



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANELISE BAPTISTA DA SILVA

Investigação de leveduras de ocorrência ambiental com o potencial metabólico de consumo do glicerol bruto derivado da produção de biodiesel e caracterização dos produtos gerados

PORTO ALEGRE

2013

ANELISE BAPTISTA DA SILVA

Investigação de leveduras de ocorrência ambiental com o potencial metabólico de consumo do glicerol bruto derivado da produção de biodiesel e caracterização dos produtos gerados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Medina da Silva

PORTO ALEGRE

2013

ANELISE BAPTISTA DA SILVA

Investigação de leveduras de ocorrência ambiental com o potencial metabólico de consumo do glicerol bruto derivado da produção de biodiesel e caracterização dos produtos gerados

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Rosane Souza da Silva

Prof. Dr. Cláudio Luis Crescente Frankenberg

Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

PORTO ALEGRE

2013

AGRADECIMENTOS

À PUCRS pela concessão da bolsa de mestrado, sem a qual nada disso seria possível.

Aos professores do Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Biociências, em especial à minha orientadora Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório e à minha coorientadora Profa. Dra. Renata Medina da Silva. A ambas agradeço pela dedicação ao meu mestrado e pelo grande aprendizado científico e, sobretudo, humanístico que me foi proporcionado durante este período.

Ao Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR), Laboratório de Insumos Farmacêuticos (LAIF) e ao Laboratório de Biologia Genômica pela disponibilidade e colaboração essenciais a esta pesquisa.

Aos meus pais, Fernando e Nina, pelo apoio incondicional durante toda a minha trajetória acadêmica, pela motivação constante e por nunca terem medido esforços para me auxiliar em mais esta etapa, e aos meus irmãos, Carolina e Artur, pelo companheirismo e bom humor com o qual lidam com tudo.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Microbiologia, pela troca de conhecimentos, experiências e pela amizade e oportunidades de abstração.

RESUMO

O glicerol bruto derivado da produção do biodiesel é considerado um rejeito industrial que tem despertado grande preocupação na indústria de biocombustíveis, dentre outros fatores, devido ao seu baixo valor comercial, sua reduzida assimilação após processo de purificação e aos altos custos associados ao seu descarte. Nesse contexto, a aplicação de microrganismos em processos de biodegradação ou bioconversão do glicerol bruto em moléculas de maior valor agregado tende a valorizar a cadeia produtiva do biodiesel, e a minimizar impactos ambientais associados ao seu descarte, muitas vezes feito de forma inadequada. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi investigar e identificar, em diferentes amostras ambientais, a presença de leveduras capazes de utilizar, como única fonte de carbono, o glicerol bruto, bem como investigar de maneira preliminar eventuais produtos metabólicos. Cinquenta e sete leveduras oriundas da biodiversidade local foram avaliadas e cinco delas selecionadas por apresentarem o potencial metabólico de interesse. Os isolados selecionados foram cultivados sob diferentes condições de temperatura, concentração de glicerol e oxigenação, com a finalidade de estabelecer as melhores condições para o seu crescimento. Análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e de atividade emulsificante foram realizadas com a finalidade de investigar eventuais produtos gerados a partir do consumo do glicerol bruto. Como resultados, este trabalho traz o primeiro relato do potencial de utilização de glicerol bruto por *Zygowillipsis californica*, *Pichia fermentans*, *Candida melibiosica* e por uma provável espécie nova do gênero *Candida* (*Candida* sp.) isolada durante este trabalho. Esta é também a primeira descrição desta atividade metabólica para uma espécie do gênero *Zygowillipsis*. De forma adicional, *Z. californica* e *Candida* sp. apresentaram indícios de capacidade metabólica para bioconversão do glicerol bruto em moléculas de valor industrial. Os dados levantados neste trabalho poderão contribuir para futuras estratégias que visem à valorização da cadeia produtiva do biodiesel. Palavras-chave: biodiesel, glicerol bruto, bioconversão, polióis, biosurfactantes, leveduras.

ABSTRACT

The raw glycerol derived from the biodiesel production is considered an industrial waste that has raised great concerns in the biofuels industry, mainly due to its low commercial value, its reduced assimilation after purification as well as to the high costs associated with its disposal. In this context, the use of microorganisms on biodegradation processes and bioconversion of raw glycerol to molecules with high added-values tends to enhance the biodiesel production chain, and minimize environmental impacts associated with its disposal, often done improperly. Thus, the goal of this work was to investigate and identify, in different environmental samples, the presence of yeasts capable of using raw glycerol as sole carbon source, and investigate in a preliminary manner their eventual metabolic products. Fifty-seven yeasts derived from the regional biodiversity were evaluated and five of them were selected as metabolically able for raw glycerol consumption. The selected isolates were cultured under different conditions of temperature, glycerol concentration and oxygenation in order to establish the best growing conditions. In order to investigate eventual products generated from the raw glycerol assimilation, high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses and emulsification assays were performed. As results, this work presents the first report of raw glycerol consumption by *Zygowillipsis californica*, *Pichia fermentans*, *Candida melibiosica* and by a probable new yeast species of *Candida* genus (*Candida* sp.) isolated in this work. Still, this is the first report of this metabolic feature for a species of *Zygowillipsis* genus. Moreover, *Z. californica* and *Candida* sp. presented some evidence to bear the metabolic potential to produce molecules of industrial interest from raw glycerol. These data may contribute for future strategies that aim the value increase of the biodiesel production chain.

Key words: biodiesel, raw glycerol, bioconversion, polyols, biosurfactants, yeasts.

LISTA DE ABREVIações

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

CFU – *Colony Forming Unities* (Unidades Formadoras de Colônia)

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP - *Deoxynucleoside triphosphate* (desoxinucleosídeos trifosfatados)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia de alta eficiência)

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

LAIF - Laboratório Analítico de Insumos Farmacêuticos

LOR – Laboratório de Organometálicos e Resinas

OD - *Optical density* (Densidade ótica)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia pela Polimerase)

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

rDNA – *Ribosomal DNA* (DNA ribossomal)

RID – *Refractive Index Detector* (Detector de índice de refração)

UV-VIS – *Ultraviolet and visible* (Ultravioleta e visível)

YNB-PG – *Yeast Nitrogen Base - Pure Glycerol*

YNB-RG – *Yeast Nitrogen Base - Raw Glycerol*

YPD – *Yeast extract, Peptone and Dextrose*

SUMÁRIO

Capítulo 1	9
1.1 INTRODUÇÃO	10
1.1.1 Biodiesel	10
1.1.2 Glicerol residual de biodiesel	11
1.1.3 Metabolismo microbiano de interesse	12
1.2 OBJETIVOS	20
1.2.1 Objetivo Geral	20
1.2.2 Objetivos Específicos.....	20
Capítulo 2	21
2.1 First report of biodiesel derived glycerol assimilation by <i>Zygowilliopsis californica</i> , <i>Candida melibiosica</i> and <i>Candida</i> sp.	21
Capítulo 3	51
3.1 Considerações finais.....	52
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	65

