid methyl esters profile of lipids produced by *P. flavescens* BI281 grown in pure glycerol (5 and 12 days) or raw glycerol (12 days). Experiments were done in triplicate and values are presented in percentage (% average \pm standard deviation).

	Pure glycerol 5 days	Pure glycerol 12 days	Raw glycerol 12 days
Lauric acid (C12:0)	8.0685**	N.D.	N.D.
Palmitic acid (C16:0)	25.7457**	24.3570 \pm 10.31	15.2358 \pm 1.17
Palmitoleic acid (C16:1)	N.D.*	7.8320 \pm 1.33	7.4302 \pm 0.01
cis-10-Heptadecenoic acid (C17:1)	N.D.	N.D.	6.4178 \pm 0.74
Stearic acid (C:18:0)	34.1755 \pm 10.23	13.7788 \pm 3.03	6.4160 \pm 1.37
Elaidic acid (C18:1n9 <i>trans</i>)	N.D.	53.7056 \pm 8.29	59.84 \pm 0.68
Oleic acid (C18:1n9 <i>cis</i>)	48.7601 \pm 13.91	N.D.	N.D.
Linolelaidic acid (C18:2n6c)	8.1370**	11.0562 \pm 9.56	4.6632 \pm 0.15
γ -Linolenic acid (C18:3n3)	4.2056**	N.D.	N.D.
SFA*	51.29	34.44	21.65
MUFA*	35.11	55.57	73.68
PUFA*	15.08	9.98	4.66

*SFA: Saturated fatty acid, MUFA: Mono unsaturated fatty acid, PUFA: Poly unsaturated fatty acid, N.D.: Non-detected.

**Fatty acid methyl ester was detected only in one sample.

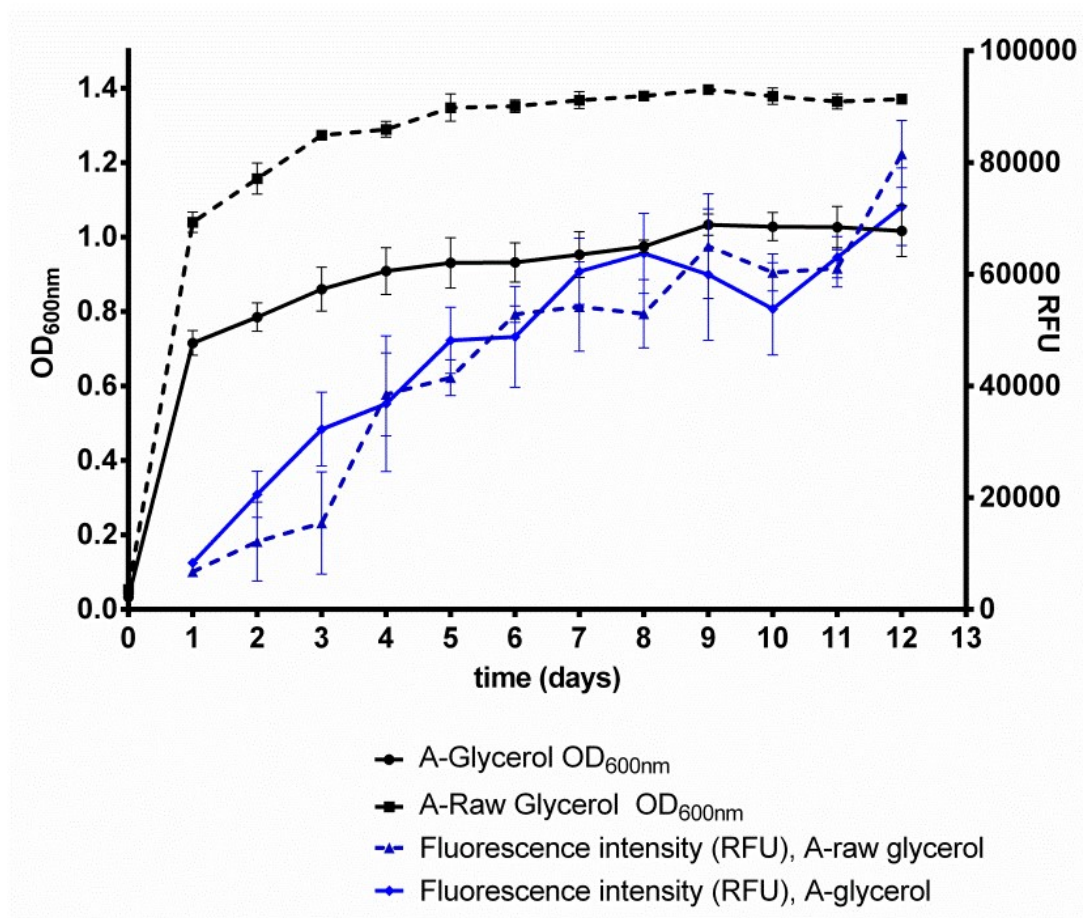


Figure 1.5. Growth curve (OD_{600nm}) and kinetics of lipid production (mg L⁻¹) of *P. flavescens* BI281. The solid lines indicate pure glycerol and dotted lines indicate raw glycerol. The experiments were measured in biological triplicate (average ± standard deviation) for 12 days. Samples in 5th day and 12th day were taken for lipid extraction, transesterification and profiling.

1.5 Discussion

Brazilian biomes represent important hotspots of species richness on the planet, with a microbial biodiversity still largely unknown or unexplored for biotechnological purposes. Yeasts are promising microbial resources to produce various compounds, including lipids, which are of great interest for biodiesel and food industries. In this sense, some Brazilian ecosystems were assessed for the

isolation of lipid-producer yeasts, such as Cerrado, Amazon Forest, and Pantanal (Duarte *et al.* 2013). Vieira *et al.* (2014) assessed wild yeasts to produce microbial lipids using Brazilian molasses as raw material to accumulate fatty acids. In our group, we previously analyzed yeasts isolated from artisanal cheese as lipid producers for biodiesel or feed supplement (Poli *et al.* 2013, 2014b, Mattanna *et al.* 2014a, 2014b), or as model for lipid metabolism studies (Rosa *et al.* 2014, 2015). In the present study, we assessed a Brazilian collection of yeasts isolated from the phylloplane of bromeliads and macrophytes, and selected the oleaginous yeast *P. flavescens* BI281.

P. flavescens (formerly *Cryptococcus flavescens*, Liu *et al.*, 2015), a Tremellomycetes yeast, has not been reported as oleaginous before. Other taxa within the Tremellomycetes had been studied as oleaginous yeasts, such as *Cutaneotrichosporon curvatus* (*Cryptococcus curvatus*), *Cutaneotrichosporon terricola* (*Cryptococcus terricola*), *Papiliotrema laurentii* (*Cryptococcus laurentii*), *Solicoccozyma aerius* (*Cryptococcus aerius*), and *Cryptococcus* sp. (Polburee *et al.* 2015, Ghanavati *et al.* 2015, Chang *et al.* 2015). Kurtzman *et al.* (2015) stated that an overview of closely related species of well reported oleaginous yeasts may have a predictive value for the prospection of biotechnologically relevant new strains. The genus *Papiliotrema* includes reported oleaginous yeast species, such as *P. aureus* and *P. laurentii* (Sitepu *et al.* 2014), and we showed that *P. flavescens* is also oleaginous. Our results were comparable with literature reporting oleaginous yeast belonging to the order Tremellomycetes. For example, Polburee *et al.* (2015) reported lipid content between 18 and 64% (w/w) (*C.*

curvatus CBS570, and *Saitozyma podzolicus* DMKU-PTC7, respectively) using glycerol as carbon source. Also, Ghanavati *et al.* (2015) reported 30.6% (w/w) of lipid accumulation by *Solicoccozyma aerius* using municipal solid waste as feedstock. Our results also show that other *P. flavescens* strains are potentially oleaginous (like BI144, BI231, see Figure 1), whereas some others are not (such as isolates BI282, BI232, data not shown). It is possible that different genetic backgrounds are related to lipid accumulation.

Glycerol utilization for lipid accumulation is an interesting approach because *P. flavescens* BI281 grew better in glycerol than glucose, producing high yields of lipids, and there is currently a trend to use residual raw glycerol from the biodiesel industries as carbon source in bioprocesses (de Souza *et al.* 2014). Our results suggested that there was no difference in lipid production between growth in pure glycerol or raw glycerol (Figure 5), however, the percentage of Monounsaturated Fatty Acids (relative to total Fatty Acid Methyl Esters) was higher in raw glycerol (after 12 days), suggesting raw glycerol as a good residual feedstock for lipid accumulation. The lipid profile of *P. flavescens* is suitable for biodiesel production, according to the criteria exposed by Sitepu *et al.* (2014).

According to Ageitos *et al.* (2011), the economic feasibility of the fermentation process to produce microbial lipids is determined by the cost of the raw materials in addition to the fermentation process itself. Therefore, minimizing the cost of carbon sources is an important factor that industry considers. A variety of chemical and lignocellulosic sources have been used as feedstock for lipid accumulation,

including glucose (e.g. Li *et al.* 2007, Ratledge 2004), fatty acids (Papanikolaou *et al.* 2001; Ratledge 2004), glycerol (Pan *et al.* 2009), general wastewaters (Poli *et al.* 2014a), and wastewaters of animal fat treatment (Papanikolaou *et al.* 2001). With the ever-growing production of biodiesel in recent years, the annual amount of produced raw glycerol tends to increase in time (Duarte *et al.* 2013), consequently, cultivation of oleaginous yeasts in glycerol-based media is of great interest (Polburee *et al.* 2015).

In conclusion, the applied high-throughput screening methodology allowed a rapid quantification of the cellular lipid production in yeasts, being useful for the screening of oleaginous yeast cells and for the optimization of culture conditions to improve lipid production. *Papiliotrema flavescens* BI281 was reported for the first time as an oleaginous yeast. It has potential to accumulate lipids in glucose or in glycerol as carbon sources, producing up to 52.38% or 34.97% of total lipids (relative to dry weight). Also, the lipid profile showed 56 to 74% of Monounsaturated Fatty Acids in relation to the biomass dry weight in pure or raw glycerol, respectively. We suggest the oil produced by *P. flavescens* BI281 as a new potential biodiesel feedstock.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MR, PV, PD, ML. Performed the experiments: MR, VJ, MF. Analyzed the data: MR, VJ, DV, MA, VR, JH, PV. Wrote the manuscript: MR, PV.

Funding

This work was supported by *Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul* (FAPERGS, Brazil, process 11/2047-0), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Brazil, process 304870/2013-7, 445207/2014-0, 201285/2015-0), and *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnologia e Innovación COLCIENCIAS* (Colombia, Conv. 512).

Acknowledgements

We thank C. Flores, R. Hepp, N. Romanov, H. Dalanhol, M. Guilherme for help with the experiments.

1.8 References

- Ageitos, J.M., Vallejo, J.A., Veiga-Crespo, P., Villa, T.G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90(4), 1219-1227.
- Amaral, P.F.F., Ferreira, T.F., Fontes, G.C., Coelho, M.A.Z. (2009). Glycerol valorization: new biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing*, 87(3), 179-186.

Beopoulos, A., Mrozova, Z., Thevenieau, F., Le Dall, M.T., Hapala, I., Papanikolaou, S., *et al.* (2008). Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(24), 7779-7789.

Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.

Capus, A., Monnerat, M., Ribeiro, L.C., de Souza, W., Martins, J.L., Sant'Anna, C. (2016). Application of high-content image analysis for quantitatively estimating lipid accumulation in oleaginous yeasts with potential for use in biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 203, 309-317.

Chang, Y.H., Chang, K.S., Lee, C.F., Hsu, C.L., Huang, C.W., Jang, H.D. (2015). Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corncob hydrolysate as carbon source. *Biomass Bioenergy*, 72, 95–103.

Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J. Microbiol. Methods*, 77(1), 41-47.

de Souza, E.A., Rossi, D.M., Ayub, M.A.Z. (2014). Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1. *Renew Energy*, 72, 253-257.

Duarte, S.H., Andrade, C.C.P., Ghiselli, G., Maugeri, F. (2013). Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. *Bioresour. Technol.*, 138, 377–381.

Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D., Compagno, C. (2012). Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresour. Technol.*, 111, 398-403.

Garay, L.A., Sitepu, I.R., Cajka, T., Chandra, I., Shi, S., Lin, T., *et al.* (2016). Eighteen new oleaginous yeast species. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.*, 43(7), 887-900.

Ghanavati, H., Nahvi, I., Karimi, K. (2015). Organic fraction of municipal solid waste as a suitable feedstock for the production of lipid by oleaginous yeast *Cryptococcus aerius*. *Waste Manage*, 38, 141–148.

Govender, T., Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F. (2012). BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresour. Technol.*, 114, 507-511.

Gray, V.L., Mu, C.T., Watkins, I.D., Lloyd, D. (2008). Peptones from diverse sources: pivotal determinants of bacterial growth dynamics. *J. Appl. Microbiol.*, 104(2), 554-565.

Hartman, L., Lago, R.C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory practice*, 22(6), 475.

Kimura, K., Yamaoka, M., Kamisaka, Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *J. Microbiol. Methods*, 56(3), 331-338.

Kurtzman, C.P., Mateo, R.Q., Kolecka, A., Theelen, B., Robert, V., Boekhout, T. (2015). Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. *FEMS Yeast Res.*, 15 (6), fov050. Doi: 10.1093/femsyr/fov050

- Landell, M.F., Mautone, J.N., Valente, P. (2006). Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã park, Viamão/RS. *Biociências*, 14(2), 144-149.
- Li, Y., Zhao, Z.K., Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.*, 41(3), 312-317.
- Liu, X-Z., Wang, Q-M., Göker, M., Groenewald, M., Kachalkin, A.V., Lumbsch, H.T., *et al.* (2015). Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Stud. Mycol.*, 81, 85-147.
- Mase, T., Asano, K., Ikeda, Y., Kato, Y., Esaki, H., Isshiki, S. (2013). Characterization and Application of Lipase 39-A from *Cryptococcus flavescens* for Cheese Flavoring. *Food Sci. Technol. Res.*, 19(1), 89-95.
- Mattanna, P., Rosa, P.D., Gusso, A.P., Richards, N.S.P.S., Valente, P. (2014a). Enhancement of Microbial Oil Production by Alpha-linolenic Acid Producing *Yarrowia lipolytica* Strains QU22 and QU137. *Food Sci. Biotechnol.*, 23(6), 1929-1934.
- Matanna, P., Rosa, P.D., Poli, J.S., Richards, N.S.P.S., Daboit, T.C., Scroferneker, M.L., *et al.* (2014b). Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. *R. Bras. Bioci.*, 12, 121-126.
- Pan, L.X., Yang, D.F., Shao, L., Li, W., Chen, G.G., Liang, Z.Q. (2009). Isolation of the oleaginous yeast from the soil and studies of their lipid-producing capacities. *Food Technol. Biotechnol.*, 47, 215–220.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., Marc, I. (2001). Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable

of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80(3-4), 215-224.

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(4), e1204. Doi: 10.1016/j.funbio.2015.09.002

Poli, J.S., Rosa, P.D., Senter, L., Mendes, S.D.C., Ramirez-Castrillon, M., Vainstein, M.H., *et al.* (2013). Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *R. Bras. Bioci.*, 11(2), 203-208.

Poli, J.S., Silva, M.A.N., Siqueira, E.P., Pasa, V.M.D., Rosa, C.A., Valente, P. (2014a). Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. *Bioresour. Technol.*, 161, 320–326.

Poli, J.S., Lützhøft, H.C.H., Karakashev, D.B., Valente, P., Angelidaki, I. (2014b). An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Bioresour. Technol.*, 151, 388–391.

Ratledge, C. (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.

Rosa, P.D., Mattanna, P., Carboni, D., Amorim, L., Richards, N., Valente, P. (2014). *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia Microbiol.*, 59, 477–484.

Rosa, P.D., 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. *R. Bras. Bioci.*, 13(2), 79-83.

Sitepu, I.R., Ignatia, L., Franz, A.K., Wong, D.M., Faulina, S.A., Tsui, M., *et al.* (2012). An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *J. Microbiol. Methods*, 91(2), 321-328.

Sitepu, I.R., Garay, L.A., Sestric, R., Levin, D., Block, D.E., German, J.B., *et al.* (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnol. Adv.*, 32(7), 1336-1360.

Spier, F., Buffon, J.G., Burkert, C.A.V. (2015). Bioconversion of Raw Glycerol Generated from the Synthesis of Biodiesel by Different Oleaginous Yeasts: Lipid Content and Fatty Acid Profile of Biomass. *Indian J. Microbiol.*, 55(4),415–422.

Tchakouteu, S.S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A.A., Aggelis, G., Papanikolaou, S. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *J. Appl. Microbiol.*, 118, 911-927.

Thompson, J.C., He, B.B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Appl. Eng. Agric.*, 22(2), 261-265.

Vieira, J.P.F., Ienczak, J.L., Rossell, C.E.V., Pradella, J.G.C., Franco, T.T. (2014). Microbial lipid production: screening with yeasts grown on Brazilian molasses. *Biotechnol. Lett.*, 36, 2433–2442.

1.9 Supplementary material

Table S1. Strains tested in this work.