Capítulo 1

Introdução

Objetivos

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Biodiesel

A crescente busca por soluções mitigadoras das problemáticas ambientais insere os combustíveis de origem renovável em um contexto de extensa investigação científica como potenciais substitutos aos combustíveis de alta carga poluente atualmente em voga (1,2,3). Por ser biodegradável, atóxico e apresentar perfis de baixa emissão (4), caracterizado por reduzido número de particulados atmosféricos, como monóxido de carbono e hidrocarbonos (5), comparado ao diesel proveniente do petróleo, o biodiesel apresenta grande aceitabilidade.

Desta forma, desde a última década, o biodiesel tem despertado o interesse de indústrias como um promissor substituto de fontes de energia de origem fóssil. Observou-se, a partir de então, uma rápida expansão da sua capacidade de produção, não somente em países desenvolvidos como Alemanha, Itália e França, mas também em países em desenvolvimento como Argentina, Brasil, Indonésia e Malásia (6).

Neste contexto, o Brasil apresenta grande potencial de crescimento no setor, uma vez que possui várias áreas com boas condições de cultivo de plantas oleaginosas (7). Dados da *U.S. Energy Information Administration*, do ano de 2011, posicionam o Brasil como o quarto país com maior produção de biodiesel no mundo, logo atrás dos Estados Unidos, Alemanha e Argentina (8), apresentando, recentemente, o maior aumento na taxa de produção (com uma variação de 763 m³ no ano de 2005 para 2.400.000 m³ registrados em 2010) quando comparado aos Estados Unidos e à Europa (9).

Entretanto, de forma proporcional ao considerável aumento da produção de biodiesel ocorrido nos últimos anos em todo o mundo, houve também um incremento na quantidade de resíduos gerados durante o processo. O biodiesel, que é produzido a partir de uma reação de transesterificação, com alcoóis de cadeia curta, de triglicerídeos em alquil-ésteres de ácidos graxos, tem como principal subproduto o glicerol (1,2,3-propanetriol), também

conhecido por glicerina (10, 11, 12). Este glicerol, chamado de “glicerol bruto”, é considerado o principal e mais problemático resíduo químico da produção do biodiesel (13).

1.1.2 Glicerol residual de biodiesel

A molécula de glicerol puro apresenta inúmeras aplicações na indústria cosmética, farmacêutica, têxtil, de alimentos, sendo utilizada, também, como precursora na produção de vários químicos (14).

O glicerol bruto derivado do biodiesel corresponde a aproximadamente 10% do volume final da reação de transesterificação (4) e apresenta uma pureza que oscila entre 55% e 90%. Sua composição é caracterizada pela presença de glicerol (80–85%), metanol (2%), sais (5-6%), água (10%) e outras moléculas orgânicas (2%) (15). Por apresentar elevados níveis de contaminantes, o glicerol na sua forma bruta não pode ser utilizado na indústria química ou farmacêutica sem antes passar por um processo de purificação, que consiste na remoção dos seus alcoóis constituintes, determinando o seu grau de pureza de acordo com a concentração restante dos mesmos (16).

Os elevados custos desse processo de purificação tornam a aplicação do glicerol bruto na indústria química e farmacêutica muito limitada (16). Mesmo o mercado mundial do glicerol puro, de alta qualidade para aplicações industriais, consome somente 0,9 a 1 milhão de toneladas por ano de glicerol derivado de biodiesel (17). Desta forma, em função do baixo valor comercial deste produto, sua reduzida assimilação (não proporcional à sua produção) após o processo de purificação por indústrias de outros setores e aos altos custos associados ao seu descarte, a indústria do biodiesel é afetada de forma negativa (18).

Uma situação ainda mais difícil ocorre com relação às plantas de produção ativas em propriedades rurais de pequeno e médio porte, crescentes em número, uma vez que a produção do biodiesel se mostra como uma fonte alternativa de renda consideravelmente promissora, não apenas no contexto industrial, mas também no doméstico (6). O preço do glicerol bruto tem decrescido continuamente (19) e produtores de biodiesel têm pouco

incentivo para realizar o processo de purificação do subproduto gerado durante a produção de biodiesel. Esses fatores, aliados à recente queda de preço do glicerol refinado (20), tornam o processo de purificação uma atividade economicamente inviável para pequenos e médios produtores.

Desse modo, o glicerol gerado nas pequenas e médias propriedades, em função de não apresentar valor comercial na sua forma bruta, é comumente lançado no ambiente, apresentando um alto potencial de dano aos ecossistemas impactados (7). Tais fatos se mostram como um desafio ambiental e econômico significativo para a cadeia de produção do biodiesel (21).

Nesse contexto, a indústria tende a buscar aplicações alternativas para o glicerol bruto gerado (22), seja em processos onde ele pode simplesmente ser degradado, ou empregado como matéria-prima para a produção de moléculas de maior valor agregado (23). Em relação a isso, uma estratégia que se mostra bastante interessante em termos industriais é a bioconversão do glicerol bruto. Este processo se mostra economicamente viável, apresentando uma boa capacidade de produzir uma grande variedade de produtos químicos menos impactantes em termos ambientais (24). Estes fatos ressaltam a importância de investigações a cerca da aplicação de microrganismos na bioconversão do glicerol proveniente da produção de biodiesel (10, 25, 26).

1.1.3 Metabolismo microbiano de interesse

O glicerol puro é uma molécula abundante e de composição simples, podendo ser absorvida pela célula microbiana através de difusão facilitada. Alguns microrganismos são descritos pela literatura como capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono, podendo convertê-lo a diferentes intermediários metabólicos (21). Desta forma, a possibilidade de utilização do glicerol bruto como fonte de carbono por alguns microrganismos mostra-se como promissora para a elaboração de estratégias que visem à eliminação deste resíduo industrial (7).

Este cenário abre espaço para a implementação de biorrefinarias que convertam o fluxo de subprodutos ou rejeitos gerados durante a produção de biodiesel em produtos de maior valor, sendo considerada uma alternativa para ampliar a viabilidade econômica da indústria deste biocombustível (27, 28, 9, 29), além de minimizar impactos ambientais associados ao descarte inadequado de rejeitos oriundos do processo.