Species	Strain id	Reference
<i>Papiliotrema</i> sp. (formerly <i>Auriculibuller</i> sp.)	BEL90	Unpublished
<i>Fibulobasidium</i> sp.	BI14	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Candida parapsilosis</i>	BI06	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Farysia itapuensis</i> (formerly <i>Farysizima itapuensis</i>)	BI109	Inacio <i>et al.</i> 2008
<i>Papiliotrema</i> sp.	BI111	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Papiliotrema flavescens</i>	BI144	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Candida vrieseae</i>	BI146	Landell <i>et al.</i> 2010
Non identified	BI147	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Slooffia tsugae</i> (formerly <i>Sporobolomyces tsugae</i>)	BI173	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Cryptococcus</i> sp. nov.	BI195	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Sirobasidium intermedium</i>	BI198	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Occultifur externus</i>	BI206	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Sporobolomyces roseus</i>	BI212	Landell <i>et al.</i> 2006
Non-identified	BI227	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Papiliotrema flavescens</i>	BI231	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Farysia itapuensis</i>	BI232	Inacio <i>et al.</i> 2008
<i>Candida</i> sp.	BI233	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	BI234	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Sporobolomyces roseus</i>	BI245	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Papiliotrema flavescens</i>	BI276	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Farysia itapuensis</i>	BI277	Inacio <i>et al.</i> 2008
<i>Papiliotrema flavescens</i>	BI278	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	BI280	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Papiliotrema flavescens</i>	BI281	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Papiliotrema flavescens</i>	BI282	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Farysia itapuensis</i>	BI286	Inacio <i>et al.</i> 2008
<i>Papiliotrema flavescens</i>	BI296	Landell <i>et al.</i> 2006
Non-identified	BI300	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Farysia itapuensis</i>	BI302	Inacio <i>et al.</i> 2008
<i>Papiliotrema leoncinii</i>	BI309	Pagani <i>et al.</i> 2016
<i>Slooffia tsugae</i>	BI316	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Hannaella kunmingensis</i>	BI320	Landell <i>et al.</i> 2006
Non-identified	BI396	Landell <i>et al.</i> 2006
Non-identified	BI67	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Priceomyces melissophilus</i>	BI81	Landell <i>et al.</i> 2006

<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	BI89	Landell <i>et al.</i> 2006
Non-identified	DEC07	Unpublished
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	DEC37	Unpublished
Non-identified	DEC49	Unpublished
Non-identified	DEC79	Unpublished
Non-identified	DEC87	Unpublished
<i>Candida parapsilosis</i>	EI01	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Taphrina</i> sp. nov.	EI05	Landell <i>et al.</i> 2006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (negative control)	CBS1171	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	QU21	Poli <i>et al.</i> 2013

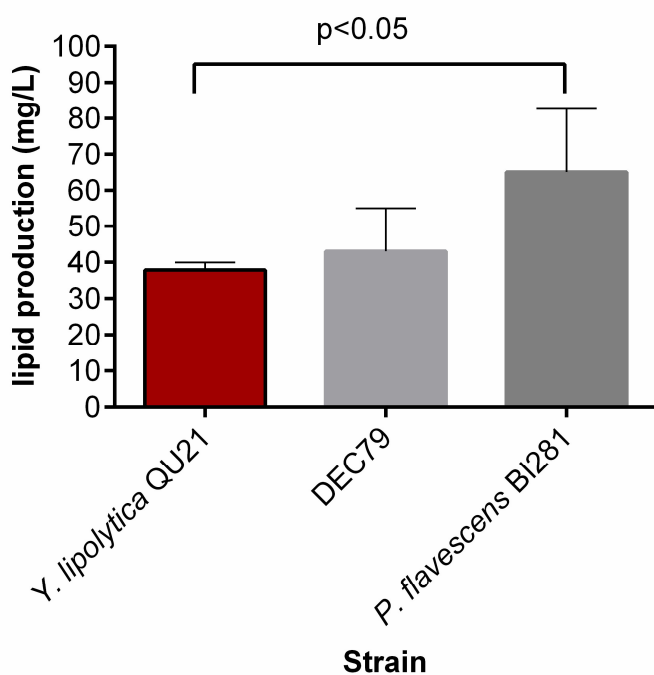


Figure 1.S1. Assessment of lipid content in *P. flavescens* BI281 and DEC79 as candidate oleaginous yeasts compared to *Y. lipolytica* QU21.

1.9.1 References of SM

Inácio, J., Landell, M., Valente, P., Wang, P., Mansson, J., Lachance, M.A., Rosa, C.A., Fonseca, A. (2008). *Farysizyma* gen. nov., an anamorphic genus in the Ustilaginales to accommodate three novel epiphytic basidiomycetous yeast species from America, Europe and Asia. *FEMS Yeast Res.*, 8: 499-508.

Landell, M.F., Mautone, J.N., Valente, P. (2006). Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã park, Viamão/RS. *Biociências*, 14(2): 144-149.

Landell, M.F., Billodre, R., Ramos, J.P., Leoncini, O., Vainstein, M.H., Valente, P. (2010). *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov., novel yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60(1): 244-248.

Pagani, D.M., Brandão, L.R., Santos, A.R.O., Felix, C.R., Ramos, J.P., Broetto, L., Scorzetti G., Fell J., Rosa C.A., Valente P., Landell, M.F. (2016). *Papiliotrema leoncinii* sp. nov. and *Papiliotrema miconiae* sp. nov., two tremellaceous yeast species from Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66(4), 1799-1806.

Poli, J.S., Rosa, P.D., Senter, L., Mendes, S.D.C., Ramirez-Castrillon, M., Vainstein, M.H., Valente, P. (2013). Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *R. Bras. Bioci.*, 11(2): 203-208.

1A. APENDICE

1A.1 Growth curve of *P. flavescens* BI281 in A-glycerol

A growth curve of *P. flavescens* BI281 was constructed for 5 days in culture medium A-glycerol (Figure 1A.1). The fluorescence increased after the stationary phase of growth, however, was not stabilized until 5th day, suggesting that cells continued to accumulate lipids in the next days. The pH of the medium A-glycerol varied between 5 and 3.5. A kinetics growth of *P. flavescens* BI281 was constructed for 12 days using the culture medium A-glycerol and A-raw glycerol (Figure 5). Our results suggested a maximum peak of fluorescence for 7-8 days.

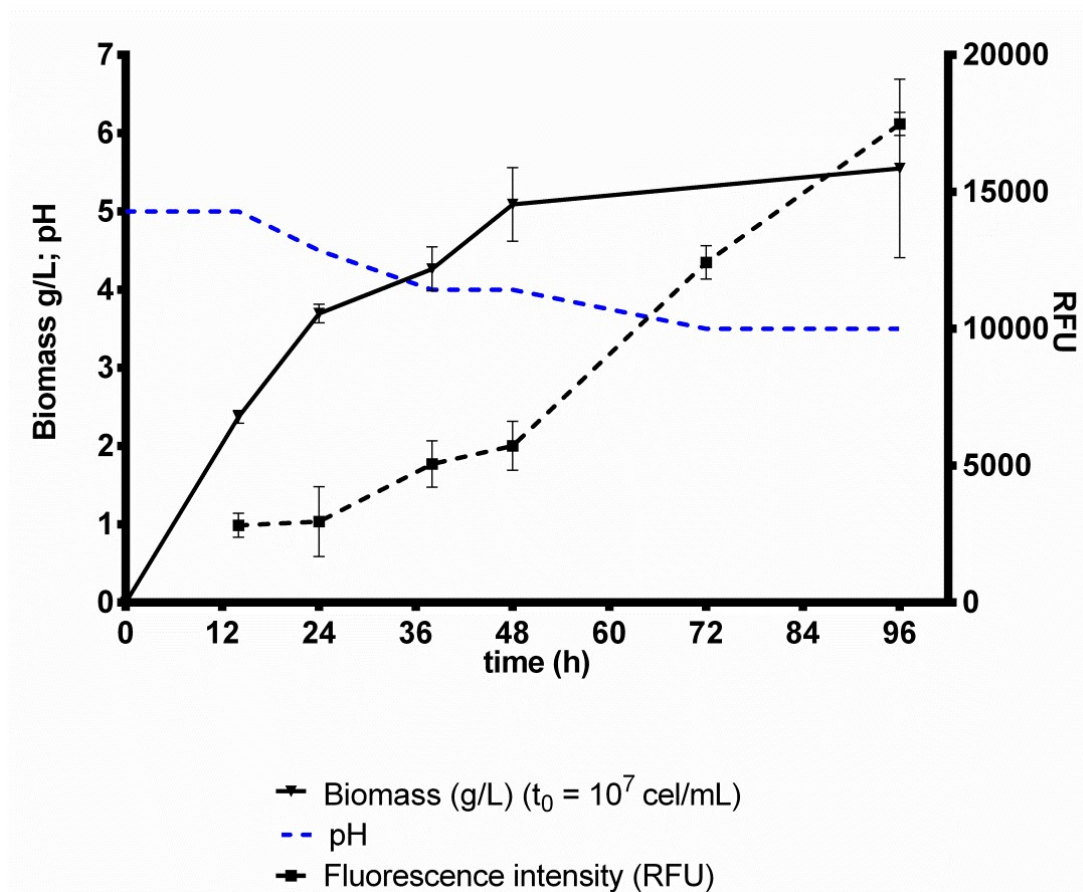


Figure 1A.1. Growth curve of *P. flavescens* BI281 using glycerol as carbon source. The solid black line represents dry biomass (g/L) and the dotted black line represents the Nile red fluorescence (RFU) using PBS 1X + isopropyl alcohol 5% (v/v) (a) or medium A-gly (b) as solvents. The dotted blue line show the pH variation in time. All experiments were done in biological and technical triplicates.

In Figure 1A.2 we showed the growth curves of *P. flavescens* BI281 in a non-inducing lipid accumulation culture medium, such as YM (see section 1.3.2 for composition), and a lipid accumulation inducer, such as A-glycerol culture medium. The stationary phase in YM is reached in 24h, while A-glycerol reached stationary phase in 72h. The cell concentration in YM is 100-fold higher than A-Glycerol in the stationary phase. However, the fluorescence intensity is similar in the first 48h, where A-gly trends to increase until 120h, while YM stabilized.

Besides the similar values of fluorescence intensity, this value depended of cell concentration, where is necessary almost 100-fold cell concentration to reach the same lipid content using YM.

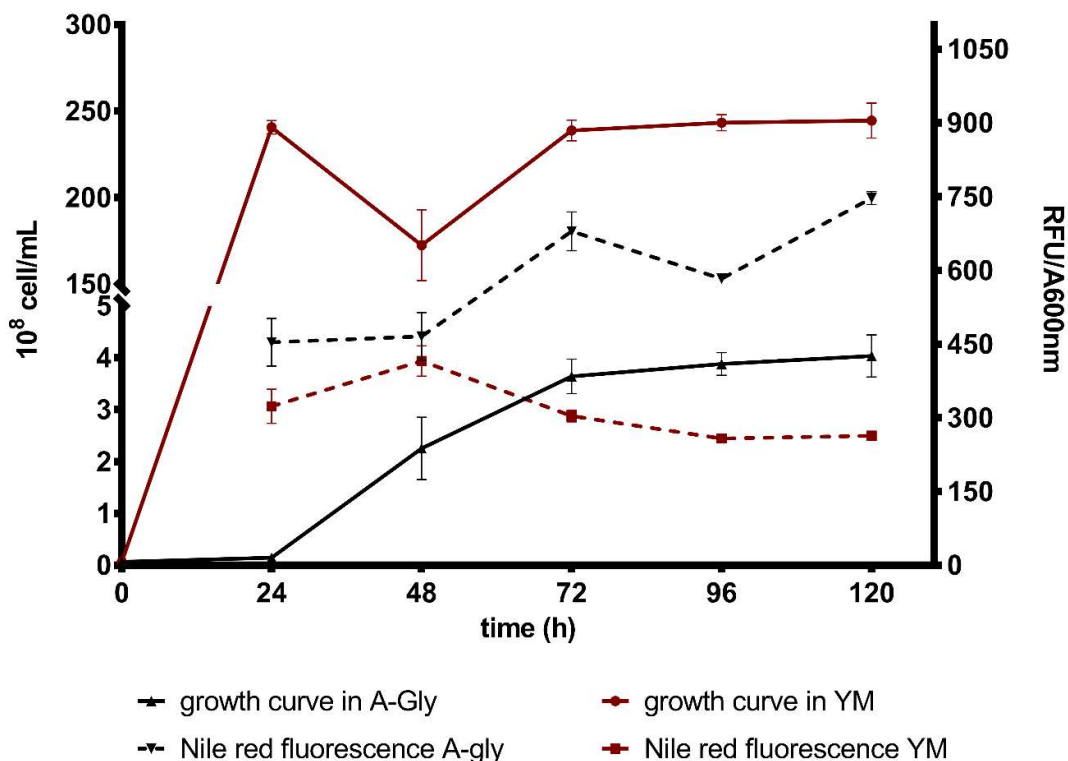


Figure 1A.2. Growth curve and Fluorescence intensity using Nile red of *P. flavescens* BI281 in A-Gly and YM culture media.

1A.2 Detection of another oleaginous yeast strains

We repeated a directed high-throughput screening focusing mainly in strains identified as *Papiliotrema spp.* and pigmented yeasts, using the culture medium A-glycerol (Figure 1A.3), and the strategy proposed by SITEPU *et al.* (2014), measuring the fluorescence intensity between days 3 and 5 of growth of each tested strain (Figure 1A.4). As shown in Figure 1A.3, another strains of

Papiliotrema flavescens showed higher (BI278) or lower (BI282, BI231) fluorescence intensity after five days of grown ($P < 0.05$). Also, two strains of *Papiliotrema sp.* were tested, but their fluorescence intensity was negligible when looked at 3th, 4th or 5th day of grown (Figure 1A.4). On the other hand, *Occultifur sp.* Bel41 showed equal behavior of fluorescence intensity when compared to BI281, suggesting this strain as potential oleaginous yeast (Figure 1A.4).

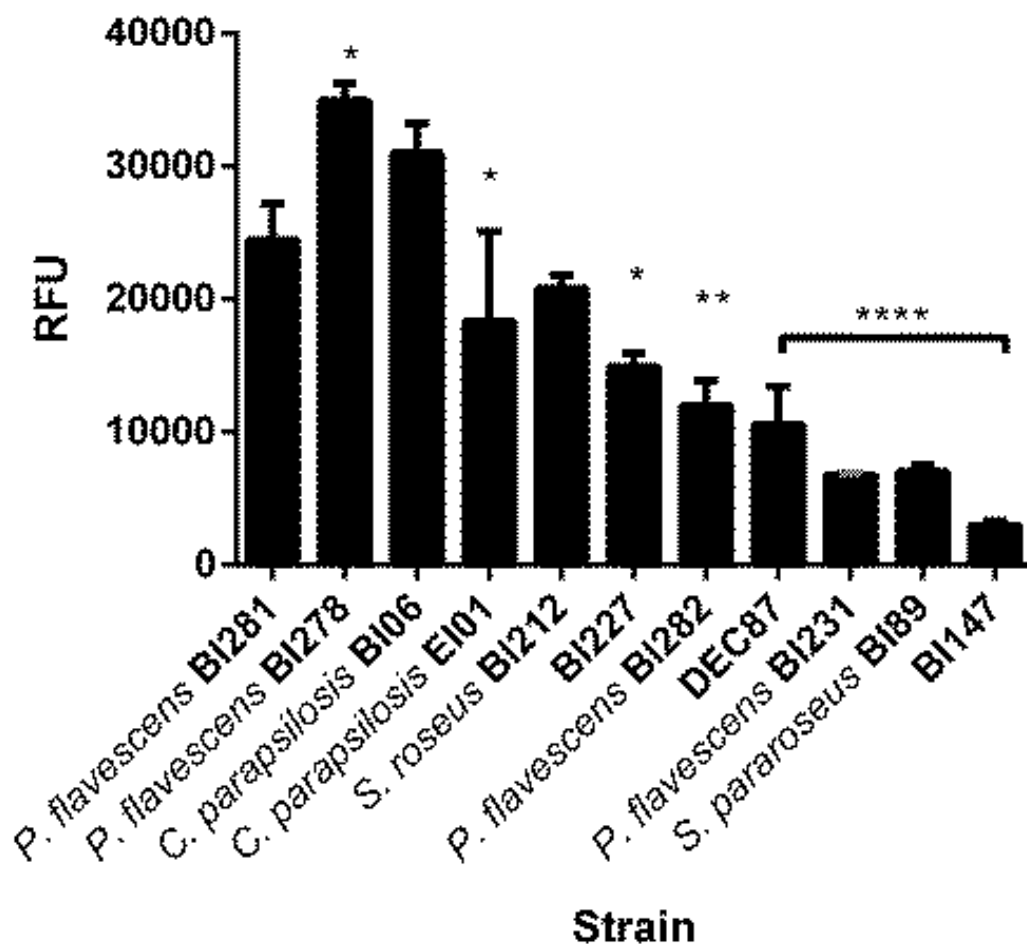


Figure 1A.3. Fluorescence intensity of yeast strains grown in medium A-glycerol using Nile Red dye (50 mg mL^{-1}) and medium A-glycerol as solvent. Absorption and Emission wavelengths were 488 nm and 585 nm, respectively. All relative fluorescence units of each strain were compared to *P. flavescens* BI281 fluorescence intensity by t-test (*

$P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$). All experiments were done in biological and technical triplicates.