Devido à sua ampla diversidade metabólica, aos baixos custos relativos ao seu isolamento a partir de amostras ambientais, aos métodos de cultivo simples, ao baixo risco biológico para manipuladores (9, 30) e à sua estabilidade genética, a investigação de leveduras ambientais com aplicação em processos de degradação ou bioconversão de moléculas de interesse mostra-se muito promissora.

Desta forma, leveduras de ocorrência ambiental que naturalmente apresentem o potencial metabólico de degradar o glicerol ou convertê-lo em produtos de maior valor agregado podem se mostrar como interessantes alternativas tanto para a minimização do passivo ambiental associado a este processo como para a valorização da cadeia produtora de biodiesel.

A diversidade de microrganismos procarióticos e eucarióticos ainda é muito pouco conhecida, em especial quando se tratam de microrganismos existentes em ambientes naturais, tais como sedimento marinho e de corpos d'água doce, superfície e cisterna de algumas plantas, solo e alguns tipos de alimentos *in natura*. Desta forma, tipos metabólicos desconhecidos são abundantes no contexto microbiano (31) e podem apresentar aplicabilidade biotecnológica com o objetivo de biorremediação e bioconversão de moléculas de interesse.

O glicerol bruto, após o processo de purificação, pode ser convertido a uma série de moléculas de interesse industrial, como 1,3-propanediol, ácido succínico, lipídios e etanol (32, 33) por uma grande variedade de bactérias. Entretanto, os dados reportados na literatura a cerca do mesmo potencial de conversão por microrganismos eucariontes mostram-se mais escassos.

O glicerol desempenha um importante papel durante a osmoregulação em leveduras (34), sendo um dos principais solutos produzidos ou armazenados em resposta a situações de estresse osmótico (14). Até o momento, existem duas vias bem estabelecidas para a utilização de glicerol em leveduras (Figura 1): a via fosforilativa (via da glicerol-3-fosfato) e a via oxidativa (via da dihidroxiacetona) (14).

Apesar de algumas leveduras utilizarem estas duas vias metabólicas de assimilação de glicerol, como o verificado para *Saccharomyces cerevisiae*, outras espécies utilizam apenas uma, como o reportado para *Yarrowia lipolytica*, cuja única via de assimilação de glicerol utilizada é a via fosforilativa (35, 36, 37). A utilização do glicerol por esta via tem sido reportada também para outras espécies de leveduras como *Candida utilis* (38), *Debaryomyces hansenii* (39), *Zygosaccharomyces rouxii* (40), *Candida glycerinogenes* (41) e *Schizosaccharomyces pombe* (38, 42).

Em *S. cerevisiae*, cujo metabolismo de glicerol é bem conhecido, esta via é caracterizada inicialmente por uma etapa de fosforilação catalisada por uma glicerol quinase, codificada pelo gene GUT1 (43, 44), que converte o glicerol em glicerol-3-fosfato. Esta etapa é seguida de uma oxidação do glicerol-3-fosfato a uma dihidroxiacetona fosfato através da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (Gut2p) dependente de flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), codificada pelo gene GUT2 e localizada na mitocôndria (45).

A dihidroxiacetona fosfato, por sua vez, pode ser convertida à gliceraldeído-3-fosfato através de uma triose-fosfato-isomerase no centro da via metabólica (14), ou servir de substrato para a síntese de outros metabólitos (46). Vários autores relatam que leveduras com ausência ou comprometimento dos genes GUT1 ou GUT2 são incapazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono (43, 44, 45).

A via oxidativa de degradação de glicerol é composta por uma glicerol desidrogenase (GD), que cataliza o primeiro passo oxidativo da via, no qual o glicerol é transformado em dihidroxiacetona, seguido por um passo de fosforilação catalisada por uma segunda dihidroxiacetona quinase (DK) específica, resultando na dihidroxiacetona fosfato (14). Em *S.*

cerevisiae, os genes GCY1 e DAK1 ou DAK2 codificam os dois passos da via, respectivamente (47).

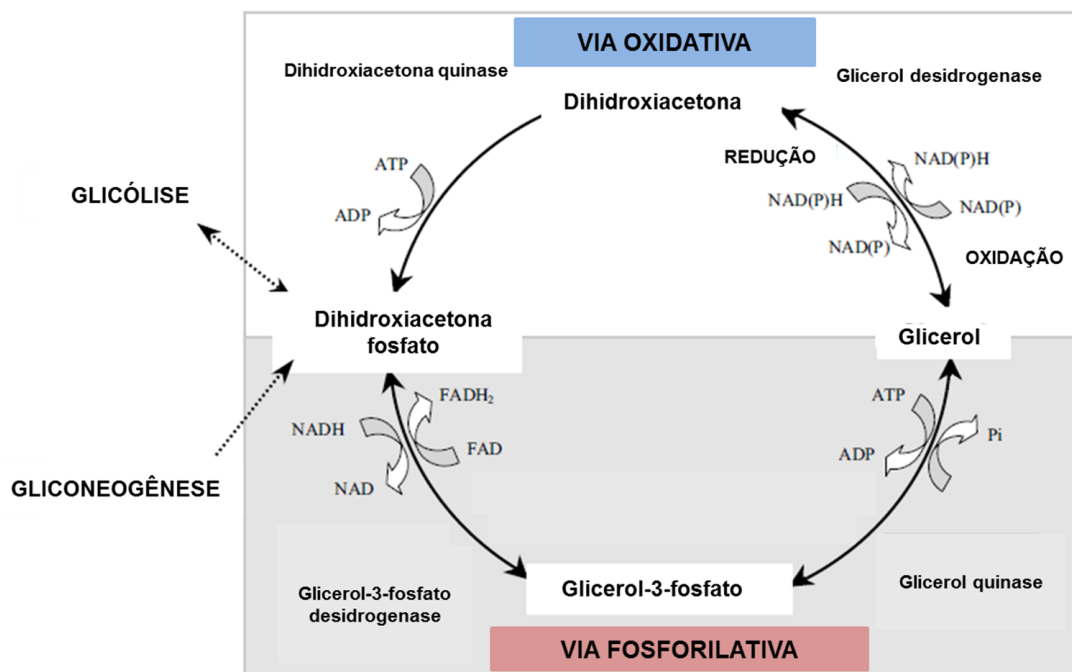


Figura 1. Visão simplificada das vias metabólicas de utilização do glicerol em *S. cerevisiae*. Modificado a partir de Silva-Graça, M. 2004 (48).

O aproveitamento do glicerol puro por microrganismos tem sido amplamente estudado, entretanto, existem poucos dados na literatura a cerca de microrganismos capazes de converter o glicerol bruto derivado do biodiesel (16). Além disso, a maioria destes estudos utilizam outras fontes de carbono associadas ao glicerol residual de biodiesel, fator que pode encarecer o processo, se comparado à utilização exclusiva de glicerol bruto como substrato de carbono. Devido ao alto teor de sais e solventes orgânicos presentes no glicerol bruto (15), microrganismos capazes de consumir o glicerol e tolerar esses componentes inibitórios são, atualmente, alvos de investigações.

Dentre os produtos gerados por leveduras a partir da conversão do glicerol bruto associado a outras fontes de carbono, a literatura destaca a produção de polióis como

arabitol (49), eritritol (50), manitol (51), além de ácido cítrico (52), ácido succínico (53), etanol (15), e alguns surfactantes (54).

Polióis, também conhecidos por álcoois de açúcar, são hidratos de carbono com um grupo carbonil (aldeído ou cetona) reduzido a um grupo hidroxila correspondente. O xilitol, sorbitol, arabitol, manitol, eritritol, lactitol e maltitol são alguns exemplos de álcoois de açúcares disponíveis comercialmente (55).

A produção industrial de álcoois de açúcar tem sido feita principalmente através de meios químicos, que incluem processos de hidrogenação de açúcar com a adição de catalisadores químicos submetidos a altas pressões e temperaturas (56). Estes processos necessitam de substratos puros e elaboradas etapas de purificação cromatográfica, o que tem impulsionado um crescente interesse no desenvolvimento de processos bioquímicos microbianos (9).

Dentre os polióis mencionados, o manitol é uma molécula amplamente utilizada na indústria de alimentos e preparações farmacêuticas. É naturalmente encontrado em pequenas quantidades em vegetais e frutas, apresenta baixa reatividade química, alta higroscopia e sabor adocicado, embora possua baixo valor calórico. Sua obtenção industrial dá-se a partir da alta pressão da hidrogenação catalítica da mistura de frutose e glicose (57).

Leveduras como *Torulopsis mannifaciens* CBS 5981 e *T. versatilis* CBS 1752 (58) e a cepa NCIM 3470 da levedura osmofílica *Candida magnoliae*, são alguns exemplos de microrganismos envolvidos na produção de manitol a partir de glicerol. As células de *C. magnoliae* NCIM 3470, quando imobilizadas são capazes de, em condições aeróbias, sem necessidade de adição de qualquer outra fonte de carbono além do glicerol residual de biodiesel, converter esta molécula a manitol. Além disso, este processo de bioconversão mostrou a vantagem de não produzir outros metabólitos detectáveis por parte dos detectores de ultravioleta e visível (UV-VIS) ou de índice de refração (IR) em análises de cromatografia líquida de alta performance por exclusão de íons, resultando em uma solução aquosa limpa, a partir da qual a recuperação da molécula é relativamente fácil (51).

O arabitol é um álcool de açúcar que apresenta muitas das características do xilitol, podendo ser utilizado em muitas das aplicações conhecidas para o mesmo, dentre elas o uso como adoçantes naturais não cariogênicos e substitutos de açúcar para pacientes diabéticos (49). Habe e colaboradores (59) reportam o potencial metabólico de conversão do glicerol bruto, por *Candida parapsilosis*, a D-arabitol, uma das moléculas que podem ser utilizadas como molécula precursora na produção de D-xilulose, por meio de microrganismos (60). Tendo em vista que a síntese de cetoses raras como a D-xilulose é importante por ser precursora de oligossacarídeos sintéticos e glicosídeos (61), a busca por microrganismos capazes de produzir arabitol torna-se um interessante foco de investigações. O arabitol pode ser produzido também por outros gêneros de leveduras osmofílicas como *Debaryomyces* (49, 59), *Geotrichium* e *Metschnikowia* a partir do glicerol, ou em resposta ao estresse osmótico a partir do glicerol bruto (49, 62).

Outro poliól produzido por leveduras a partir do glicerol bruto, o eritritol, é um adoçante biológico com aplicações na indústria de alimentos e farmacêutica. Sua produção se dá em larga escala por processos fermentativos, nos quais glicose, sacarose e dextrose são obtidas a partir de trigo e amido de milho (principais fontes de carbono) através de hidrólise química e enzimática (63, 64). Uma redução de custos na produção do eritritol pode ser obtida através da utilização de substratos mais baratos, como o glicerol bruto, fonte de carbono a partir da qual Rymowicz e colaboradores (2009) reportaram um bom crescimento de diferentes cepas da levedura *Y. lipolytica*, com concomitante alta eficiência de bioconversão a esta molécula de interesse (50).

A espécie *Y. lipolytica* tem despertado muita atenção da comunidade científica, nos últimos anos, uma vez que é capaz de metabolizar uma grande variedade de subprodutos industriais e agro-industriais sendo capaz, a partir dessa metabolização, de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos e biossurfactantes (65). A cepa LGAM S(7)1 de *Y. lipolytica* (52), apresenta a habilidade de degradar de modo eficiente substratos hidrofóbicos (66) por apresentar uma superfície celular altamente hidrofóbica (65). Essa interação entre

as células e as superfícies hidrofóbicas é mediada por proteínas ou glicoproteínas da parede celular (65) da levedura.

Y. lipolytica também utiliza glicerol bruto como substrato para a produção de ácido cítrico (52), apresentando interessantes níveis de produção desta molécula, podendo, desta forma, ser utilizada na indústria para esta finalidade (67). O ácido cítrico é um dos ácidos orgânicos mais importantes produzidos por fermentação microbiana da atualidade (68), com uma produção global de 1.4 milhões de toneladas no ano de 2008 e com crescimento anual de 3,5-4.0% em demanda e consumo (69). Este ácido é largamente utilizado para conferir sabor agradável a alimentos e bebidas. Sua aplicação, no entanto, não se restringe apenas à indústria de alimentos, mas também na indústria cosmética e farmacêutica (68).

Em estudos recentes, uma cepa recombinante *Y. lipolytica*, construída a partir da deleção da succinato desidrogenase (subunidade que induz acúmulo de ácido succínico não somente em *Y. lipolytica*, mas também em *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*) (53, 70, 71), foi capaz de produzir ácido succínico quando cultivada em glicerol sob condições de baixo pH (53). O ácido succínico é um ácido dicarboxílico que pode ser facilmente convertido a uma ampla variedade de produtos que incluem plásticos biodegradáveis e os chamados “solventes verdes” (72, 73).