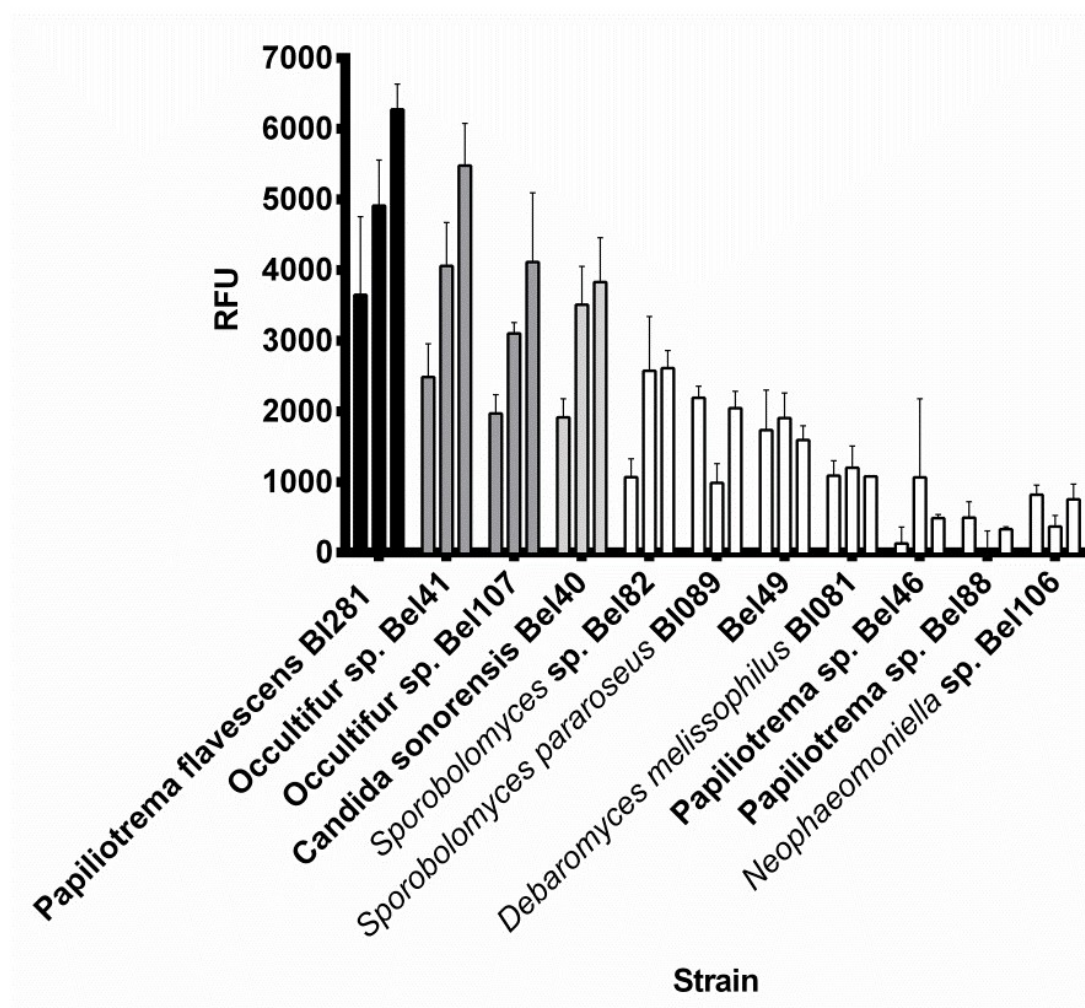


Figure 1A.4. Fluorescence intensity of yeast strains grown in medium A using Nile Red dye (50 mg mL^{-1}) and medium A-glycerol as solvent. Absorption and Emission wavelengths were 488 nm and 585 nm, respectively. Each column represents the measurement for 3th, 4th and 5th day of grown. *P. flavescens* BI281 is black-filled, strains with gray-filled columns showed similar fluorescence with *P. flavescens* BI281 ($P > 0.05$) and strains with not filled columns showed lower fluorescence ($P < 0.05$). All experiments were done in biological and technical triplicates.

In order to find new oleaginous strains of *Papiliotrema flavescens*, we constructed curve growths of eight strains and compare their fluorescence using Nile red for

eight days (Figure 1A.5). Also, we determined gravimetrically three of these strains as oleaginous yeasts (>20% of lipids, dry weight, Table 1A). Finally, we also determined gravimetrically as oleaginous yeasts the strain *Vishniacozyma sp.* BI237 (lipid content: 33.27% dry weight).

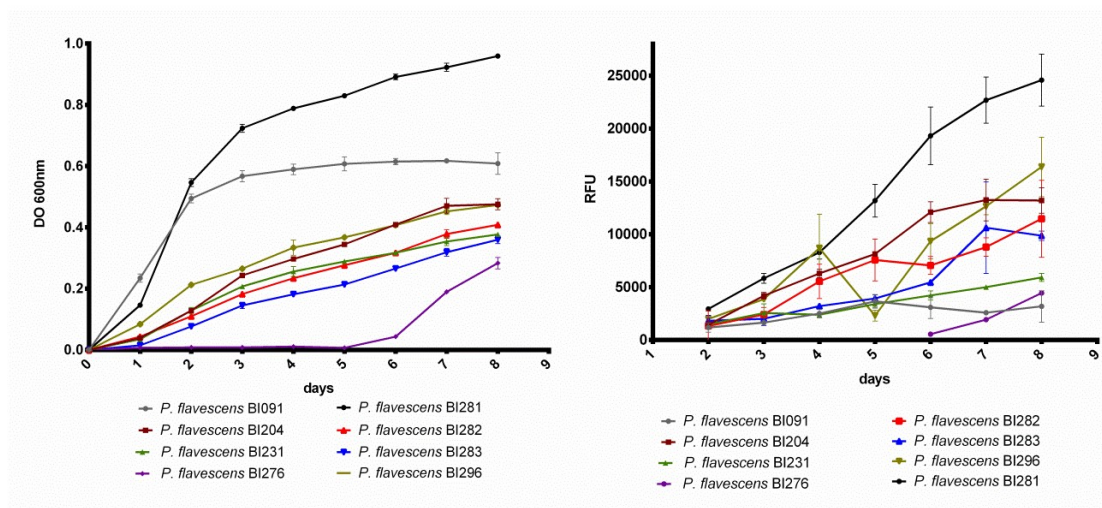


Figure 1A.5. Growth (a) and fluorescence (b) curves of *P. flavescens* strains. (a) Optical density measured as absorbance in 600nm. (b) Nile red fluorescence (RFU) and medium A-glycerol as solvent. All experiments were done in biological and technical triplicates.

Table 1 A. Candidate oleaginous Yeasts belonging Tremellales clade grown in medium A-glycerol. Biomass (X), lipid yield (L), lipid productivity ($Y_{max} L X^{-1} t^{-1}$) and lipid content (Lmax) (%), according to total cell dry weight) are represented. The culture conditions were 150 rpm, 26°C for 8 days.

Strain	X (g L ⁻¹)	L (g L ⁻¹)	Lmax (%)	$Y_{max} L X^{-1} t^{-1}$ (g/g/d)
<i>Papiliotrema flavescens</i> BI281	3,256±0,3932	0,75±0,2772	23,0344	0,0288
<i>Papiliotrema flavescens</i> BI283	4,937±0,338	1,4673±0,4909	29,7212	0,0372
<i>Papiliotrema flavescens</i> BI296	5,569±0,628	1,486±0,2673	26,6834	0,0334
<i>Vishniacozyma sp.</i> BI237	4,975±0,3748	1,6553±0,1729	33,273	0,0416

CAPITULO 2

**QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE LIPÍDIOS NEUTROS DE LEVEDURAS POR
LEITURAS DE FLUORESCÊNCIA COM O CORANTE VERMELHO DE NILO
DEVE SER FEITA APÓS A ESTABILIZAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA**

Mauricio Ramírez-Castrillón, Helio Barros, Victoria P. Jaramillo-Garcia, Joao A.
Pegas Henriques, Valter Stefani, Maria Lúcia Scroferneker, Patricia Valente

Submetido à revista

Journal of Microbiological Methods

**RELATIVE QUANTIFICATION OF YEAST NEUTRAL LIPIDS BY NILE RED
FLUORESCENCE READS SHOULD BE DONE AFTER FLUORESCENCE
STABILIZATION.**

Mauricio Ramírez-Castrillón^{a,b,c*}, Helio Barros^d, Victoria P. Jaramillo-Garcia^a, João A. Pegas Henriques^a, Valter Stefani^d, Maria Lúcia Scroferneker^b, Patricia Valente^b

- a. Graduate program in Cellular and Molecular Biology, Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
- b. Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
- c. Faculty of Basic Sciences, University of Santiago de Cali, Cali, Colombia.
- d. New organic materials and forensic chemistry laboratory (LNMO-QF), Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author: M. Ramírez-Castrillón. Faculty of Basic Sciences, University of Santiago de Cali. Calle 5 62-00, Cali, Colombia. Tel.: +55 5133084196. E-mail address: mauriciogeteg@gmail.com

Abstract

Oleaginous yeast lipid content is usually calculated based on the Nile red fluorescence peak height obtained using a given solvent and optimized excitation and emission wavelengths. We followed the kinetics of Nile red fluorescence in different solvents and showed that stabilization occurs after the fluorescence peak. We suggest that fluorescence kinetics should be followed until fluorescence stabilization to obtain accurate measurements, and RFU values after stabilization should be considered for lipid content estimation in yeasts. Fluorescence stabilization means that homeostasis was attained, and is an innovative approach to lipid content estimations.

Keywords

Nile red fluorescence stabilization, lipid quantification, spectrofluorometry.

Nile red (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one) is one of the most used dyes to visualize lipid droplets and quantify neutral lipids in potential oleaginous microorganisms (KIMURA *et al.*, 2004, SITEPU *et al.*, 2014, BALDUYCK *et al.*, 2015, ALEMÁN-NAVA *et al.*, 2016). In order to facilitate Nile red penetration inside the cells, some solvents have been suggested in the literature, such as PBS (Phosphate buffer solution), DMSO (Dimethyl Sulfoxide), PBS with isopropyl alcohol, or glycerol, but protocols are not fully standardized, specially concerning the incubation time (time delay between Nile red contact with cells and fluorescence measurement). For instance, KIMURA *et al.* (2004) suggested 5 min of delay on the darkness before the measurement, while POLI *et al.* (2014) suggested 10 min. Worries concerning variation on results based on Nile red fluorescence have been reported in the literature. LAMPRECHT AND BENOIT (2003) pointed the probable inexact results of Nile red quantification are due to photobleaching or instability of the molecule. The polarity of the solvent used to dissolve the dye and cells (CHEN *et al.*, 2009), and the difficulty for penetration of the dye into cells due to the presence of cell walls (GAO *et al.*, 2008) are major concerns.

There are few high-throughput methodologies for screening of oleaginous microorganisms. SITEPU *et al.* (2012) proposed a rapid and inexpensive method for selection of oleaginous strains out of a large collection of yeasts based on Nile red fluorescence and a microplate reader equipment. They proposed using a mixture of the solvent DMSO with the cells in the culture medium plus the Nile red dye, and reading the fluorescence kinetics for 20 minutes with 60 second intervals to detect the fluorescence peak, which may be used to calculate the lipid content

for the strain. We evaluated the stability of Nile red fluorescence in different solvents using a protocol based on SITEPU *et al.* (2012) and a microplate reader equipment, and verified that although the fluorescence peak appears within the first 20 minutes, variation in the readings among repetitions are high and fluorescence stability is attained only after 20 minutes. Therefore, we propose a modification of the protocol by SITEPU *et al.* (2012) to warrant more robust estimations of lipid content in yeasts.

Nile red (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was dissolved in acetone (100 µg/mL). Different solvents were employed: PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄), PBS 1X with 5 % isopropyl alcohol (v/v), 50 % Glycerol (v/v in distilled water), culture medium A-gly (1 g/L KH₂PO₄, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L MgCl₂·6H₂O, and 15 % glycerol (v/v)) and culture medium A-gly with Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 5% (v/v). The oleaginous yeast *Papiliotrema flavescens* BI281 was grown in YM medium (3 g/L yeast extract, 3 g/L malt extract, 5 g/L peptone, 10 g/L glucose) for 48 h at 28 °C in order to obtain metabolically active cells. After, we transferred the strain to 25 mL of medium A-gly in a 125 mL flask and grew it for 24 h at 28 °C and 150 rpm. From this pre-culture, we inoculated 1 mL of 7x10⁷ cells/mL, estimated by counting using a Neubauer chamber, in 75 mL of A-gly medium in a 250 mL flask (to maintain a ratio of 2/3 as free volume as mentioned by POLI *et al.*, 2014a) for 7 days, 26 °C and 150 rpm on shaker. These conditions are permissive for lipid accumulation inside the cells of *P. flavescens* BI281 (data not shown).

Separate samples containing 150 µL of each solvent, or 150 µL of cells of *P. flavescens* BI281 (OD_{600nm}=0.03), resuspended in each solvent, were transferred

to black background flat bottom 96-wells microplates (Jet Biofil, China), and the relative fluorescence was measured in a Perkin Elmer Enspire Multimode Plate Reader 2300 equipment (488 nm of excitation, 585 nm of emission, conditions previously standardized; data not shown). After measuring the basal fluorescence intensity in each well without the fluorescent dye (autofluorescence), we added 50 μ L of Nile Red (final concentration: 25 μ g/mL) to the solution, shaken for 5 min inside the equipment, and measured the fluorescence in each well with the dye. The measurement was repeated after 5 min, followed by a kinetic reading each 10 min until 60 min. Each measurement was preceded by shaking for 5 s to suspend the cells. We repeated the experiment using *P. flavescens* BI281 ($OD_{600nm} = 1$) with measurements at 10, 30, 60 and 90 minutes of incubation as explained before. The relative fluorescence expressed as RFU (Relative Fluorescence Units) was obtained after subtraction of both the autofluorescence of the samples and the fluorescence of the solvent in presence of Nile red (blank).

To evaluate the effect of fluorescence intensity against time incubation in presence of cells ($OD_{600nm} = 0.03$), independent of the solvent, we constructed a box-plot to visualize confidence intervals, detect outliers and determine statistical differences using the Kruskal-Wallis (non-parametrical) test. This evaluation was repeated with cells with $OD = 1$ for each solvent. The multiple comparisons of p-values between times can be used as an estimation of stability of means for each assessed time. Each sample had technical triplicates.

As shown in Figure 2.1, most treatments without cells showed negligible RFU in comparison with the respective treatment with cells, except for PBS 1X, which presented RFU values similar to some treatments with cells until the first 20

minutes of contact between the solvents and cells. The analysis of the relative fluorescence of Nile red with the solvent in absence of cells is very important, since this measurement is usually used as the blank, and greatly influence the results.

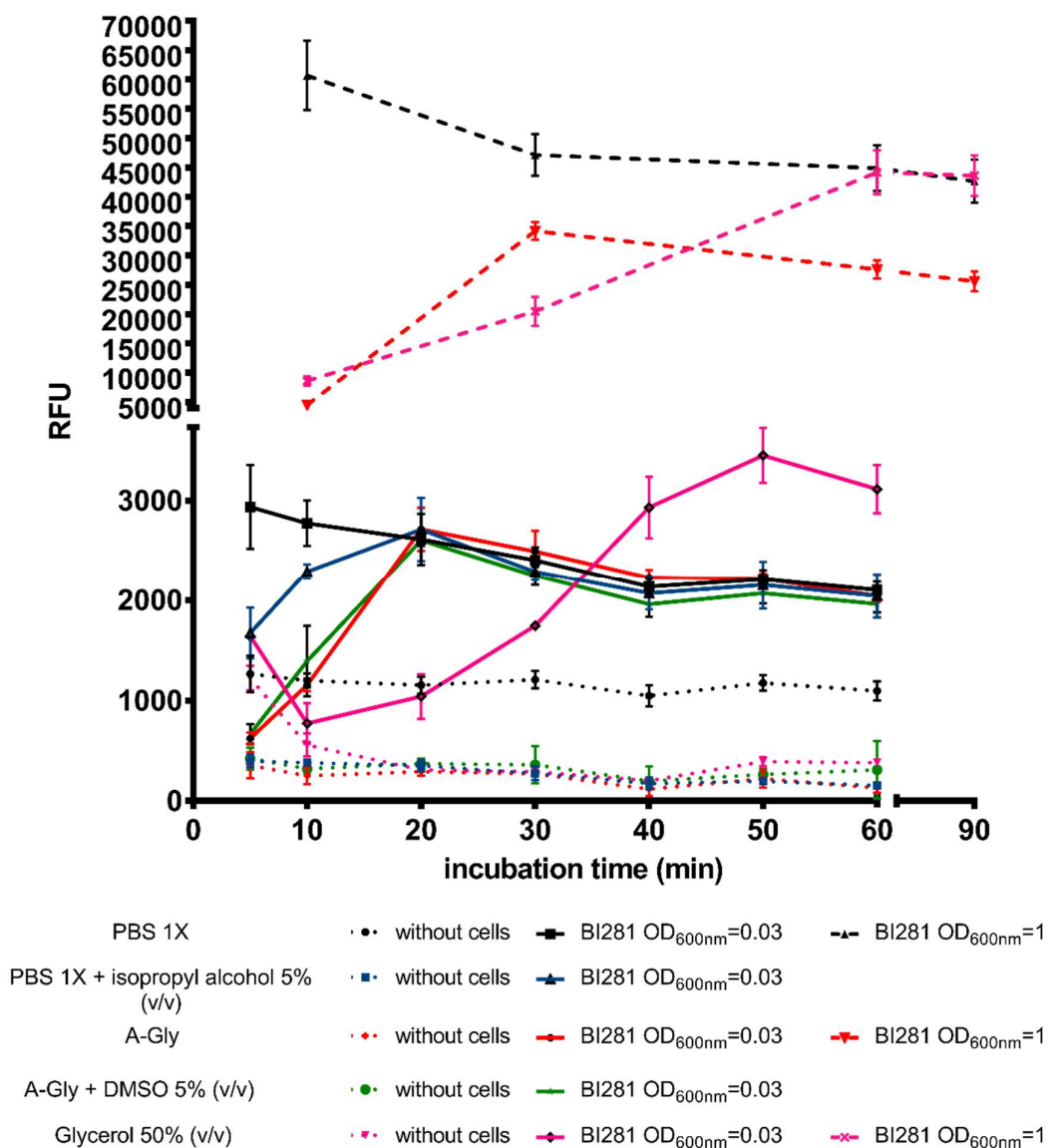


Figure 2.1. Nile red fluorescence intensity (expressed as Relative Fluorescence Units) against time incubation of dye with each treatment (min). Treatments included absence or presence of cells (*P. flavescens* BI281 grown for 7 days in A-Gly culture medium) in two optical densities (OD_{600nm} of 0.03 or 1). Solvents: PBS 1X, PBS 1X with isopropyl alcohol

5 % (v/v), Glycerol 50% (v/v), culture medium A-gly and glycerol 15 % (v/v). Values are means \pm standard deviation (n=3).

RFU measurements in the treatments with cells were highly influenced by the solvent used, specially until the first 20 minutes (Figure 2.1 and Figure 2.S1). The fluorescence peak with most solvents was achieved in 20 minutes for *P. flavescens* BI281. As suggested by SITEPU *et al.* (2012), the peak may be achieved in different times for different yeast strains, and a kinetic reading of the fluorescence until 20 minutes is necessary for its detection. The exceptions were PBS 1X, in which fluorescence decreased with time, and 50% glycerol, whose behavior was different from the other solvents and the peak was achieved after 50 minutes of contact between the cells and the solvent. Independent of the optical density of *P. flavescens* BI281, the behavior of these solvents was similar. The use of 50% glycerol as facilitator of the transport of fluorescent dyes across cell membranes was suggested for microalgae because their cell membrane is permeable to small uncharged polar molecules like glycerol (RUMIN *et al.*, 2015), and could be applied for other microorganisms. Glycerol transport across microbial membranes is complex, and occurs both actively, through a proton symport, and passively, through facilitator channels (OLIVEIRA *et al.*, 2003). This complexity could be related to the different behavior observed with glycerol. Other solvents are known to interact with the cell membrane. For instance, DMSO is known to facilitate the permeation of macromolecules, probably due to induction of water pores across the lipid bilayer and modification of membrane fluidity (NOTMAN *et al.*, 2006). Therefore, the fluorescence behavior of Nile red in the presence of any solvent should be carefully evaluated to detect peak fluorescence.