Nesta mesma perspectiva de bioconversão, outra potencial aplicação do glicerol bruto é sua utilização como substrato para a produção de surfactantes por microrganismos leveduriformes. Dados da literatura reportam a utilização de glicerol, tanto a sua forma bruta, como a purificada, por diferentes gêneros e espécies de leveduras com produção de diferentes biossurfactantes (54). Ashby e colaboradores (2005) relataram o potencial de produção de biossurfactante do tipo soforolípido (biossurfactantes glicolipídicos) a partir de glicerol pela levedura *Candida bombicola* (74). O mesmo potencial foi observado em *Candida batistae* com a produção de diferentes tipos de soforolípídios (75) e na cepa JCM 10317 de *Pseudozyma antarctica* com a produção de biossurfactante manosileritritol lipídio (54).

A grande demanda por surfactantes é coberta, atualmente, por aqueles de origem química, usualmente tóxicos ao ambiente e não biodegradáveis (76). Os surfactantes de origem biológica, no entanto, apresentam muitas vantagens sobre os de origem química, como propriedades de superfície ativa (77), baixa toxicidade, alta especificidade, condições de biodegradabilidade, características que tornam suas aplicações industriais e ambientais promissoras (78). Apesar disso, biossurfactantes só substituirão os surfactantes de origem química se o custo das matérias primas e do processo for competitivo (16). Nesse contexto, a utilização de glicerol bruto, material de baixo valor comercial, como substrato para a produção de surfactantes por microrganismos é uma interessante alternativa para ampliar a sua utilização no mercado.

Grande parcela dos dados existentes sobre degradação ou biotransformação de glicerol residual de biodiesel é obtida através da análise de cepas de microrganismos com metabolismos amplamente conhecidos ou cepas recombinantes (9). No entanto, uma vez que é muito pequena a parcela de microrganismos descritos na literatura em face do que se presume existir em termos de biodiversidade, é possível inferir o grande potencial de tipos metabólicos microbianos ainda desconhecidos que podem apresentar um grande valor de aplicabilidade industrial e ambiental (79).

Dessa maneira, análises e seleções criteriosas a partir da diversidade de microrganismos mostram-se como estratégias de investigação de grande relevância científica e tecnológica. Neste contexto, a presente pesquisa buscou investigar cinco espécies de leveduras oriundas da biodiversidade brasileira, ainda tão pouco conhecida (79, 80), a respeito do seu potencial metabólico de degradação do glicerol bruto derivado do biodiesel.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar e identificar, em diferentes tipos de amostras ambientais ricas em microrganismos, a presença de leveduras capazes de utilizar, como única fonte de carbono, o glicerol bruto derivado da produção de biodiesel, bem como investigar preliminarmente os produtos oriundos deste metabolismo.

1.2.2 Objetivos Específicos

1.2.2.1 Isolar leveduras a partir de diferentes amostras ambientais, tais como: água oriunda de cisternas de bromélias e gravatás, sedimento marinho, lodo ativado, mel de abelhas, alimentos com prazo de validade vencido;

1.2.2.2 Selecionar, a partir dos isolados obtidos, leveduras que apresentem o potencial metabólico de consumir o glicerol bruto derivado da produção de biodiesel;

1.2.2.3 Identificar em nível de gênero ou espécie os isolados de leveduras selecionados;

1.2.2.4 Analisar o efeito da adição de diferentes concentrações iniciais de glicerol bruto sobre o crescimento populacional das leveduras investigadas;

1.2.2.5 Caracterizar de forma preliminar os produtos gerados a partir da bioconversão do glicerol bruto pelas leveduras investigadas.

Capítulo 2

**First report of biodiesel derived glycerol assimilation by *Zygowilliopsis californica*,
Candida melibiosica and *Candida* sp.**

Artigo científico submetido ao periódico científico *FEMS Yeast Research*

Fator de impacto: 2.462

Guia para autores: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1567-1364/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1567-1364/homepage/ForAuthors.html)

Manuscript submitted - FEMSYR-14-07-0116

onbehalfof+femsyr+fems-microbiology.org@manuscriptcentral.com em nome de
femsyr@fems-microbiology.org

Enviado: quinta-feira, 10 de julho de 2014 18:00

Para: baptstane@yahoo.com.br; Sílvia Dias de Oliveira; guilherme.coelho@puccs.br;
leonardomoreiradosantos@yahoo.com.br; Jeane Estela de Lima Dullius; Renata Medina da Silva

10-Jul-2014

Dear Dr. Renata da Silva,

Thank you for submitting the manuscript First report of biodiesel derived glycerol assimilation by *Zygowilliopsis californica*, *Candida melibiosica* and *Candida* sp., by Baptista-Silva, Anelise; Dias da Oliveira, Sílvia; Peres Coelho, Guilherme; Moreira dos Santos, Leonardo; Dullius, Jeane; da Silva, Renata, to our journal. The manuscript has now been uploaded to Manuscript Central.

As the submitting author, you will receive future communications via e-mail. Your manuscript number is FEMSYR-14-07-0116.

Please save the word processing and graphics files from your manuscript. You may need them later again for production purposes if your manuscript is accepted.

You can keep track of your manuscript by logging on periodically to our site (<http://mc.manuscriptcentral.com/femsyr>), where the status will be displayed in your Submitting Author Center.

Again, thank you for the submission of your manuscript.

Best wishes

Dr. Frédérique Belliard
FEMS Editorial Administrator

On behalf of Chief Editor,
Dr Jens Nielsen
FEMS Yeast Research

Note: It is the responsibility of the corresponding author (or submitting author if different) that all authors of this submitted manuscript are informed about its submission and its subsequent progress.

**First report of biodiesel derived glycerol assimilation by *Zygowilliopsis californica*,
Candida melibiosica and *Candida* sp.**

Running title: Assimilation of raw glycerol by different yeast species

Anelise Baptista-Silva¹, Sílvia Dias de Oliveira¹, Guilherme P. Coelho¹, Leonardo Moreira dos Santos², Jeane E. Dullius², Renata Medina-Silva^{1*}

¹Laboratório de Imunologia e Microbiologia, ²Laboratório de Organometálicos e Resinas, PUCRS, Brazil.

Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
Av. Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author: Renata Medina da Silva

Phone: +55-51-33534952 – Fax: +55-51-3320.3568

e-mail: renata.medina@pucrs.br

ABSTRACT

The raw glycerol derived from biodiesel is characterized as an industrial waste molecule that has presented a significant annual increase in production and demand for disposal worldwide, making it a risk to the environment. Thus, investments in scientific research focused on the characterization of microbial metabolisms from local biodiversity with the ability to assimilate this molecule or convert it into high value-added products, such as polyols or surfactants, display a fundamental importance in the current scientific and industrial context. Five yeast species isolated from environmental samples (including a candidate new species of *Candida*) were investigated for their metabolic potential of utilization of raw glycerol derived from biodiesel. The results revealed that the five investigated species showed the ability to efficiently grow with raw glycerol as sole carbon source. Still, this is the first report of this metabolic feature for *Zygowilliopsis* genus. Since there are no reports in the literature on the use of raw glycerol by *C. melibiosica*, *Z. californica* and *Candida* sp., the group of data presented here contributes substantially to the knowledge about microbial diversity and serves as a guide for future investigations about the potential applicability of these yeast species for bioconversion of a residual waste of great environmental impact.

Key words: raw glycerol, bioconversion, yeast, biosurfactant, polyols

INTRODUCTION

The growing environmental concerns over the use and depletion of non-renewable fuel sources, as well as their costs and sustained availability, introduces the renewable fuels in the context of extensive scientific research as potential substitutes for the high pollutant fuels that are currently in vogue (Hirsch *et al.*, 2012; Kerr, 2007). In this context, biodiesel is presented as an interesting biofuel, since it is biodegradable, nontoxic, and presents low emission profiles (Meher *et al.*, 2006) with reduced number of atmospheric particles such as carbon monoxide and hydrocarbons (Dermibas & Balat, 2006), compared to petroleum derived diesel. Thus, it has attracted the interest of industry as a promising substitute for the energy sources of fossil origin, which promoted a rapid expansion of its production capacity in different countries in recent years (Carriquiry, 2007).

Brazil has a great potential for biodiesel production increases, since it has large rural areas with good growing conditions of oleaginous plants (Silva *et al.*, 2009). More recent data from *U.S. Energy Information Administration* has positioned Brazil as the fourth country in biodiesel production worldwide in 2011, behind United States, Germany and Argentina, showing the largest recent increase in production rate when compared to the United States and Europe (Almeida *et al.*, 2012). However, proportionally to the considerable increase in biodiesel production worldwide, there has also been an increase in the amount of waste generated during the process (Yazdani & Gonzales, 2007; Khanal *et al.*, 2008; Rausch & Belyea, 2006).

Biodiesel, which is produced from a transesterification reaction of short chain triglycerides in alkyl fatty acid esters, has glycerol (1,2,3-propanetriol) as main by-product (Solomon *et al.*, 1995; Barbirato *et al.*, 1997b; Collin *et al.*, 2001). Considering the largest and most problematic chemical waste from biodiesel production, this “raw glycerol” corresponds to approximately 10% of the final volume of the transesterification reaction (Meher *et al.*, 2006).

The pure glycerol molecule presents numerous applications in the cosmetic, pharmaceutical, textile, and food industries, being also used as a precursor in the production of various chemicals (Wang *et al.*, 2001). Nevertheless, due to the high levels of contaminants and high costs for purification, the raw glycerol derived from biodiesel cannot be used in the chemical or pharmaceutical industry (Amaral *et al.*, 2009). Furthermore, the world demand for pure glycerol consumes only 0.9 to 1 million tons per year of biodiesel residual glycerol (Hoogendoorn *et al.*, 2007). Thus, due to the intrinsic low commercial value of the raw glycerol, its reduced industrial assimilation after the purification process and the high costs associated with its disposal, the biodiesel industry is negatively affected (Yazdani & Gonzales, 2007).

An even more difficult condition occurs in small and medium size farms of biodiesel production plants, which are growing in number with biodiesel production as an alternative income source (Carriquiry, 2007). The commercial value of raw glycerol has continuously decreased (Dasari, 2007) and biodiesel producers have little incentive to carry out the process of purifying this by-product. These facts, coupled with the recent drop in the price of refined glycerol (Min *et al.*, 2011), have led to the direct release of raw glycerol in the environment by these producers. This reality presents a significant potential to damage the impacted ecosystems (Silva *et al.*, 2009), which represents an economic and environmental challenge for the biodiesel production chain (Dobson *et al.*, 2012). In this context, new applications for raw glycerol are currently of great importance (Juszczak *et al.*, 2013), since the need for converting alternative, cheaper and waste carbon sources is increasing (Workman *et al.*, 2013).

Biorefineries that convert the flow of by-products or wastes generated during the production of biodiesel in high value products are considered an alternative to enlarge the economic viability of the biofuel industry (Almeida *et al.*, 2012; Kamm & Kamm, 2007; Dharmadi *et al.*, 2006; Clomburg & Gonzales, 2013), minimizing negative environmental impacts. To achieve this, a promising strategy that has emerged is the bioconversion of the

raw glycerol, which tends to be economically feasible and potentially efficient to produce a variety of chemicals of industrial interest (Dharmadi *et al.*, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2014) or molecules that may induce less injury to the impacted ecosystems compared to raw glycerol (Silva *et al.*, 2009; Koutinas *et al.*, 2007). The application of raw glycerol as a substrate in cultivation of microorganisms is one alternative to minimize these problems (Swinnen *et al.*, 2013). Nevertheless, to attend these objectives is important to obtain and investigate microbial strains that efficiently tolerate and metabolize this non-purified glycerol (Duarte *et al.*, 2013a). The use of pure glycerol by microorganisms has been extensively studied, however, there are few data in the literature about microorganisms able to consume the raw glycerol derived from biodiesel (Amaral *et al.*, 2009). Thus, the search for microorganisms capable of degrading or converting raw glycerol has emerged as an attractive idea (Pagliaro *et al.*, 2007).

Large portion of existing data about bioconversion of biodiesel residual glycerol are obtained through analysis of widely known microbial strains or recombinant strains (Almeida *et al.*, 2012) for glycerol bioconversion processes (Mu *et al.*, 2008; Rymowicz *et al.*, 2010; Gungormusler *et al.*, 2011; Ashby *et al.*, 2011), which is of great relevance taking into consideration the necessity of developing biotechnologies able to efficiently cope with the by-products of biodiesel production (Yazdane & Gonzales, 2007; Dobson *et al.*, 2012). The use of recombinant strains, however, has some disadvantages regarding the use of strains that naturally exhibit the metabolism of interest, since the methodologies employed in the construction of genetically modified organisms are more complex (Steensels *et al.*, 2014) and their use are regulated by specific legislation (D. Glass Associates Inc, 2012). Furthermore, bureaucracies referents to regulatory controls of GMOs can increase the costs associated with the processes in which they are used (Bell & Attfield, 2009).