Other important effect is the sensitivity of the emission spectra of Nile red to the chemical and physical properties of the solvents (LAKOWICZ 1983), Nile red concentration (GREENSPAN AND FOWLER 1985) and yeast species (SITEPU *et al.*, 2012), thus excitation and emission wavelengths should also be carefully evaluated to accurately quantify neutral lipids for biotechnological purposes. The wavelengths used in the present study were previously adjusted to allow comparison of the effect of the tested solvents in Nile red behavior using one same yeast strain and dye concentration. We are aware the used wavelengths may not be the optima for all the solvents, but the use of a suboptimum wavelength is expected to influence peak height, not overall fluorescence spectrum behavior. Therefore, our results are intended to compare Nile red fluorescence behavior in different solvents.

Two analyses were used to evaluate the stability of Nile red fluorescence. First, we constructed a box-plot to visualize the confidence intervals of the data and to detect outliers (Figure 2). Second, we used a non-parametrical test (Kruskal-Wallis) to determine statistical differences between times of incubation. The box-plot suggested variability in most treatments until 20 minutes of contact between the solvent and the cell ($p < 0.05$). After 20 minutes, the fluorescence intensity was non-statistically different ($p > 0.05$), suggesting stability in the reaction. Data of 50% glycerol were marked as outlier in the box-plot, and were not taken in account in this analysis. We repeated the kinetics reading using cells with higher optical density (*P. flavescens* BI281, $OD_{600nm} = 1$, Figure 1) and evaluated four times of incubation for the next solvents: PBS 1X, culture medium A-Gly and Glycerol 50%

(v/v). For PBS 1X and A-Gly the fluorescence was non-statistically different after 30min ($p>0.05$), suggesting stability after 30min of reaction, being in agree with the previous results. For Glycerol 50% (v/v), the stability occurred after 60min of reaction (10vs30min and 30vs60min $p<0.05$; 60vs90min $p>0.05$).

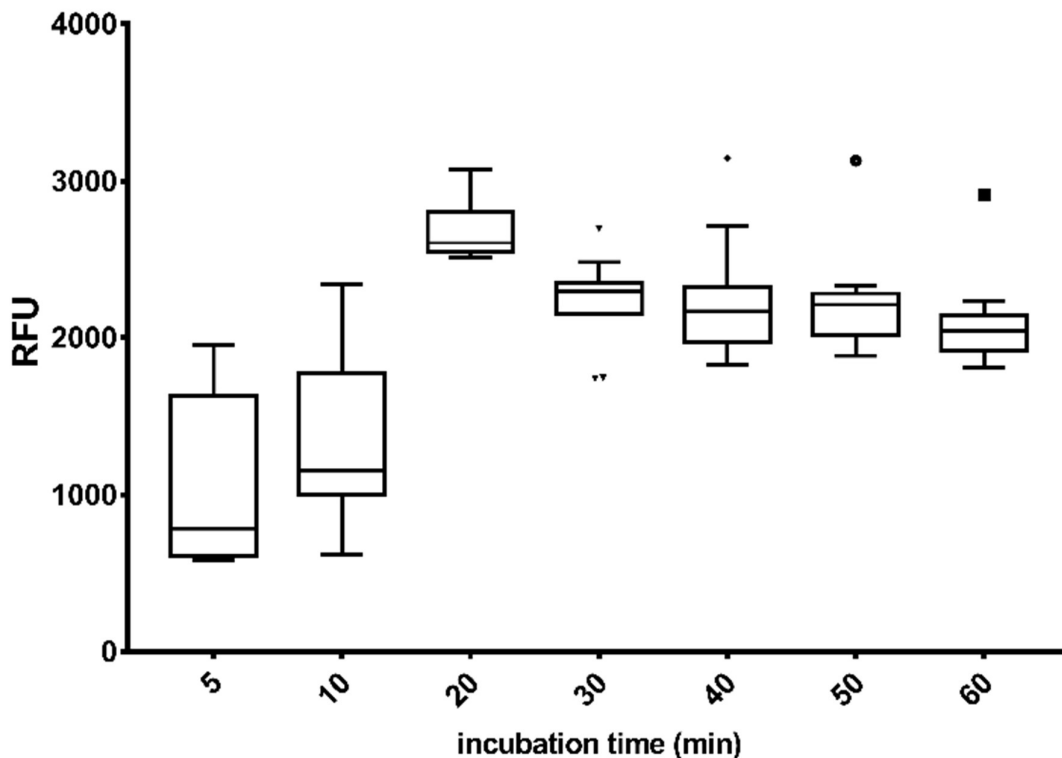


Figure 2.2. Box-plot of Nile red fluorescence measurements, independently of solvent used, against time incubation. The analysis included cells of *P. flavescens* BI281 ($OD_{600nm}=1$). The box represents 50% of the data, the line inside the box indicates the median ($n=3$), the confidence interval includes the box and whiskers (95% of the data), and values outside of the box are marked as outliers.

Most studies calculate yeast lipid content based on the peak height obtained using a given solvent and optimized excitation and emission wavelengths. Since microorganisms may show the fluorescence peak in different wavelengths, the appliance of high throughput methods for screening of oleaginous microorganisms out of large microbial collections is a challenge. SITEPU *et al.* (2012) proposed

following the kinetics of fluorescence until 20 minutes of contact between the fluorescent dye and the cells, and to choose individual peak heights for lipid content estimation. Based on our results, we suggest that fluorescence kinetics should be followed until fluorescence stabilization to obtain accurate measurements, and RFU values after stabilization should be considered for lipid content estimation in yeasts, since Nile red fluorescence is stable from this point on. Care must be taken in case 50% Glycerol (v/v) is used as solvent, since incubation time could be longer (see Figure 1). Fluorescence stabilization means that the fluorescent dye passed across the cell membranes into the lipid droplets, and attained homeostasis. In the case of *P. flavescens* BI 281, stabilization was achieved between 20 and 30 minutes of incubation, but Nile red fluorescence behavior may be different for each strain.

In conclusion, we propose to quantify neutral lipids in yeasts following the high throughput methodology described by SITEPU *et al.* (2012), but considering the stabilization of the Nile red fluorescence. This simple procedure will produce more accurate results, since fluorescence measurements will be more robust.

This work was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Brazil) [Grant numbers 304870/2013-7, 445207/2014-0, 201285/2015-0], and *Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación* COLCIENCIAS (Colombia) [Grant number 512].

2.1 References

- ALEMÁN-NAVA, G.S., Cuellar-Bermudez, S.P., Cuaresma, M., Bosma, R., Muylaert, K., Ritmann, B.E., Parra, R. 2016. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. *J. Microbiol. Methods*, 128, 74-79.
- BALDUYCK, L., Veryser, C., Goiris, K., Bruneel, C., Muylaert, K., Foubert, I. 2015. Optimization of a Nile Red method for rapid lipid determination in autotrophic, marine microalgae is species dependent. *J. Microbiol. Methods*, 118, 152-158.
- CHEN, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q. 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *J. Microbiol. Methods*, 77(1), 41-47.
- GAO, C., Xiong, W., Zhang, Y., Yuan, W., Wu, Q. 2008. Rapid quantitation of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance. *J. Microbiol. Methods*, 75(3), 437-440.
- GREENSPAN, P., Fowler, S.D. 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J. Lipid Res.*, 26(7), 781-789.
- KIMURA, K., Yamaoka, M., Kamisaka, Y. 2004. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *J. Microbiol. Methods*, 56(3), 331-338.
- LAMPRECHT, A., Benoit, J.P. 2003. Simple liquid-chromatographic method for Nile Red quantification in cell culture in spite of photobleaching. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 787(2), 415-419.
- LAKOWICZ, Joseph R. 1983. Fluorescence polarization. In: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer US, pp. 111-153.

NOTMAN, R., Noro, M., O'Malley, B., Anwar, J. 2006. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 128(43), 13982-13983.

OLIVEIRA, R., Lages, F., Silva-Graça, M., Lucas, C. 2003. Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1613(1), 57-71.

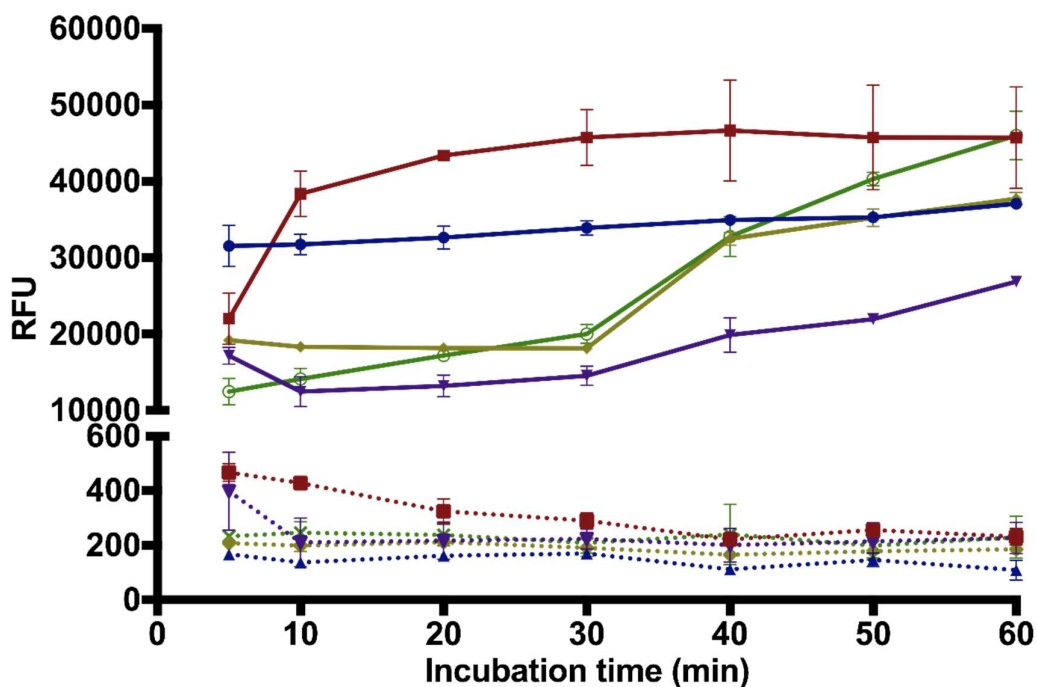
POLI, J. S., Lützhøft, H. C. H., Karakashev, D. B., Valente, P., Angelidaki, I. 2014. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Biores. Technol.*, 151, 388-391.

RUMIN, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J.P., Bougaran, G. 2015. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnol. Biofuels*, 8(1), 42.

SITEPU, I.R., Ignatia, L., Franz, A.K., Wong, D.M., Faulina, S.A., Tsui, M., Kanti, A., Boundy-Mills, K. 2012. An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *J. Microbiol. Methods*, 91(2), 321-328.

SITEPU, I.R., GARAY, L.A., Sestric, R., Levin, D., Block, D.E., German, J.B., Boundy-Mills, K. L. 2014. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnol. Adv.*, 32(7), 1336-1360.

2A APÊNDICE



PBS 1X	•▲• without cells	● with cells
PBS 1X + isopropyl alcohol 5% (v/v)	•■• without cells	■ with cells
Glycerol 50% (v/v)	•▼• without cells	▼ with cells
A-Gly	•◆• without cells	◆ with cells
A-Gly + DMSO 5% (v/v)	•✕• without cells	○ with cells

Figure 2A.1. Nile red fluorescence intensity (expressed as Relative Fluorescence Units) against time incubation of dye with each treatment (min). Treatments included absence or presence of cells (*Y. lipolytica* QU21 grown for 7 days in A-Gly culture medium) with $OD_{600nm} = 0.03$. Solvents: PBS 1X, PBS 1X with isopropyl alcohol 5% (v/v), Glycerol 50% (v/v), culture medium A-gly and glycerol 15% (v/v). Values are means \pm standard deviation ($n=3$).

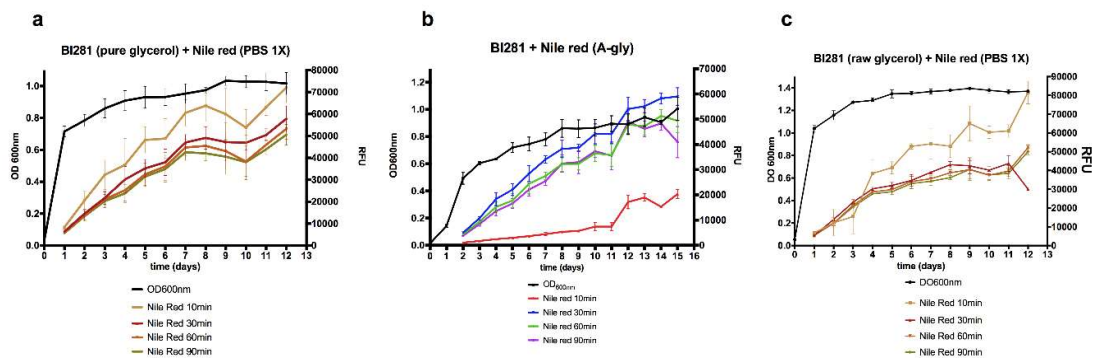


Figure 2A.2. Growth curve of *P. flavescens* BI281 in pure glycerol (a,b) or raw glycerol derived from biodiesel industry (c). The black line represents the optical density for each experiment (OD_{600nm}) and the colored lines are fluorescence readings in different incubation times with Nile red (25µg/mL). All experiments were done in triplicate.

DISCUSSÃO GERAL

O Brasil representa um dos focos de biodiversidade do planeta, porém o potencial biotecnológico da sua riqueza microbiológica tem sido pouco explorado. Algumas leveduras têm sido descritas como acumuladoras de lipídios neutros desde inícios do século XX, mas somente após o auge dos biocombustíveis foram avaliadas como matéria prima para a produção de biodiesel (SITEPU *et al.* 2014). Neste sentido, várias linhagens têm sido mostradas como promissoras e uma avaliação profunda da sua viabilidade econômica têm sido estudadas, principalmente com espécies como *L. starkeyi*, *Y. lipolytica* e *R. toruloides*. Porém, apesar de continuar descobrindo novas linhagens e espécies oleaginosas, poucos estudos focam na otimização da produção de lipídios em novas leveduras oleaginosas. A coleção de leveduras analisada, proveniente de ambientes naturais do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), compreende linhagens com potencial para serem usadas como matéria prima na indústria de biodiesel. Vários relatos de potencial biotecnológico foram feitos quando foram analisadas leveduras associadas a queijos artesanais para acúmulo de lipídios. Por exemplo, POLI *et al.* (2013) analisaram o perfil lipídico de *Yarrowia lipolytica* QU21 como alternativa para produção de óleo, posteriormente avaliando seu potencial para produzir lipídios usando resíduos agroindustriais (POLI *et al.*, 2014). MATTANNA *et al.* (2014a) analisaram o perfil lipídico de outras 16 linhagens de leveduras da mesma coleção, encontrando as linhagens *Y. lipolytica* QU22 e QU37 com grande potencial para seu estudo como suplemento alimentício, ao apresentarem ácidos graxos poli-insaturados. Estas linhagens foram otimizadas para a produção de

ácido alfa-linolénico (MATTANNA *et al.*, 2014b). De igual forma, a linhagem *Candida zeylanoides* QU33 foi proposta como modelo de levedura não oleaginosa, a ser utilizada em complementação aos resultados obtidos com a levedura não oleaginosa *S. cerevisiae* (ROSA *et al.*, 2014). Outro estudo foi realizado com a mesma levedura para tentar tornar a linhagem oleaginosa, sem sucesso (ROSA *et al.*, 2015), o que reforça a idéia de ser uma alternativa na interpretação da capacidade oleaginosa de uma levedura.

Esta tese propôs uma metodologia *high-throughput* para triagem e seleção de novas leveduras oleaginosas. A partir das propostas feitas por SITEPU *et al.* (2012) e POLI *et al.* (2014), foram feitas avaliações de cultivos indutores do acúmulo de lipídios em 55 linhagens reativadas, mediante o uso de leitor de fluorescência em placas de 96 poços e um corante amplamente usado na literatura, vermelho de Nilo. O objetivo foi quantificar através de curva de calibração com concentrações conhecidas de trioleína, triglicerídeo simétrico derivado do glicerol e três unidades de ácido oléico, o principal alvo da triagem. Para confirmar as leituras realizadas por fluorescência, foi realizada determinação gravimétrica do conteúdo de lipídios.

Os resultados mostrados na presente tese apontam que *P. flavescens* BI281 acumula lipídios em uma proporção superior a 20% (em relação ao seu peso seco), sendo considerada uma levedura oleaginosa e sendo reportada esta espécie por primeira vez na literatura como oleaginosa. As gotas lipídicas e/ou sua fluorescência foram observadas usando os corantes vermelho de Nilo e GD

(Capítulo 3), ambos com afinidade lipofílica. Outros isolados pertencentes à espécie *P. flavescens* analisados mostraram também capacidade acumuladora de lipídios. Neste sentido, as linhagens *P. flavescens* BI204, BI283 e BI296, e a linhagem *Vishniacozyma sp.* BI237 apresentaram conteúdo lipídico entre 23 e 33 % (p/p) sugerindo que estas linhagens podem ser analisadas e otimizadas em trabalhos futuros. Entretanto, outras linhagens, tais como *P. flavescens* BI091, BI231, BI276 e BI282 não mostraram capacidade oleaginosa, possibilitando que linhagens oleaginosas e não oleaginosas da mesma espécie possam ser analisadas no futuro quanto a suas diferenças em nível genômico.