On the other hand, the microbiomes in nature are composed by many still unknown metabolic varieties (Xu, 2006). In this context, bacteria and yeasts, due their species diversity, adaptive plasticity, and metabolic versatility represent interesting taxonomic groups

from the biotechnology point of view. These characteristics allow their biotechnological employment for various biodegradation processes (Maciel *et al.*, 2007; Milic *et al.*, 2009; Franciscon *et al.*, 2009, Duarte *et al.*, 2013a) and bioconversion of molecules of interest (Juszczuk *et al.* 2013, Yang *et al.*, 2014, Souza *et al.*, 2014). Regarding specifically yeast species, according to Duarte and colleagues (2013a) these fungi represent an important part of natural ecosystems, and may be promising sources for a number of compounds production and metabolisms capable of biodegrade compounds of interest. Due to its large metabolic diversity, genetic stability, low biological risk to handlers as well as the relative low costs associated to its isolation and cultivation (Walmsley & Keenan, 2000; Almeida *et al.*, 2012; Steensels *et al.*, 2014), the investigation of yeast isolates for use in biodegradation and bioconversion processes appears to be very promising.

In this context, the existence of a great unexplored diversity of wild yeasts consists in a rich source for research on strains with industrial potential (Steensels *et al.*, 2014). Some yeast species that naturally exhibit the potential for assimilation of glycerol were already described: *Candida azyma* (Yoshikawa *et al.*, 2014), *Yarrowia lipolytica* (Juszczuk *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014), *Pachysolen tannophilus* (Liu *et al.*, 2012), *Trichosporon moniliforme*, *Meyerozyma guillhermondii* (Duarte *et al.*, 2013a), *Lindnera satumus*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus curvatus* (Souza *et al.*, 2014) and *Pichia pastoris* (Santos *et al.*, 2012). Moreover, some yeast strains are described as metabolically able to produce interesting molecules from raw glycerol assimilation. Among the molecules produced by yeasts from the conversion of raw glycerol coupled to other carbon sources, literature emphasizes the production of polyols (sugar alcohols), such as arabitol (Koganti *et al.*, 2011), erythritol (Rymowicz & Rywinska, 2009), mannitol (Khan *et al.*, 2009), as well as ethanol (Choi *et al.*, 2011) and other organic compounds such citric acid (Papanikolaou *et al.*, 2002), succinic acid (Yuzbahev *et al.*, 2010) and some surfactants (Morita *et al.*, 2007). Raw glycerol can also be used as substrate to produce other biofuels as ethanol (Choi *et al.*, 2011) and biodiesel (Makri *et al.*, 2010) and employed in bioremediation processes (Santos

et al., 2012). Besides that, according to Swinnen and colleagues (2013), virtually all previous studies concerning yeast growth in glycerol have been performed in the presence of nutritional supplements (like peptone and yeast extract), which deliberately or non-deliberately supported the microbial cultivation.

In this context, the present study aimed to characterize five yeast species and measure their growth in media containing different concentrations of raw glycerol as sole carbon source without supplements addition as a starting point for future investigations about their potential for biotechnological applicability regarding biodegradation and bioconversion processes.

METHODS

Source of biodiesel derived glycerol

The glycerol used in this study arises from the production of biodiesel prepared in a bench scale, via a transesterification reaction using waste cooking oil as the lipid source and ethanol and (9:1) and KOH as catalysts.

Yeast isolation and screening

Fifty-seven yeasts were isolated from different environmental samples (water from plant watertanks, expired grape juice, sea sediment and activated sludge) between 2009 and 2011. The samples were cultivated in 5 mL YPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) with 0.5% chloramphenicol, and incubated at 30°C. After growth, one aliquot from each tube was streaked on YPD agar (YPD with 2% agar). The plates were incubated at 30°C until yeast colonies developed. The isolates were analyzed under optic microscopy (1000x) after cristal violet coloration. Different yeast morphotypes were cultured by restreaking on YPD agar and further stored in YPD broth with 30% glycerol at -20°C for later identification.

For yeast metabolic selection, samples were spread on “YNB-raw glycerol” (YNB-RG) agar (6.7 g/L Himedia yeast nitrogen base; 20 g/L raw glycerol) at two consecutive cultures

for depletion of energy reserves. Isolates that were able to grow in YNB-RG agar after the second sowing were then grown in YNB with pure glycerol (YNB-PG) at 2% as control medium.

Polymerase Chain Reaction (PCR) and DNA sequence analysis

Yeast DNA was extracted according to Rademaker & de Bruijn (1997) and the divergent D1/D2 domains of the LSU (26S) rDNA (Kurtzman & Robnett, 1998; Fell *et al.*, 2000) were amplified with primers NL1 and NL4 (O'Donnel, 1993). PCR was performed using 100 ng of target DNA, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 2.5 μ L of 10X PCR buffer (Invitrogen), 1.0 mM MgCl₂, 0.2 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 20 μ M of each primer in a total volume of 25 μ L. Conditions for amplification of this sequence consisted of 3 min initial denaturation at 94°C, 33 cycles of 95°C for 1 min, 52°C for 30 s, and 72°C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 6 min (Ramos *et al.*, 2005). The PCR products were concentrated, purified and sequenced in a MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare) at the Laboratory of Genomic and Molecular Biology - PUCRS, Porto Alegre, Brazil. The sequences were analyzed using the software MEGA 5.0 and comparisons were performed using the basic local alignment search tool (BLAST) and GenBank database within the National Center for Biotechnology Information (NCBI) for taxonomic identification of selected isolates.

Growth efficiency analysis of yeast isolates with raw glycerol as the sole carbon source

The selected yeast isolates were cultured in 50 mL YNB-RG broth with different concentrations of raw glycerol (5%, 10% and 15%) for analysis of their growth efficiency using it as sole carbon source without addition of any nutritional supplement. Independently, these cultures were performed under aerobic and anaerobic conditions (anaerobic condition provided by the addition of mineral oil on the culture surface) and at different temperatures

(20°C and 30°C for the tests under aerobic and anaerobic conditions), totaling 12 different cultures performed and analyzed for each selected isolate. Aliquots of these cultures were taken immediately after inoculation of the strains and subsequently at intervals of 12, 24, 48, 72 and 96 hours to determine the biomass increase by optical density (600 nm) and cultivation on YPD agar for viable colony count and colony forming units (CFU ml⁻¹) estimation. Thus, growth curves were obtained for each isolate in order to compare them for their efficiency of growth in raw glycerol. All the isolates were analyzed for their growth in YNB supplemented with 2% glucose (as sole carbon source), at 30°C, under aerobic conditions for comparative purposes. The experiments were performed in duplicate.