Em relação ao gênero *Papiliotrema*, as únicas espécies já reportadas como oleaginosas são *P. laurentii* e *P. aureus* (SITEPU *et al.*, 2014), enquanto que outras espécies não apresentam capacidade acumuladora de lipídios. Porém, muitas das espécies dentro da ordem Tremellales têm sido reportadas como oleaginosas (CHANG *et al.* 2015, GHANAVATI *et al.* 2015, POLBUREE *et al.* 2015, Tabela 2). Por exemplo, POLBUREE *et al.* (2015) reportaram conteúdos lipídicos entre 18 e 64% (p/p) (*C. curvatus* CBS570 e *Saitozyma podzolicus* DMKU-PTC7, respectivamente) usando glicerol como fonte de carbono. GHANAVATI *et al.* (2015) reportaram 30.6% (p/p) de acumulação de lipídios por *Solicoccozyma aerius* usando esgoto municipal como matéria prima. Esta associação de perfis fenotípicos sugere que a capacidade oleaginosa pode ter aparecido em algum ponto evolutivo e algumas espécies fixaram ou perderam essa capacidade. É possível que diferentes backgrounds genéticos estejam relacionados ao acúmulo de lipídios e futuros trabalhos são necessários para

confirmar essa hipótese. A associação filogenética de linhagens oleaginosas confere uma grande vantagem para realizar triagens de prospecção biotecnológica dirigidas a este grupo de organismos (KURTZMAN *et al.* 2015), ao contrário de analisar grandes coleções com resultados pouco efetivos (SITEPU *et al.*, 2014).

Os resultados da otimização da produção de lipídios apontam para a viabilidade de utilização de fontes econômicas para o acúmulo de lipídios em *P. flavescens* BI281. Assim, é possível usar glicerol puro, e posteriormente foi mostrado também com glicerol residual derivado da indústria de biodiesel, como fonte de carbono. Esse resultado é importante pela tendência de utilizar resíduos agroindustriais para fornecer viabilidade econômica ao processo de produção de biodiesel (SOCCOL *et al.* 2017). Os resultados sugerem que não teve diferença na produção de lipídios entre glicerol puro ou glicerol residual (Figura 1A.5). Porém, quando observamos o perfil lipídico e a quantificação realizada de cada ácido graxo, a porcentagem de ácidos graxos mono-insaturados (relativo ao total de esteres de metil de ácido graxo) foi superior em glicerol residual (após 12 dias de cultivo), sugerindo a viabilidade de utilização do glicerol residual como matéria prima para seu uso em biodiesel. Também, o perfil lipídico, em ambos casos, foi adequado para os requerimentos de produção de biodiesel e de acordo com os critérios apresentados por SITEPU *et al.* (2014).

Esta tese propôs a utilização de técnicas de leituras de fluorescência usando uma aproximação *high-throughput* usando dois corantes: um amplamente utilizado e

aceito na literatura, vermelho de Nilo, e outro corante com afinidade lipofílica, 2-(1,3-benzothiazol-2-yl)-5-(N,N-diethylamino)phenol, e que foi denominado “GD”. Várias propriedades foram analisadas e comparadas usando células obtidas a partir dos mesmos experimentos. Primeiro, foi determinado o espectro de absorção e emissão para cada corante, mostrando o efeito do estado de excitação ESIPT da molécula “GD” (BARROS, 2015). Segundo, foram avaliados vários tempos de incubação do corante com o solvente utilizado e na presença ou ausência de células. Terceiro, foi avaliada a estabilidade de ambos corantes, e quarto, foi realizada a cinética de acúmulo de lipídios usando ambos corantes. Para desenvolver esta comparação, foram escolhidas três linhagens: *Yarrowia lipolytica* QU21 (descrita como oleaginosa por POLI *et al.*, 2014b), *Papiliotrema flavescens* BI281 (proposto nesta tese como oleaginosa), e *Saccharomyces cerevisiae* MRC164, como controle negativo (esta espécie não acumula lipídios em proporções superiores a 20% relativo ao peso seco). Os resultados mostrados nos capítulos 2 e 3 sugerem que a fluorescência do corante “GD” apresenta maior estabilidade quando comparado com vermelho de Nilo. Além disso, ambos corantes mostraram sofrer influência do solvente utilizado (GREENSPAN & FOWLER 1985, BARROS 2015). A fotoestabilidade é uma das principais vantagens da utilização do corante “GD” comparado com vermelho de Nilo, permitindo a manipulação do corante com a presença de luz. Finalmente, o corante “GD” apresentou o espectro ESIPT típico quando foram utilizadas leveduras oleaginosas e em presença do meio de cultura A-Gly como solvente. Portanto, se sugere o uso do próprio meio de cultura para acúmulo de lipídios

para visualização e/ou leituras em equipamentos de fluorimetria com o corante “GD”.

CONCLUSÕES

- *Papiliotrema flavescens* BI281 foi selecionada como levedura oleaginosa e mostrou habilidade acumuladora de lipídios usando glicose ou glicerol como fonte de carbonos.
- Outras linhagens de *P. flavescens* e *Vishniacozyma sp.* foram detectadas e reportadas como oleaginosas. No total foram descritas cinco linhagens e duas espécies oleaginosas não reportados anteriormente na literatura.
- O conteúdo de lipídios em *P. flavescens* atingiu percentagens entre 34 e 52% em relação ao seu peso seco, dependendo da fonte de carbono utilizada. Após a otimização do cultivo, incrementou a produção de lipídios até tres vezes quando comparado com a condição inicial não otimizada.
- *P. flavescens* BI281 mostrou capacidade acumuladora de lipídios utilizando glicerol residual derivado da indústria de biodiesel como fonte de carbono, potencializando seu uso com potencial viabilidade econômica.
- O perfil lipídico de *P. flavescens* BI281 mostrou produção principalmente de ácidos graxos mono-insaturados, variando entre 56 a 74% dependendo do tipo de glicerol utilizado (puro ou residual). O principal ácido graxo produzido foi ácido oléico (C18:1 cis, 5 dias de cultivo) ou ácido elaídico (C18:1 trans, 12 dias de cultivo).
- O vermelho de Nilo foi avaliado quanto a sua estabilidade em fluorímetros de placas. Os resultados sugerem que o tempo de incubação com o solvente deve

ser pelo menos 20min antes de realizar as leituras, com o objetivo de diminuir o erro. Esta tese propôs a modificação da metodologia geralmente utilizada em triagens de novas leveduras oleaginosas.

- 2- (1,3-benzothiazol-2-yl)-5-(N,N-diethylamino)phenol é dependente do solvente e da presença de leveduras oleaginosas, sendo específico para detectar leveduras com habilidade acumuladora de lipídio. GD apresentou duas grandes vantagens quando comparadas com vermelho de Nilo: fotoestabilidade da molécula e facilidade de manipulação.

PERSPECTIVAS

Várias perguntas devem ser respondidas em futuros trabalhos, que otimizariam ainda mais a produção de lipídios em *P. flavescens* BI281: (1) Qual a melhor condição para ser escalonado o processo em biorreator? (2) Outros resíduos agroindustriais são viáveis para serem utilizados como fonte de carbono ou nitrogênio para esta linhagem? (3) Qual o perfil lipídico quando usados outros substratos?

Por outro lado, outras três linhagens foram detectadas como oleaginosas, sendo necessária toda a avaliação e otimização das condições de cultivo para incrementar a produtividade. A detecção de linhagens não oleaginosas pertencentes à mesma espécie *Papiliotrema flavescens*, abre o caminho para a comparação genômica entre linhagens oleaginosas e não oleaginosas, e assim poder detectar variações genéticas determinantes da capacidade de acúmulo de lipídios.

REFERÊNCIAS

- ADEYO, O., HORN, P. J., LEE, S., BINNS, D. D., CHANDRAHAS, A., CHAPMAN, K. D., & GOODMAN, J. M. The yeast lipin orthologue Pah1p is important for biogenesis of lipid droplets. *The Journal of cell biology*, 2011, vol. 192, no 6, p. 1043-1055.
- AGEITOS, J. M., VALLEJO, J. A., VEIGA-CRESPO, P., & VILLA, T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, vol. 90, no 4, p. 1219-1227.
- AMARETTI, A., RAIMONDI, S., LEONARDI, A., & ROSSI, M. *Candida freyschussii*: an oleaginous yeast producing lipids from glycerol. *Chemical engineering*, 2012, vol. 27, p. 139-144.
- AMARETTI, A., RAIMONDI, S., SALA, M., RONCAGLIA, L., DE LUCIA, M., LEONARDI, A., & ROSSI, M. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microbial cell factories*, 2010, vol. 9, no 1, p. 73.
- ANDREEVSKAYA, V. & ZALASHKO, M. Effect of addition of salts on growth and synthesis of lipid in yeasts cultured on peat oxidates. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 1979, vol. 15, p. 522-527. Apud SITEPU, I. R., GARAY, L. A., SESTRIC, R., LEVIN, D., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 7, p. 1336-1360.
- ANGERBAUER, C., SIEBENHOFER, M., MITTELBACH, M., & GUEBITZ, G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource technology*, 2008, vol. 99, no 8, p. 3051-3056.
- ANP, Agência Nacional do Petróleo. 2017. <http://www.anp.gov.br/wwwanp/> Visto: 19 de fevereiro de 2017.
- AREESIRISUK, A., CHIU, C. H., YEN, T. B., LIU, C. H., & GUO, J. H. A novel oleaginous yeast strain with high lipid productivity and its application to alternative biodiesel production. *Applied biochemistry and microbiology*, 2015, vol. 51, no 4, p. 411.
- AROUS, F., FRIKHA, F., TRIANTAPHYLLOU, I. E., AGGELIS, G., NASRI, M., & MECHICHI, T. Potential utilization of agro-industrial wastewaters for lipid production by the oleaginous yeast *Debaryomyces etchellsii*. *Journal of Cleaner Production*, 2016, vol. 133, p. 899-909.
- ATABANI, A. E., SILITONGA, A. S., BADRUDDIN, I. A., MAHLIA, T. M. I., MASJUKI, H. H., & MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and sustainable energy reviews*, 2012, vol. 16, no 4, p. 2070-2093.
- BARROS, H. L. Síntese e caracterização de novos derivados benzazólicos fluorescentes por ES IPT e sua aplicação na ciência forense como reveladores de

impressões digitais latentes em diferentes tipos de fitas adesivas, Dissertação de Mestrado. 2015.

BARROS, H. L., STEFANI, V. A new methodology for the visualization of latent fingermarks on the sticky side of adhesive tapes using novel fluorescent dyes. *Forensic Science International*, 2016, vol. 263, p. 83-91.

BARROS, H. L., MARQUES, S. M., STEFANI, V. The use of epifluorescence microscopy and fluorescent dyes for visualization of *Oxyuris equi* eggs. *Veterinary Parasitology*, 2016, vol. 226, p. 162-166.

BATI, N.; HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. Biomodification of fats and oils: Trials with *Candida lipolytica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1984, vol. 61, no 11, p. 1743-1746.

BELLOU, S., BAESHEN, M. N., ELAZZAZY, A. M., AGGELI, D., SAYEGH, F., & AGGELIS, G. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 8, p. 1476-1493.

BLAGOVIĆ, RUPČIĆ, J., MESARIĆ, M., GEORGIÚ, K., & MARIĆ, V. Lipid Composition of the Whole Cells, Plasma Membrane and Mitochondria of Brewer's Yeast. En *Biotechnology and Environment*. 2001.

BLIGH, E. G., & DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 1959, vol. 37, no 8, p. 911-917.

BONATO, E. R., BERTAGNOLLI, P. F., LANGE, C. E., & RUBIN, S. Teor de óleo e de proteína em genótipos de soja desenvolvidos após 1990. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2000, vol. 35, no 12, p. 2391-2398.

BORISOVA, T. A.; ATAMANIUK, D. I. Effect of carbon sources on pigment and lipid formation in yeast species *Rhodotorula rubra* 341 and *Rhodotorula mucilaginosa* 339. *Izvestiia Akademii nauk Moldavskoi SSR: serii biologicheskikh i khimicheskikh nauk*, 1978. Apud SITEPU, I. R., GARAY, L. A., SESTRIC, R., LEVIN, D., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 7, p. 1336-1360.

BOTHAM, P. A.; & RATLEDGE, C. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. *Microbiology*, 1979, vol. 114, no 2, p. 361-375.

BOULTON, C. A.; RATLEDGE, C. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: citrate lyase. *Microbiology*, 1981, vol. 127, no 1, p. 169-176.

BRASIL, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2015. <http://www.agricultura.gov.br/> visto: 19 de fevereiro de 2017.

BREIL, C., MEULLEMIESTRE, A., VIAN, M., & CHEMAT, F. Bio-Based Solvents for Green Extraction of Lipids from Oleaginous Yeast Biomass for Sustainable Aviation Biofuel. *Molecules*, 2016, vol. 21, no 2, p. 196.

BYREDDY, A. R., GUPTA, A., BARROW, C. J., & PURI, M. Comparison of cell disruption methods for improving lipid extraction from thraustochytrid strains. *Marine drugs*, 2015, vol. 13, no 8, p. 5111-5127.

- CAPUS, A., MONNERAT, M., RIBEIRO, L. C., DE SOUZA, W., MARTINS, J. L., & SANT'ANNA, C. Application of high-content image analysis for quantitatively estimating lipid accumulation in oleaginous yeasts with potential for use in biodiesel production. *Bioresource technology*, 2016, vol. 203, p. 309-317.
- CHEN, R.; & SNYDER, M. Yeast proteomics and protein microarrays. *Journal of proteomics*, 2010, vol. 73, no 11, p. 2147-2157.
- CHEN, X. F., HUANG, C., XIONG, L., CHEN, Y., & MA, L. L. Oil production on wastewaters after butanol fermentation by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Bioresource technology*, 2012, vol. 118, p. 594-597.
- CHEN, X., LI, Z., ZHANG, X., HU, F., RYU, D. D., & BAO, J. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2009, vol. 159, no 3, p. 591.
- CHERRY, J. M., HONG, E. L., AMUNDSEN, C., BALAKRISHNAN, R., BINKLEY, G., CHAN, E. T., ... & FISK, D. G. Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic acids research*, 2011, p. gkr1029.
- CREMONEZ, P.A., FEROLDI, M., NADALETI, W.C., DE ROSSI, E., FEIDEN, A., DE CAMARGO, M.P., CREMONEZ, F.E., KLAJN, F.F. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, vol. 42, p. 415-428.
- CUI, Y., FRASER, C., GARDNER, G., HUANG, C. J., REITH, M., & WINDUST, A. J. Isolation and optimisation of the oleaginous yeast *Sporobolomyces roseus* for biosynthesis of ¹³C isotopically labelled 18-carbon unsaturated fatty acids and trans 18: 1 and 18: 2 derivatives through synthesis. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2012, vol. 39, no 1, p. 153-161.
- CZABANY, T., WAGNER, A., ZWEYTICK, D., LOHNER, K., LEITNER, E., INGOLIC, E., & DAUM, G. Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, no 25, p. 17065-17074.
- DAI, C. C., TAO, J., XIE, F., DAI, Y. J., & ZHAO, M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*, 2007, vol. 6, no 18, p. 2130.
- DALLÉ DA ROSA, P., MATTANNA, P., CARBONI, D., AMORIM, L., RICHARDS, N., & VALENTE, P. *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia microbiologica*, 2014, vol. 59, no 6, p. 477-484.
- DAVIS, R.; ADEN, A.; & PIENKOS, P. T. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Applied Energy*, 2011, vol. 88, no 10, p. 3524-3531.
- DIEN, B. S., SLININGER, P. J., KURTZMAN, C. P., MOSER, B. R., & O'BRYAN, P. J. Identification of superior lipid producing *Lipomyces* and *Myxozyma* yeasts. *AIMS environmental science*, 2016, vol. 3, no 1, p. 1-20.
- DUARTE, S. H., DE ANDRADE, C. C. P., GHISELLI, G., & MAUGERI, F. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. *Bioresource technology*, 2013, vol. 138, p. 377-381.

ECONOMOU, C. N., VASILIOU, I. A., AGGELIS, G., PAVLOU, S., & VAYENAS, D. V. Modeling of oleaginous fungal biofilm developed on semi-solid media. *Bioresource technology*, 2011, vol. 102, no 20, p. 9697-9704.

ELLE, I. C., OLSEN, L. C. B., PULTZ, D., RØDKÆR, S. V., & FÆRGEMAN, N. J. Something worth dyeing for: molecular tools for the dissection of lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS letters*, 2010, vol. 584, no 11, p. 2183-2193.

ENEBO, L., ELANDER, M., BERG, F., LUNDIN, H., NILSSON, R., & MYRBÄCK, K. Mikrobielle Fettsynthese durch Luftfezucht von Rhodotorulaarten. IV A, 1944, vol. 6, p. 1. Apud SITEPU, I. R., GARAY, L. A., SESTRIC, R., LEVIN, D., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 7, p. 1336-1360.

EROSHIN, V. K.; KRYLOVA, N. I. Efficiency of lipid synthesis by yeasts. *Biotechnology and bioengineering*, 1983, vol. 25, no 7, p. 1693-1700.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C.; & GILBERT, S. C. A rapid screening method for lipid-accumulating yeast using a replica-printing technique. *Journal of Microbiological Methods*, 1985, vol. 4, no 3-4, p. 203-210.

FEI, Q., CHANG, H. N., SHANG, L., KIM, N., & KANG, J. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresource technology*, 2011, vol. 102, no 3, p. 2695-2701.

FENG, X.; & ZHAO, H. Investigating glucose and xylose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* via ¹³C metabolic flux analysis. *AIChE Journal*, 2013, vol. 59, no 9, p. 3195-3202.

FINK, H.; BRACKMANN, C.; & ENEJDER, A. 18. Imaging Lipid Metabolism in *Caenorhabditis elegans* and Other Model Organisms. *Coherent Raman Scattering Microscopy*, 2012, vol. 1, p. 405.

FIRESTONE, D. (ed.). Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes. Third edition. Champaign, IL: AOCS press, 2013.

FOLCH, J., LEES, M., & SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of chemical biology*, 1957, vol. 226, no 1, p. 497-509.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAO statistical yearbook. FAO, 2004.

FRANKLIN, S., PIECHOCKI, J., NORRIS, L. M., DECKER, S. M., WEE, J., & ZDANIS, D. Oleaginous yeast food compositions. U.S. Patent Application No 13/087,305, 14 Abr. 2011.

FREITAS, C., PARREIRA, T. M., ROSEIRO, J., REIS, A., & DA SILVA, T. L. Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. *Bioresource technology*, 2014, vol. 158, p. 355-359.

- FRENGOVA, G. I.; & BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2009, vol. 36, no 2, p. 163.
- GALAFASSI, S., CUCCHETTI, D., PIZZA, F., FRANZOSI, G., BIANCHI, D., & COMPAGNO, C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource technology*, 2012, vol. 111, p. 398-403.
- GARAY, L. A., SITEPU, I. R., CAJKA, T., CHANDRA, I., SHI, S., LIN, T., ... & BOUNDY-MILLS, K. L. Eighteen new oleaginous yeast species. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2016, vol. 43, no 7, p. 887-900.
- GARAY, L. A.; BOUNDY-MILLS, K. L.; & GERMAN, J. B. Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: a mechanistic approach and future perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2014, vol. 62, no 13, p. 2709-2727.
- GEFFERS, H. Untersuchungen über das Fettbildungsvermögen bei Pilzen der Gattung *Oospora* Wallroth (em. Sacc.). *Archives of Microbiology*, 1937, vol. 8, no 1, p. 66-98. Apud SITEPU, I. R., GARAY, L. A., SESTRIC, R., LEVIN, D., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 7, p. 1336-1360.
- GEN, Q.; WANG, & Q.; CHI, Z.-M. Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and immobilized amylases-producing yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *Renewable Energy*, 2014, vol. 62, p. 522-526.
- GHANAVATI, H.; NAHVI, I.; & KARIMI, K. Organic fraction of municipal solid waste as a suitable feedstock for the production of lipid by oleaginous yeast *Cryptococcus aerius*. *Waste Management*, 2015, vol. 38, p. 141-148.
- GILL, C. O.; HALL, M. J.; RATLEDGE, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida 107*) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Applied and environmental microbiology*, 1977, vol. 33, no 2, p. 231-239.
- GOVENDER, T., RAMANNA, L., RAWAT, I., & BUX, F. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource technology*, 2012, vol. 114, p. 507-511.
- GREENSPAN, P.; & FOWLER, S. D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of lipid research*, 1985, vol. 26, no 7, p. 781-789.
- GROENEWALD, M., BOEKHOUT, T., NEUVÉGLISE, C., GAILLARDIN, C., VAN DIJCK, P. W., & WYSS, M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical reviews in microbiology*, 2014, vol. 40, no 3, p. 187-206.
- GUERZONI, M. E., LAMBERTINI, P., LERCKER, G., & MARCHETTI, R. Technological potential of some starch degrading yeasts. *Starch-Stärke*, 1985, vol. 37, no 2, p. 52-57.

- GUJJARI, P., SUH, S. O., COUMES, K., & ZHOU, J. J. Characterization of oleaginous yeasts revealed two novel species: *Trichosporon cacaoliposimilis* sp. nov. and *Trichosporon oleaginosus* sp. nov. *Mycologia*, 2011, vol. 103, no 5, p. 1110-1118.
- HANSSON, L.; & DOSTÁLEK, M. Effect of culture conditions on fatty acid composition in lipids produced by the yeast *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1986, vol. 63, no 9, p. 1179-1184.
- HASSAN, M., BLANC, P. J., GRANGER, L. M., PAREILLEUX, A., & GOMA, G. Lipid production by an unsaturated fatty acid auxotroph of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown in single-stage continuous culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 1993, vol. 40, no 4, p. 483-488.
- HOPTON, J. W.; WOODBINE, M. Fat synthesis by yeasts. I. A comparative assessment of *Hansenula* species. *Journal of Applied Microbiology*, 1960, vol. 23, no 2, p. 283-290.
- HUANG, C., CHEN, X. F., XIONG, L., MA, L. L., & CHEN, Y. Single cell oil production from low-cost substrates: the possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology advances*, 2013a, vol. 31, no 2, p. 129-139.
- HUANG, C., CHEN, X. F., XIONG, L., YANG, X. Y., MA, L. L., & CHEN, Y. Microbial oil production from corn cob acid hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon coremiiforme*. *Biomass and Bioenergy*, 2013, vol. 49, p. 273-278.
- HUSAIN, S. S.; & HARDIN, M. M. Influence of carbohydrate and nitrogen sources upon lipid production by certain yeasts. *Journal of Food Science*, 1952, vol. 17, no 1-6, p. 60-66.
- ITOH, T.; WAKI, H.; & KANEKO, H. Changes of lipid composition with growth phase of *Cryptococcus neoformans*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1975, vol. 39, no 12, p. 2365-2371.
- JEWISON, T., KNOX, C., NEVEU, V., DJOUMBOU, Y., GUO, A. C., LEE, J., ... & WILSON, M. YMDB: the yeast metabolome database. *Nucleic acids research*, 2011, p. gkr916.
- JIGAMI, Y.; SUZUKI, O.; NAKASATO, S. Comparison of lipid composition of *Candida guilliermondii* grown on glucose, ethanol and methanol as the sole carbon source. *Lipids*, 1979, vol. 14, no 11, p. 937-942.
- JIRU, T. M., ABATE, D., KIGGUNDU, N., POHL, C., & GROENEWALD, M. Oleaginous yeasts from Ethiopia. *AMB Express*, 2016, vol. 6, no 1, p. 78.
- KAMISAKA, Y., KIMURA, K., UEMURA, H., & LEDESMA-AMARO, R. Modulation of gluconeogenesis and lipid production in an engineered oleaginous *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, vol. 100, no 18, p. 8147-8157.
- KIMURA, K.; YAMAOKA, M.; KAMISAKA, Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, vol. 56, no 3, p. 331-338.

KITCHA, S.; & CHEIRSILP, B. Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia*, 2011, vol. 9, p. 274-282.

KLEINZELLER, A. Fat formation in *Torulopsis lipofera*. *Biochemical Journal*, 1944, vol. 38, no 5, p. 480. Apud SITEPU, I. R., GARAY, L. A., SESTRIC, R., LEVIN, D., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 7, p. 1336-1360.

KRAISINTU, P., YONGMANITCHAI, W., & LIMTONG, S. Selection and optimization for lipid production of a newly isolated oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. *The Kasetsart journal (Nat Sci)*, 2010, vol. 44, p. 436-445.

KURTZMAN CP, SMITH M. Chapter 95. *Myxozyma* van der Walt, Weijman & von Arx. In: KURTZMAN CP, FELL J, BOEKHOUT T, editors. *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier; 2011. p. 1303–12.

KURTZMAN, C. P., MATEO, R. Q., KOLECKA, A., THEELEN, B., ROBERT, V., & BOEKHOUT, T. Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. *FEMS yeast research*, 2015, vol. 15, no 6, p. fov050.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; & BOEKHOUT, T. (ed.). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, 2011.

LAMERS, D., VAN BIEZEN, N., MARTENS, D., PETERS, L., VAN DE ZILVER, E., JACOBS-VAN DREUMEL, N., ... & LOKMAN, C. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. *BMC biotechnology*, 2016, vol. 16, no 1, p. 45.

LAMPRECHT, A.; & BENOIT, J.-P. Simple liquid-chromatographic method for Nile Red quantification in cell culture in spite of photobleaching. *Journal of Chromatography B*, 2003, vol. 787, no 2, p. 415-419.

LEDESMA-AMARO, R., DULERMO, R., NIEHUS, X., & NICAUD, J. M. Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids. *Metabolic engineering*, 2016, vol. 38, p. 38-46.

LEE, K., LEE, S. Y., NA, J. G., JEON, S. G., PRAVEENKUMAR, R., KIM, D. M., ... & OH, Y. K. Magnetophoretic harvesting of oleaginous *Chlorella* sp. by using biocompatible chitosan/magnetic nanoparticle composites. *Bioresource technology*, 2013, vol. 149, p. 575-578.

LEE, Y. C., KIM, B., FAROOQ, W., CHUNG, J., HAN, J. I., SHIN, H. J., ... & OH, Y. K. Harvesting of oleaginous *Chlorella* sp. by organoclay. *Bioresource technology*, 2013, vol. 132, p. 440-445.

LEIVA-CANDIA, D. E., PINZI, S., REDEL-MACÍAS, M. D., KOUTINAS, A., WEBB, C., & DORADO, M. P. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel*, 2014, vol. 123, p. 33-42.

LI, S. L., LIN, Q., LI, X. R., XU, H., YANG, Y. X., QIAO, D. R., & CAO, Y. Biodiversity of the oleaginous microorganisms in Tibetan Plateau. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, vol. 43, no 2, p. 627-634.

- LI, Y., HAN, D., SOMMERFELD, M., & HU, Q. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp.(Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource technology*, 2011, vol. 102, no 1, p. 123-129.
- LIU, H., ZHAO, X., WANG, F., JIANG, X., ZHANG, S., YE, M., ... & ZOU, H. The proteome analysis of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *FEMS yeast research*, 2011, vol. 11, no 1, p. 42-51.
- LÖSEL D. Chapter 10. Fungal lipids. In: RATLEDGE C, WILKINSON S, editors. *Microbial lipids*, vol. 1. London: Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich; 1988. p. 699–806.
- LUNDIN, H. Fat synthesis by micro-organisms and its possible applications in industry. *Journal of the Institute of Brewing*, 1950, vol. 56, no 1, p. 17-28.
- MAINA, S., PATERAKI, C., KOPSAHELIS, N., PARAMITHIOTIS, S., DROSINOS, E. H., PAPANIKOLAOU, S., & KOUTINAS, A. Microbial oil production from various carbon sources by newly isolated oleaginous yeasts. *Engineering in Life Sciences*, 2016.
- MAK, H. Y. Lipid droplets as fat storage organelles in *Caenorhabditis elegans* thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. *Journal of lipid research*, 2012, vol. 53, no 1, p. 28-33.
- MALKHAS' IAN, S. S., NECHAEV, A. P., GAVRILOVA, N. N., ZOTOVA, E. E., & DORONINA, O. D. Group and fatty acid composition of the lipids in yeasts of the genus *Candida*. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*, 1981, vol. 18, no 5, p. 621-629. Apud SITEPU, I. R., GARAY, L. A., SESTRIC, R., LEVIN, D., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 7, p. 1336-1360.
- MARTINEZ, A., CAVELLO, I., GARMENDIA, G., RUFO, C., CAVALITTO, S., & VERO, S. Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles*, 2016, vol. 20, no 5, p. 759-769.
- MATSUO, T., HASHIMOTO, Y., & HASHIDA, W. Method for producing cacao butter substitute. U.S. Patent No 4,268,527, 19 Mayo 1981.
- MATTANA, P., ROSA, P., POLI, J., RICHARDS, N., DABOIT, T., SCROFERNEKER, M. L., ... & VALENTE, P. Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. *Revista Brasileira de Biociências*, 2014a, vol. 12, no 2, p. 121.
- MATTANNA, P., DALLÉ DA ROSA, P., GUSSO, A. P., RICHARDS, N. S., & VALENTE, P. Enhancement of microbial oil production by alpha-linolenic acid producing *Yarrowia lipolytica* strains QU22 and QU137. *Food Science and Biotechnology*, 2014, vol. 23, no 6, p. 1929-1934.
- MCELROY, F. A.; & STEWART, H. B. The lipids of *Lipomyces lipofer*. *Canadian journal of biochemistry*, 1967, vol. 45, no 2, p. 171-178.

- MEESTERS, P. A. E. P.; HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied microbiology and biotechnology*, 1996, vol. 45, no 5, p. 575-579.
- MELO, R. C., D'ÁVILA, H., BOZZA, P. T., & WELLER, P. F. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Light Microscopy: Methods and Protocols*, 2011, p. 149-161.
- MOON, N. J.; HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. Conversion of Cheese Whey and Whey Permeate to Oil and Single-Cell Protein¹. *Journal of Dairy Science*, 1978, vol. 61, no 11, p. 1537-1547.
- MORIN, N., CESCUT, J., BEOPOULOS, A., LELANDAIS, G., LE BERRE, V., URIBELARREA, J. L., ... & NICAUD, J. M. Transcriptomic analyses during the transition from biomass production to lipid accumulation in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *PLoS one*, 2011, vol. 6, no 11, p. e27966.
- MOUSTOGIANNI, A., BELLOU, S., TRIANTAPHYLLOIDOU, I. E., & AGGELIS, G. Feasibility of raw glycerol conversion into single cell oil by zygomycetes under non-aseptic conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 2015, vol. 112, no 4, p. 827-831.
- MUNCH, G., SESTRIC, R., SPARLING, R., LEVIN, D. B., & CICEK, N. Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. *Bioresource technology*, 2015, vol. 185, p. 49-55.
- MURPHY, D. J. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*, 2012, vol. 249, no 3, p. 541-585.
- NAIK, S. N., GOUD, V. V., ROUT, P. K., & DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, vol. 14, no 2, p. 578-597.
- NETO, C. J. D., SYDNEY, E. B., DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P., & SOCCOL, C. R. Microbial Oil for Biodiesel Production. En *Green Fuels Technology*. Springer International Publishing, 2016. p. 387-406.
- NILSSON, R., ENEBO, L., LUNDIN, H., & MYRBÄCK, K. Mikrobielle Fettsynthese unter Verwendung von *Rhodotorula glutinis* nach dem Luftheferverfahren. *Sven Kem Tidskr*, 1943, vol. 55, p. 41-51. Apud SITEPU, I. R., GARAY, L. A., SESTRIC, R., LEVIN, D., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 7, p. 1336-1360.
- OCHOA-ESTOPIER, A.; & GUILLOUET, S. E. D-stat culture for studying the metabolic shifts from oxidative metabolism to lipid accumulation and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of biotechnology*, 2014, vol. 170, p. 35-41.
- OGURI, E., MASAKI, K., NAGANUMA, T., & IEFUJI, H. Phylogenetic and biochemical characterization of the oil-producing yeast *Lipomyces starkeyi*. *Antonie van leeuwenhoek*, 2012, vol. 101, no 2, p. 359-368.

- PAN, L. X., YANG, D. F., SHAO, L., LI, W., CHEN, G. G., & LIANG, Z. Q. Isolation of the Oleaginous Yeasts from the Soil and Studies of Their Lipid-Producing Capacities. *Food Technology & Biotechnology*, 2009, vol. 47, no 2.
- PAPANIKOLAOU, S., FAKAS, S., FICK, M., CHEVALOT, I., GALIOTOU-PANAYOTOU, M., KOMAITIS, M., ... & AGGELIS, G. 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*, 2008, vol. 32, no 1, p. 60-71.
- PAPANIKOLAOU, S.; & AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource technology*, 2002, vol. 82, no 1, p. 43-49.
- PAPANIKOLAOU, S.; & AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011, vol. 113, no 8, p. 1031-1051.
- PAPANIKOLAOU, S.; & AGGELIS, G. *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2010, vol. 112, no 6, p. 639-654.
- PARK, B. G., KIM, M., KIM, J., YOO, H., & KIM, B. G. Systems biology for understanding and engineering of heterotrophic oleaginous microorganisms. *Biotechnology Journal*, 2017, vol. 12, no 1, p. 1600104.
- PATEL, A., PRAVEZ, M., DEEBA, F., PRUTHI, V., SINGH, R. P., & PRUTHI, P. A. Boosting accumulation of neutral lipids in *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1 grown on hemp (*Cannabis sativa* Linn) seed aqueous extract as feedstock for biodiesel production. *Bioresource technology*, 2014, vol. 165, p. 214-222.
- PEDERSEN, T. A. Lipid formation in *Cryptococcus terricolus* 1. Nitrogen nutrition and lipid formation. *Acta chemica Scandinavica*, 1961, vol. 15, no 3, p. 651-62.
- POLBUREE, P., YONGMANITCHAI, W., LERTWATTANASAKUL, N., OHASHI, T., FUJIYAMA, K., & LIMTONG, S. 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*, 2015, vol. 119, no 12, p. 1194-1204.
- POLI, J. S., DA SILVA, M. A. N., SIQUEIRA, E. P., PASA, V. M., ROSA, C. A., & VALENTE, P. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: a potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource technology*, 2014a, vol. 161, p. 320-326.
- POLI, J. S., DALLÉ, P., SENTER, L., MENDES, S., RAMIREZ, M., VAINSTEIN, M. H., & VALENTE, P. Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *Revista Brasileira de Biociências*, 2013, vol. 11, no 2.
- POLI, J. S., LÜTZHØFT, H. C. H., KARAKASHEV, D. B., VALENTE, P., & ANGELIDAKI, I. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Bioresource technology*, 2014b, vol. 151, p. 388-391.

- QIAO, K., ABIDI, S. H. I., LIU, H., ZHANG, H., CHAKRABORTY, S., WATSON, N., ... & STEPHANOPOULOS, G. Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic engineering*, 2015, vol. 29, p. 56-65.
- RADULOVIC, M., KNITTELFELDER, O., CRISTOBAL-SARRAMIAN, A., KOLB, D., WOLINSKI, H., & KOHLWEIN, S. D. The emergence of lipid droplets in yeast: current status and experimental approaches. *Current genetics*, 2013, vol. 59, no 4, p. 231-242.
- RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society transactions*, 2002, vol. 30, no Pt 6, p. 1047.
- RATLEDGE, C. The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems. *Biotechnology letters*, 2014, vol. 36, no 8, p. 1557-1568.
- RATLEDGE, C; & COHEN, Z. Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils?. *Lipid Technology*, 2008, vol. 20, no 7, p. 155-160.
- RATLEDGE, C; & WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology*, 2002, vol. 51, p. 1-52.
- RATTRAY, J. B. M. Yeasts. *Microbial lipids*, 1988, vol. 1, p. 555-697.
- RATTRAY, J. B.; SCHIBECI, A.; KIDBY, D. K. Lipids of yeasts. *Bacteriological Reviews*, 1975, vol. 39, no 3, p. 197.
- ROSA, P.; MATTANNA, P.; VALENTE, P. Avaliação da síntese de lipídio pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33 em meio de cultura com glicose e sulfato de amônio. *Revista Brasileira de Biociências*, 2015, vol. 13, no 2.
- ROSSI, M., BUZZINI, P., CORDISCO, L., AMARETTI, A., SALA, M., RAIMONDI, S., ... & MATTEUZZI, D. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. *FEMS microbiology ecology*, 2009, vol. 69, no 3, p. 363-372.
- ROSSOUW, D., VAN DEN DOOL, A. H., JACOBSON, D., & BAUER, F. F. Comparative transcriptomic and proteomic profiling of industrial wine yeast strains. *Applied and environmental microbiology*, 2010, vol. 76, no 12, p. 3911-3923.
- RUENWAI, R.; CHEEVADHANARAK, S.; & LAOTENG, K. Overexpression of acetyl-CoA carboxylase gene of *Mucor rouxii* enhanced fatty acid content in *Hansenula polymorpha*. *Molecular biotechnology*, 2009, vol. 42, no 3, p. 327-332.
- SAENGE, C., CHEIRSILP, B., SUKSAROGUE, T. T., & BOURTOOM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 2011, vol. 46, no 1, p. 210-218.
- SALADINI, F., PATRIZI, N., PULSELLI, F. M., MARCHETTINI, N., & BASTIANONI, S. Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, vol. 66, p. 221-227.

- SANTAMAURO, F., WHIFFIN, F. M., SCOTT, R. J., & CHUCK, C. J. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnology for biofuels*, 2014, vol. 7, no 1, p. 34.
- SARAN, S., MATHUR, A., DALAL, J., & SAXENA, R. K. Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* A29. *Fuel*, 2017, vol. 188, p. 324-331.
- SCHMIDT, E. Eiweiß-und Fettgewinnung über Hefe aus Sulfitablauge. *Angewandte Chemie*, 1947, vol. 59, no 1, p. 16-20. Apud SITEPU, I. R., GARAY, L. A., SESTRIC, R., LEVIN, D., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 7, p. 1336-1360.
- SCHULZE, I., HANSEN, S., GROßHANS, S., RUDSZUCK, T., OCHSENREITHER, K., SYLDATK, C., & NEUMANN, A. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts-*Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB Express*, 2014, vol. 4, no 1, p. 24.
- SCHWEIZER, M. Lipids and membranes. The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*, 2004, p. 140-223.
- SENTHESHANMUGANATHAN, S.; NICKERSON, W. J. Nutritional control of cellular form in *Trigonopsis variabilis*. *Microbiology*, 1962, vol. 27, no 3, p. 437-449.
- SESTRIC, R., MUNCH, G., CICEK, N., SPARLING, R., & LEVIN, D. B. Growth and neutral lipid synthesis by *Yarrowia lipolytica* on various carbon substrates under nutrient-sufficient and nutrient-limited conditions. *Bioresource technology*, 2014, vol. 164, p. 41-46.
- SHENG, J.; FENG, X. Metabolic engineering of yeast to produce fatty acid-derived biofuels: bottlenecks and solutions. *Frontiers in microbiology*, 2015, vol. 6, p. 554.
- SHENG, J.; & FENG, X. Metabolic engineering of yeast to produce fatty acid-derived biofuels: bottlenecks and solutions. *Frontiers in microbiology*, 2015, vol. 6.
- SHI, J., FENG, H., LEE, J., & CHEN, W. N. Comparative proteomics profile of lipid-cumulating oleaginous yeast: An iTRAQ-coupled 2-D LC-MS/MS analysis. *PLoS one*, 2013, vol. 8, no 12, p. e85532.
- SHI, S., JI, H., SIEWERS, V., & NIELSEN, J. Improved production of fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* through screening a cDNA library from the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS yeast research*, 2016, vol. 16, no 1, p. f0v108.
- SIGNORI, L., AMI, D., POSTERI, R., GIUZZI, A., MEREGHETTI, P., PORRO, D., & BRANDUARDI, P. Assessing an effective feeding strategy to optimize crude glycerol utilization as sustainable carbon source for lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Microbial cell factories*, 2016, vol. 15, no 1, p. 75.
- SITEPU, I. R., GARAY, L. A., SESTRIC, R., LEVIN, D., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 7, p. 1336-1360.

- SITEPU, I. R., IGNATIA, L., FRANZ, A. K., WONG, D. M., FAULINA, S. A., TSUI, M., ... & BOUNDY-MILLS, K. An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *Journal of microbiological methods*, 2012, vol. 91, no 2, p. 321-328.
- SITEPU, I. R., SESTRIC, R., IGNATIA, L., LEVIN, D., GERMAN, J. B., GILLIES, L. A., ... & BOUNDY-MILLS, K. L. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresource technology*, 2013, vol. 144, p. 360-369.
- SMEDSGAARD, J.; & NIELSEN, J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *Journal of experimental botany*, 2005, vol. 56, no 410, p. 273-286.
- SOCCOL, C. R., NETO, C. J. D., SOCCOL, V. T., SYDNEY, E. B., DA COSTA, E. S. F., MEDEIROS, A. B. P., & DE SOUZA, L. P. Pilot scale biodiesel production from microbial oil of *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresource technology*, 2017, vol. 223, p. 259-268.
- SOUZA, K. S. T., RAMOS, C. L., SCHWAN, R. F., & DIAS, D. R. Lipid production by yeasts grown on crude glycerol from biodiesel industry. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2017, p. 1-7.
- STANIER R. Some aspects of microbiological research in Germany. BIOS Final Report No 691, Item No 24. London: British Intelligence Objectives Sub-Committee; 1946.
- STARKEY, R. L. Lipid production by a soil yeast. *Journal of bacteriology*, 1946, vol. 51, no 1, p. 33.
- TAI, M.; & STEPHANOPOULOS, G. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic engineering*, 2013, vol. 15, p. 1-9.
- TANG, X., CHEN, H., CHEN, Y. Q., CHEN, W., GARRE, V., SONG, Y., & RATLEDGE, C. Comparison of biochemical activities between high and low lipid-producing strains of *Mucor circinelloides*: an explanation for the high oleaginicinity of strain WJ11. *PLoS one*, 2015, vol. 10, no 6, p. e0128396.
- TANIMURA, A., TAKASHIMA, M., SUGITA, T., ENDOH, R., KIKUKAWA, M., YAMAGUCHI, S., ... & SHIMA, J. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresource technology*, 2014, vol. 153, p. 230-235.
- TANIMURA, A., TAKASHIMA, M., SUGITA, T., ENDOH, R., OHKUMA, M., KISHINO, S., ... & SHIMA, J. Lipid production through simultaneous utilization of glucose, xylose, and l-arabinose by *Pseudozyma hubeiensis*: a comparative screening study. *AMB Express*, 2016, vol. 6, no 1, p. 58.
- TATSUMI, C., HASHIMOTO, Y., TERASHIMA, M., & MATSUO, T. Method for producing cacao butter substitute. U.S. Patent No 4,032,405, 28 Jun. 1977.
- THEVENIEAU, F.; & NICAUD, J.-. Microorganisms as sources of oils. *Ocl*, 2013, vol. 20, no 6, p. D603.

- THIRU, M.; SANKH, S.; & RANGASWAMY, V. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresource technology*, 2011, vol. 102, no 22, p. 10436-10440.
- TURCOTTE, G.; & KOSARIC, N. Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts. En *Bioprocesses and Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 1989. p. 73-92.
- VIEIRA, J. P. F., IENCZAK, J. L., ROSSELL, C. E. V., PRADELLA, J. G. C., & FRANCO, T. T. Microbial lipid production: screening with yeasts grown on Brazilian molasses. *Biotechnology letters*, 2014, vol. 36, no 12, p. 2433-2442.
- VIÑARTA, S. C., ANGELICOLA, M., BARROS, J. M., FERNÁNDEZ, P. M., MAC CORMAK, W., AYBAR, M. J., & DE FIGUEROA, L. I. Oleaginous yeasts from Antarctica: Screening and preliminary approach on lipid accumulation. *Journal of basic microbiology*, 2016, vol. 56, no 12, p. 1360-1368.
- VORAPREEDA, T., THAMMARONGTHAM, C., CHEEVADHANARAK, S., & LAOTENG, K. Alternative routes of acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology*, 2012, vol. 158, no 1, p. 217-228.
- VYAS, S.; & CHHABRA, M. Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast. *Bioresource technology*, 2017, vol. 223, p. 250-258.
- WANG, G. Y., ZHANG, Y., CHI, Z., LIU, G. L., WANG, Z. P., & CHI, Z. M. Role of pyruvate carboxylase in accumulation of intracellular lipid of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, vol. 99, no 4, p. 1637-1645.
- WANG, H. T., MENG, Y. Y., CAO, X. P., AI, J. N., ZHOU, J. N., XUE, S., & WANG, W. L. Coordinated response of photosynthesis, carbon assimilation, and triacylglycerol accumulation to nitrogen starvation in the marine microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Haptophyta). *Bioresource technology*, 2015, vol. 177, p. 282-288.
- WANG, J., LI, R., LU, D., MA, S., YAN, Y., & LI, W. A quick isolation method for mutants with high lipid yield in oleaginous yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 25, no 5, p. 921-925.
- WANG, Q., GUO, F. J., RONG, Y. J., & CHI, Z. M. Lipid production from hydrolysate of cassava starch by *Rhodospiridium toruloides* 21167 for biodiesel making. *Renewable Energy*, 2012, vol. 46, p. 164-168.
- WINTER, G.; & KRÖMER, J. O. Fluxomics—connecting ‘omics analysis and phenotypes. *Environmental microbiology*, 2013, vol. 15, no 7, p. 1901-1916.
- WOODBINE, M. Microbial fat: Microorganisms as potential fat producers. *Progress in industrial microbiology*, 1959, vol. 1, p. 181-245.
- WORKMAN, M.; HOLT, P.; THYKAER, J. Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *Amb Express*, 2013, vol. 3, no 1, p. 58.

- YEN, K., LE, T. T., BANSAL, A., NARASIMHAN, S. D., CHENG, J. X., & TISSENBAUM, H. A. A comparative study of fat storage quantitation in nematode *Caenorhabditis elegans* using label and label-free methods. *PloS one*, 2010, vol. 5, no 9, p. e12810.
- YKEMA, A., VERBREE, E. C., KATER, M. M., & SMIT, H. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in wheypermeate. *Applied microbiology and biotechnology*, 1988, vol. 29, no 2, p. 211-218.
- YOON, S. H.; RHEE, J. S. Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipid production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1983, vol. 60, no 7, p. 1281-1286.
- YOUSUF, A., SANNINO, F., ADDORISIO, V., & PIROZZI, D. Microbial conversion of olive oil mill wastewaters into lipids suitable for biodiesel production. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2010, vol. 58, no 15, p. 8630-8635.
- ZHANG H., ZHANG, L., CHEN, H., CHEN, Y. Q., RATLEDGE, C., SONG, Y., & CHEN, W. Regulatory properties of malic enzyme in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*, and its non-involvement in lipid accumulation. *Biotechnology letters*, 2013, vol. 35, no 12, p. 2091-2098.
- ZHANG, B., RONG, C., CHEN, H., SONG, Y., ZHANG, H., & CHEN, W. De novo synthesis of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbial cell factories*, 2012, vol. 11, no 1, p. 51.
- ZHELIFONOVA, V. P., KRYLOVA, N. I., DEDYUKHINA, E. G., & EROSHIN, V. K. Investigation of lipid-forming yeasts growing on a medium with ethanol [Cryptococcus, Lipomyces, Trichosporon, Endomyces, Torulopsis]. *Microbiology (USA)*, 1983, vol. 52, p. 219–24.
- ZHU, Z., ZHANG, S., LIU, H., SHEN, H., LIN, X., YANG, F., ... & ZHAO, Z. K. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature communications*, 2012, vol. 3, p. 1112.
- ZOTOVA, E. E.; GAVRILOVA, N. N.; NECHAEV, A. P. The influence of cultivation conditions on the lipid composition of *Candida humicola* 2043. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*, 1985, vol. 21, no 5, p. 634-639. Apud SITEPU, I. R., GARAY, L. A., SESTRIC, R., LEVIN, D., BLOCK, D. E., GERMAN, J. B., & BOUNDY-MILLS, K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnology advances*, 2014, vol. 32, no 7, p. 1336-1360.

CURRICULUM VITAE
RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4149792413731874>

DADOS PESSOAIS

Nome: Mauricio Ramírez Castrillón

Local e data de nascimento: Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colômbia, 01 de junho de 1988

Endereço profissional: Calle 5 No. 62-00, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colômbia

Telefone profissional: +57 3017505494 **E-mail:** mauricio.ramirez00@usc.edu.co

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Doutorado

2012 – 2017

Doutorado (candidato) em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Orientador: Patrícia Valente da Silva

Bolsista do(a): Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS, Colômbia.

Doutorado sanduíche

2015-2016

Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Supervisor: Vincent Robert)

Bolsista do(a): Programa Ciência sem Fronteiras, CNPq

Mestrado

2011 - 2012

Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: TIPAGEM MOLECULAR DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A VINHOS DO SUL DO BRASIL: PADRONIZAÇÃO DE MSP-PCR FINGERPRINTING, Ano de obtenção: 2012

Orientador: Patrícia Valente da Silva

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Graduação

2004 - 2009

Graduação em Biología.

Universidad Del Valle, UNIVALLE, Cali, Colômbia

Título: Isolamento, identificação molecular e caracterização parcial das leveduras associadas à

Orientador: Esteban Osorio Cadavid

Formação complementar

2016

Curso de curta duração em Ilustração digital de microfungos: desenho e montagem de fotos em pranchas. (Carga horária: 8h). Sociedade Brasileira de Micologia, SBM, Rio De Janeiro, Brasil

Curso de curta duração em Ferramentas de Bioinformática aplicadas as análises de sequências de RNAseq. (Carga horária: 80h). Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Petropolis, Brasil

Curso de curta duração em Biodiversidad y Biotecnologia de levaduras. (Carga horária: 80h). Universidad Nacional del Comahue, UNCOMA, Neuquén, Argentina. Bolsista do(a): United Nations University BIOLAC

2015

Extensão universitária em Acessando a diversidade genômica através do sequenciamento ion torrent. (Carga horária: 12h). Fundação Irmão José Otão, FIJO, Brasil

Extensão universitária em Inglês para fins acadêmicos: apresentações orais - Básico, nível B1. (Carga horária: 16h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Extensão universitária em FAB. CASEIRA DE CERVEJA E MANIPULAÇÃO DE FERMENTO. (Carga horária: 20h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

2014

Curso de curta duração em Workshop: Introduction to Transcriptional Network. (Carga horária: 15h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Introdução ao STATISTICA. (Carga horária: 4h). StatSoft South América Comercio de Software Ltda, StatSoft , Sao Caetano Do Sul, Brasil

2010

Curso de curta duração em Curso Básico de Primeros Auxilios. (Carga horária: 20h). Cruz Roja Colombiana Seccional Valle, CRC, Colômbia.

2009

Curso de curta duração em Metagenomics and Bioinformatics. (Carga horária: 56h). Pontificia Universidad Javeriana - Bogotá, JAVERIANA, Bogotá, Colômbia

2008

Curso de curta duração em Diseño Web con Macromedia Dreamweaver MX. (Carga horária: 40h). Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA, Colômbia

2007

Curso de curta duração em Citogenética y conservacion de primates. (Carga horária: 32h). Universidad Nacional de Colombia - Bogotá, UNAL/Bogotá, Bogotá, Colômbia

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

1. Universidad Icesi – UI - 2009 - 2010

Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Professor Auxiliar Hora Catedra , Carga horária: 38, Regime: Parcial

Monitor coordinador y encargado de 2 grupos en semestre enero-junio de 2010

Pesquisa e Desenvolvimento, Facultad de Ciencias Naturales

Diversificación de especies del complejo Piper trianae

Preparación de preprácticas y coordinación de monitores biología celular

Graduação, Laboratorio de Biología Celular

Disciplinas ministradas: Laboratorio de Biología Celular

2. Universidad Del Valle – UNIVALLE – 2008-2011

Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Investigador , Carga horária: 5, Regime: Parcial

Vínculo: Monitor, Enquadramento funcional: Docencia - Biotecnología Molecular (pregrado) , Carga horária: 7, Regime: Parcial

Vínculo: Monitor, Enquadramento funcional: Monitor Plan Talentos - Biología , Carga horária: 16, Regime: Parcial

Vínculo: Monitor, Enquadramento funcional: Extensión - Lab MIA , Carga horária: 10, Regime: Parcial

Laboratorio de Microbiología Industrial y Ambiental -MIA-, Departamento de Biología

Vínculo: Monitor , Enquadramento funcional: Monitor Lab. Docencia Biología , Carga horária: 10, Regime: Parcial

Extensão Universitária, Departamento de Biología

Curso de extensión teórico - práctico: Herramientas eficientes para la identificación de levaduras de interés agroindustrial

II Simposio de la Red Colombiana de Biología Evolutiva

Charles Darwin 200 años

Seminario de Tópicos Actuales de Investigación en Genética

3. Fundación Universidad del Valle – FUV - 2010

Vínculo: Profesor tutor, Enquadramento funcional: Tutor Plan Talentos Biología , Carga horária: 12, Regime: Parcial

4. Asolinneo – ASOLINNEO – 2009- Atual

Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Miembro fundador , Carga horária: 5, Regime: Parcial

Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Presidente encargado , Carga horária: 10, Regime: Parcial

Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Secretario , Carga horária: 5, Regime: Parcial

5. Universidad Santiago de Cali - U.SANTIAGO CALI – 2017 - atual

Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor tempo completo, Carga horária: 30, Regime: Parcial

Disciplinas ministradas: Biomoléculas , Biología Celular e Molecular

6. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – 2012 - atual

Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno de Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Integral

Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno de mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicación exclusiva

Microbiología Molecular e Biotecnología de Leveduras , Identificação molecular de fungos patogênicos

Revisor de periódico

1. Medical Mycology (Oxford. Print)

2014 - Atual

2. Acta Agronomica

2013 - Atual

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. ORTIZ-MONSALVE, SANTIAGO; DORNELLES, JULIANA; POLL, EDUARDO; RAMIREZ-CASTRILLÓN, MAURICIO; VALENTE, PATRICIA; GUTTERRES, MARILIZ. Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa*. *PROCESS SAFETY AND ENVIRONMENTAL PROTECTION*, v. 109, p. 437-451, 2017.
2. HEIDRICH, DAIANE; GONZALEZ, GLORIA M.; PAGANI, DANIELLE M.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, MAURICIO; LUCIA SCROFERNEKER, MARIA. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella similis*: case report. *MEDICAL MYCOLOGY CASE REPORTS*, v. 16, p. 25-27, 2017.
3. MENDES, S.D.C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; Valente, P. Environmental yeast communities in vineyards in the mountains of Santa Catarina State, Brazil. *WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY*, v. 33, p. 128, 2017.
4. RAMIREZ-CASTRILLON, M.; MENDES, S.D.C.; VALENTE, P. SOUTH BRAZILIAN WINES: COMPOSITION OF CULTURABLE YEASTS ASSOCIATED TO BOTTLED WINES PRODUCED IN RIO GRANDE DO SUL AND SANTA CATARINA. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 77, 2017
5. Vasquez, J.A.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MONSALVE, Z. I. Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*. v.18, p.128 - 138, 2016.
6. GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; AZEVEDO, C. M. P. S.; SALGADO, C. G.; SILVA, M. B.; QUEIROZ-TELLES, F.; MARQUES, S. G.; SANTOS, D. W. C. L.; ANDRADE, T. S.; TAKAGI, E. H.; CRUZ, K. S.; FORNARI, G.; HAHN, R. C.; SCROFERNEKER, M. L.; BASQUES, R.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; ARAUJO, D. P.; HEIDRICH, D.; COLOMBO, A. L.; HOOG, S. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Online). , v.10, p.e0005102 - , 2016.
7. FORMOSO, A.; HEIDRICH, D.; LEITE, B.; SCROFERNEKER, M. L.; LANDELL, M.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; ORTIZ-MONSALVE, S. Enzymatic Activity and Susceptibility to Antifungal Agents of Brazilian Environmental Isolates of *Hortaea werneckii*. *Mycopathologia* (1975. Print), v.180, p.345 - 352, 2015.

8. CASSANEGO, D. B.; RICHARDS, N. S. P. S.; MAZUTTI, M. A.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M. Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. *Ciência e Natura.* , v.37, p.175 - 186, 2015.
9. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; INOSTROZA-PONTA, M.; Valente, P. (GTG)5 MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated Yeasts?. *Plos One*, v.9, p.e105870 - , 2014.
10. SILVA-BEDOYA, L.M.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; OSORIO-CADAVID, E. Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. *Brazilian Journal of Microbiology (Impresso)*, v.45, p.135 - 142, 2014.
11. DABOIT, T. C.; MAGAGNIN, C. M.; HEIDRICH, D.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; VETTORATO, G.; Valente, P.; SCROFERNEKER, M. L. A Case of Relapsed Chromoblastomycosis Due to *Fonsecaea monophora*: Antifungal Susceptibility and Phylogenetic Analysis. *Mycopathologia (1975. Print)*, v.176, p.139 - 144, 2013.
12. STOPIGLIA, C. D. O.; MAGAGNIN, C. M.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; HEIDRICH, D.; Valente, P.; SCROFERNEKER, M. L. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Medical Mycology (Oxford. Online)*, p.1 - 9, 2013.
13. POLI, J. S.; ROSA, P. D.; SENTER, L.; MENDES, S. D. C.; Ramirez, M.; VAINSTAIN, M. H.; Valente, P. 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, 2013.
14. SCROFERNEKER, M. L.; DABOIT, T. C.; HEIDRICH, D.; MAGAGNIN, C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; SANTOS, I. S.; VIGOLO, S.; AMARO, T. G.; VETTORATO, G.; Valente, P. Phaeohyphomycosis due *Peyronellaea zae-maydis*: molecular and phenotypic characterization of clinical isolate. *Mycoses (Berlin. Internet)*, v.56, p.89 - 89, 2013.
15. DABOIT, T. C.; DUQUIA, R. P.; MAGAGNIN, C. M.; MENDES, S. D. C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; STEGLICH, R.; SANTOS, I. S.; VETTORATO, G.; Valente, P.; SCROFERNEKER, M. L. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Medical Mycology Case Reports*, v.1, p.72 - 75, 2012.
16. LOPEZ, W. A.; Ramirez, M.; MAMBUSCAY, L. A.; OSORIO, E. DIVERSIDAD DE LEVADURAS ASOCIADAS A CHICHAS TRADICIONALES DE COLOMBIA. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v.12, p.176 - 186, 2010.
17. OSORIO, E.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; LOPEZ, W. A.; MAMBUSCAY, L. A. ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO SENCILLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LEVADURAS. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v.11, p.125 - 131, 2009.
18. DIAZ, F.; PIZARRO, M. L.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MOLINA, Y. F.; SOLARTE, D. M.; BRAVO, D.; HURTADO, A.; CARDENAS, H. EVALUACION

DE DOS MEDIOS DE CULTIVO Y HEREDABILIDAD DE PRODUCTIVIDAD Y TIEMPO DE DESARROLLO PARA TRES MUTANTES DE *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae). *Acta Biologica Colombiana*, v.13, p.161 - 174, 2008.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; ARCARI, S. G.; Valente, P. COMPOSTOS AROMÁTICOS PRODUZIDAS POR LEVEDURAS DO GÊNERO *Saccharomyces* In: VIII Congresso Brasileiro de Micologia, 2016, Florianópolis. ANAIS 2016 #respiraFungo VIII Congresso Brasileiro de Micologia. Florianópolis: UFSC, 2016. v.1. p.667 - 667
- LAZAROTTO, L.; HEIDRICH, D.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; FLORES, C.; ALVES, K. O.; FERNANDES, E. K.; Valente, P.; SCROFERNEKER, M. L. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE AGENTES DA CROMOBLASTOMICÓSE DA MICOTECA DO LABORATÓRIO DE FUNGOS PATOGÊNICOS DO ICBS/UFRGS In: VIII Congresso Brasileiro de Micologia, 2016, Florianópolis. ANAIS 2016 #respiraFungo VIII Congresso Brasileiro de Micologia. Florianópolis: UFSC, 2016. v.1. p.303 - 303
- PALÚ, A. P.; BRETAS, A.; HEIDRICH, D.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; SCROFERNEKER, M. L.; Valente, P. ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DA SUPERFÍCIE E POLPA DE MAÇÃS PARA BIOCONTROLE DE *Penicillium expansum* In: VIII Congresso Brasileiro de Micologia, 2016, Florianópolis. ANAIS 2016 #respiraFungo VIII Congresso Brasileiro de Micologia. Florianópolis: UFSC, 2016. v.1. p.894 - 894
- RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; FABRICIO, M. F.; AYUB, M. A. Z.; Valente, P. PERFIL LIPÍDICO DE *Papiliotrema flavescens* BI281, UMA NOVA LEVEDURA OLEAGINOSA In: IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, 2016, Porto Alegre. Anais do IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada. Porto Alegre: UFRGS, 2016. v.IX. p.bi004 - bi004
- RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; JARAMILLO-GARCIA, V. P.; HENRIQUES, J. A. P.; ROSA, P. D.; LANDELL, M.; VU, D.; ROBERT, V.; Valente, P. SELEÇÃO E MELHORAMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Papiliotrema flavescens* BI281, UMA NOVA LEVEDURA OLEAGINOSA EM RIO GRANDE DO SUL In: VIII Congresso Brasileiro de Micologia, 2016, Florianópolis. ANAIS 2016 #respiraFungo VIII Congresso Brasileiro de Micologia. Florianópolis: UFSC, 2016. v.1. p.661 - 661
- RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; JARAMILLO-GARCIA, V. P.; HENRIQUES, J. A. P.; FLORES, C.; HEPP, R.; Valente, P. SCREENING OF YEASTS WITH HIGH CONTENT LIPID ISOLATED FROM RIO GRANDE DO

- SUL, BRAZIL In: 28 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianopolis. Anais do 28 Congresso Brasileiro de Microbiologia. SBM, 2015. p.R0714-2 -
- RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; JARAMILLO-GARCIA, V. P.; HENRIQUES, J. A. P.; FLORES, C.; HEPP, R.; Valente, P. Searching for oleaginous yeasts in Rio Grande do Sul: Fluorescence as High Throughput Screening method In: VIII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, 2015, Porto Alegre. Anais do VIII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada. Porto Alegre: PPGMAA - UFRGS, 2015. v.NA.
 - FLORES, C.; MENDES, S. D. C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; HEPP, R.; ARCARY, S. G.; Valente, P. Yeast selection for the production of fermented pineapple beverage In: 28 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianopolis. Anais do 28 Congresso Brasileiro de Microbiologia. SBM, 2015. v.NA. p.R0714 -
 - ROSA, P. D.; MATTANNA, P.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; Valente, P. Aplicação da metodologia de superfície de resposta na produção de óleo microbiano com sulfato de amônio limitante In: VIII Congresso Latinoamericano de Micología, 2014, Medellin. Actualidades Biologicas. Medellin: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.197 - 197
 - FORMOSO, A.; LEITE, B.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; Valente, P. Avaliação da produção de enzimas extracelulares de leveduras isoladas de macrófitas de uma marisma do sul do Brasil In: VIII Congresso Latinoamericano de Micología, 2014, Medellin. Actualidades Biologicas. Medellin: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.209 - 209
 - ROSA, P. D.; MENDES, S. D. C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; Valente, P. Avaliando com Vermelho de Nilo o melhoramento da produção de lipídio pela levedura *Candida zeylanoides* QU33 com peptona limitante In: VIII Congresso Latinoamericano de Micología, 2014, Medellin. Actualidades Biologicas. Medellin: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.197 - 198
 - MENDES, S. D. C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; PIRES-FELDBERG, N.; BERTOLD, F. C.; Valente, P. Comunidade funcional de leveduras em ambiente de parreirais de Santa Catarina, Brasil In: VIII Congresso Latinoamericano de Micología, 2014, Medellin. Actualidades Biologicas. Medellin: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.232 - 233
 - RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; Valente, P. Leveduras asociadas a vinos finos y coloniales de los estados de Rio Grande do Sul y Santa Catarina (sur de Brasil) In: VII Congresso Brasileiro de Micologia, 2014, Medellin. Actualidades Biologicas. Medellin: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.228 - 228
 - RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; INOSTROZA-PONTA, M.; Valente, P. ¿MSP-PCR fingerprinting usando el primer (GTG)₅ realmente funciona como técnica de agrupamiento de leveduras asociadas a vinos? In:

- VIII Congreso Latinoamericano de Micología, 2014, Medellín. Actualidades Biológicas. Medellín: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.210 - 210
- MENDES, S. D. C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; HEIDRICH, D.; SCROFERNEKER, M. L.; Valente, P. Saccharomyces (sensu stricto) asociadas a vinhedos de Santa Catarina (sur de Brasil) In: VIII Congreso Latinoamericano de Micología, 2014, Medellín. Actualidades Biológicas. Medellín: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.204 - 205
 - SCROFERNEKER, M. L.; DABOIT, T. C.; MAGAGNIN, C. M.; HEIDRICH, D.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; VETTORATO, G.; Valente, P. CROMOBLASTOMICOSE POR FONSECAEA MONOPHORA: RELATO DE UM CASO In: XLIX CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2013, Campo Grande. Resumos XLIX CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. , 2013. v.1. p.347 -
 - MENDES, S. D. C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; Valente, P. DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A VINHOS DO SUL DO BRASIL In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2013, BELEM DO PARA. LIVRO DE RESUMOS VII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA. BELEM DO PARA: Sociedade Brasileira de Micologia, 2013. v.VII. p.316 - 316
 - SCROFERNEKER, M. L.; DABOIT, T. C.; DUQUIA, R. P.; MAGAGNIN, C. M.; MENDES, S. D. C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; STEGLICH, R.; SANTOS, I. S.; VETTORATO, G.; Valente, P. UM CASO DE INFECÇÃO POR EXOPHIALA SPINIFERA NO SUL DO BRASIL: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS In: XLIX CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2013, Campo Grande. Resumos XLIX CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. , 2013. v.1. p.641 -
 - SILVA-BEDOYA, L. M.; OSORIO, E.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M. Aislamiento, identificación molecular y caracterización parcial de levaduras asociadas a los lagos de la Universidad del Valle (sede Melendez) Cali, Colombia In: Tercer congreso colombiano de microbiología, 2012, Medellín. Hechos Microbiológicos Memorias Tercer congreso colombiano de microbiología. Medellín: UDEA, 2012. v.2. p.80 - 80
 - SILVA-BEDOYA, L. M.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; OSORIO, E. DIVERSIDAD DE LEVADURAS ASOCIADAS A DOS LAGOS ARTIFICIALES DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE In: XXI ALAM Congresso Latinoamericano de Microbiología, 2012, Santos, SP. XXI ALAM Congresso Latinoamericano de Microbiología PROGRAMA E RESUMOS. Santos: Tifani Luri Nissato Hanashiro, 2012. v.1. p.68 - 68
 - RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; INOSTROZA-PONTA, M.; Valente, P. TIPAGEM MOLECULAR DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A VINHOS DO SUL DO BRASIL: PADRONIZAÇÃO DE MSP-PCR

- FINGERPRINTING USANDO O PRIMER (GTG)₅ In: XXI ALAM Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos, SP. XXI ALAM Congresso Latinoamericano de Microbiologia PROGRAMA E RESUMOS. Santos: Tifani Luri Nissato Hanashiro, 2012. v.1. p.68 - 68
- Ramírez, M.; LOPEZ, W. A.; MAMBUSCAY, L. A.; OSORIO, E. Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas à "chicha", uma bebida fermentada artesanal colombiana In: V Simposio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, 2011, Porto Alegre. V Simposio Brasileiro de Microbiologia Aplicada. Porto Alegre: UFRGS, 2011. v.1. p.59 - 59
 - MENDES, S. D. C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; KELLER, M.; LOPEZ, W. A.; MAMBUSCAY, L. A.; OSORIO, E.; Valente, P. ESTUDO DA DINÂMICA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A VINHOS DO SUL DO BRASIL E "CHICHAS" COLOMBIANAS In: 9 Simposio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2011, Campinas/SP. CD de resumos 9 Slaca. Campinas: Unicamp, 2011. v.1. p.11574 - 11574
 - ROSA, P. D.; Ramírez, M.; MENDES, S. D. C.; LANDELL, M.; TOSTA, A.; VAINSTAIN, M. H.; Valente, P. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS ISOLADAS DE QUEIJO COLONIAL ARTESANAL In: V SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 2011, Porto Alegre. ANAIS DO V SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA. Porto Alegre: UFRGS, 2011. v.1. p.69 - 69
 - RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; LOPEZ, W. A.; MAMBUSCAY, L. A.; OSORIO, E. Aislamiento, identificación molecular y caracterización parcial de las levaduras asociadas a las chichas de maiz, piña y arracacha In: II Congreso Nacional de Estudiantes de Biología, 2009, Bogotá. Libro de Memorias II congreso nacional de estudiantes de biología. Bogotá: ARFO Editores, 2009. v.1. p.47 - 48
 - DIAZ, J. H.; DIAZ, F.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; SOLARTE, D. M.; CARDENAS, H. HEREDABILIDAD DE LA PRODUCTIVIDAD Y EL TIEMPO DE DESARROLLO ASOCIADOS A LA INCIDENCIA DE LA CAPACIDAD VISUAL DURANTE EL CORTEJO EN *Drosophila melanogaster* In: XLIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, 2009, Popayan. Memorias del XLIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. , 2009. v.1.
 - RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; DIAZ, J. H.; SIERRA, J. C.; OSPINA, O. E.; JURADO, L.; CARDENAS, H. EFECTO DE LA PIGMENTACIÓN DEL CUERPO EN LA REGRESIÓN PARENTAL-CRÍA DE LAS CEPAS black (b//b) Y Silvestre (+//+) DE *D. melanogaster* (DROSOPHILIDAE) In: Simposio de la Red Colombiana de Biología Evolutiva, 2008, Bogotá. Memorias del Simposio de la Red Colombiana de Biología Evolutiva. Margarita Ramos, 2008. v.1. p.4 - 4
 - RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MOLINA, Y. F.; OCAMPO, S. P. Comparación de la estructura y composición de la anurofauna presente en dos zonas con

diferente grado de uso del suelo en la vereda “Morales” de Caloto (Cauca, Colombia) In: III COLOQUIO SOBRE INVESTIGACION ECOLOGICA EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, 2006, Cali. MEMORIAS DEL III COLOQUIO SOBRE INVESTIGACION ECOLOGICA EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, GRUPO DE INVESTIGACION EN ECOLOGIA ANIMAL APLICADA. Cali: Universidad del Valle, 2006. v.3. p.16 - 16

- DIAZ, F.; FONG, C.; CASTANO, L.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; PIZARRO, M. L.; OSORIO, J. C.; MOLINA, Y. F.; BRAVO, D.; SOLARTE, D. M.; CARDENAS, H. Efecto del medio de cultivo, las mutantes w, vg, CyLv y la densidad poblacional de huevos en diferentes parámetros del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* In: XLI CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, 2006, Quibdó, Chocó. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Armenia: , 2006. v.18.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

- RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; Valente, P. DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A VINHOS DO RIO GRANDE DO SUL E SANTA CATARINA (BRASIL) In: VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia e Encontro Nacional dos Estudantes de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 2014, Porto Alegre. Anais VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia e Encontro Nacional dos Estudantes de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre: UFRGS, 2014. v.1. p.124 - 124
- MENDES, S. D. C.; HEIDRICH, D.; SCROFERNEKER, M. L.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; Valente, P. LINHAGENS DE *Saccharomyces* ASSOCIADAS A VINHEDOS DE SANTA CATARINA In: VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia e Encontro Nacional dos Estudantes de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 2014, Porto Alegre. Anais VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia e Encontro Nacional dos Estudantes de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre: UFRGS, 2014. v.1. p.137 - 137

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

- Fernanda Fraga Gomes. Identificação molecular da comunidade de leveduras associadas a macrófitas aquáticas em uma região de marisma da Lagoa dos Patos (RS). 2016. Curso (Ciências Biológicas: Ênfases Biologia Marinha e Costeira) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Luisa Usman. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LEVADURAS ASOCIADAS A LA PULPA DE LOS FRUTOS DE MANGO (*Mangifera indica*) Y POMARROSO (*Syzygium malaccense*). 2012. Curso (Biología) - Universidad Del Valle
- Lina Marcela Silva Bedoya. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LEVADURAS ASOCIADAS A LOS LAGOS DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE (SEDE MELÉNDEZ) CALI, COLOMBIA. 2012. Curso (Biología) - Universidad Del Valle