Analysis and comparison of different culture conditions

Data from cell concentration (measured by and CFU ml⁻¹) were plotted on graphs, correlating to the cultivation time, in order to trace their growth curves. For purposes of comparison of the growth curves and establishment of optimal conditions for each isolate, the following parameters were analyzed: 1 - length of time of the lag phase; 2 - slope angle of the curve during the exponential phase; 3 – cellular concentration in the initial point of stationary phase. For each isolate, the best growing conditions were those that resulted in a growth curve with the following features: 1 - the shorter lag phase; 2 - the speediest exponential phase; 3 - the highest cell concentration initiating the stationary phase. Additionally, each growth curve was subjected to statistical analysis using the paired samples t-test in order to confirm the significant growth of each isolate under the tested conditions.

RESULTS

Yeast screening and identification

From the fifty seven initial yeast isolates screened in this study, only those that showed the ability to use both pure and raw glycerol as sole carbon source were selected, which ensured the investigation of yeast strains with the metabolic capacity to use this carbon source and also tolerate the inhibitory components of this industrial waste. Among them, only five yeast isolates showed both desired phenotypic features.

The results of taxonomic identification indicated that the five selected isolates were classified as *Pichia fermentans* (isolated from samples of expired grape juice), *Candida melibiosica* (coming from *Eryngium horridum* watertanks), as well as *Candida oleophila*, *Zygowilliopsis californica* and a *Candida* sp. - under analysis as a potential new species - isolated from watertanks of different species of bromeliads of *Vriesea* genus. The isolate “*Candida* sp.” was considered as a candidate new species since it presented a similarity index of only 87% (relative to the sequenced DNA fragment) with the closest yeast species in GeneBank database, which belongs to the genus *Candida* (*Candida danielliae* strain CBS 8533, HM156539.1) (Table 1).

Growth with raw glycerol as sole carbon source

In order to verify the assimilative capacity of biodiesel derived glycerol by the selected yeast isolates their growth efficiency was evaluated in different conditions of temperature, oxygenation and glycerol concentration. Among all tested conditions the raw glycerol concentration of 5% under aerobic conditions was the most favorable to cell growth for the five investigated yeast species.

The species *Z. californica* cultivated in 5% YNB-RG at 20°C showed a 48 hours exponential phase reaching 6×10^7 CFU ml⁻¹. When grown at 30°C, the exponential phase had the same length time, but with achieving a lower cell density (4.13×10^7 CFU ml⁻¹). The

cultivation control (YNB glucose 2%) showed a 24 hours exponential phase reaching 3.17×10^6 CFU ml⁻¹. Fig.1(a).

For *C. melibiosica* cultivated in 5% YNB-RG at 20°C it was observed a 12 hours lag phase and a 36 hours exponential phase, reaching 3.33×10^7 CFU ml⁻¹. The growth at 30°C showed a 48 hours exponential phase with maximum cell density of 3.30×10^7 CFU ml⁻¹. The length of the exponential phase was similar to that observed for the control culture with glucose at this temperature, but the cell density at the end of this phase was higher compared to the observed for this control (1.73×10^7 CFU ml⁻¹). Fig.1(b).

Regarding *Candida* sp., the cultures in 5% YNB-RG at 20°C reached cell density of 3.5×10^7 CFU ml⁻¹ at the end of a 48 hours exponential phase. Those performed at 30°C showed a 12 hours lag phase and a 48 hours exponential phase, reaching 1.97×10^7 CFU ml⁻¹. The glucose control culture showed a slightly lower cell density (1.17×10^7 CFU ml⁻¹) at the end of a 24 hours exponential phase under this temperature. Fig.1(c).

The isolate identified as *P. fermentans*, when cultivated in 5% YNB-RG at 20°C, showed a 12 hours lag phase and a cell density of 8×10^6 CFU ml⁻¹ at the end of a 12 hours exponential phase. The cultivation at 30°C also showed a 12 hours lag phase, but the exponential phase lasted 60 hours reaching 3.07×10^7 CFU ml⁻¹. The control culture showed a 48 hours exponential phase and a final cell density of 2.93×10^7 CFU ml⁻¹ at 30°C. Fig.1(d).

With regard to the *C. oleophila*, cultures in 5% YNB-RG at 20°C showed a 24 hours exponential phase with cell density of 1.40×10^7 CFU ml⁻¹. When these cultures were performed at 30°C they showed a more extended exponential phase (48 hours) and reached a higher cell density (2.6×10^7 CFU ml⁻¹). The control culture showed a 12 hours lag phase and also a 12 hours exponential phase, arriving at a cell density of 2.9×10^7 CFU ml⁻¹. Fig.1(e).

Moreover, in YNB-RG cultures with glycerol at 10 and 15% cell growth was observed only for *Z. californica* (10 and 15%) and *P. fermentans* (15%). However at 15% the maximum cell concentration achieved was low (3.3×10^4 CFU ml⁻¹ for *Z. californica* and 5.31×10^3 CFU

ml⁻¹ for *P. fermentans*) and began to decline immediately after 9 hours of cultivation for both species (data not shown). On the other hand, at 10% of raw glycerol *Z. californica* presented a different behavior, with an initial decrease in cell concentration during the first 24 hours, followed by a slight increase that reached its maximum cell density ($9,85 \times 10^4$ CFU ml⁻¹) in 48 hours of cultivation. Figure 2 illustrates this result for *Z. californica* in comparison to growth in 5% raw glycerol. Besides the tiny cell growth in 10% and 15% of raw glycerol these data indicates that both *Z. californica* and *P. fermentans* seem to tolerate higher concentrations of this refuge, comparing to the other species (*Candida* sp., *C. melibiosica* and *C.oleophila*), for which we did not observe any cell growth at these glycerol concentrations.

Under anaerobic conditions all isolates showed some growth potential at 5% raw glycerol, at temperatures that varied among species (20°C for *Candida* sp. and 30°C for the other yeasts species). Nevertheless, the final cell densities at exponential phase ($2,22 \times 10^4$ CFU ml⁻¹ for *Candida* sp., $1,27 \times 10^5$ CFU ml⁻¹ for *C. melibiosica*, $1,6 \times 10^5$ CFU ml⁻¹ for *C.oleophila*, $1,79 \times 10^5$ CFU ml⁻¹ for *Z.californica* and $8,2 \times 10^3$ CFU ml⁻¹ for *P.fermentans*) were much lower when compared to those under aerobic conditions. Figure 3 shows these results in contrast to growth in aerobiosis with 5% raw glycerol.

Selected yeasts and culture conditions for efficient raw glycerol assimilation

Based on the criteria applied for evaluating the growth curves derived from the cultures performed under the analyzed conditions (different temperatures, glycerol concentrations, oxygenation conditions) we observed that the combination of 5% glycerol concentration and the presence of oxygen favored the growth of all isolates. Nevertheless, the more appropriate temperature for this context varied among species: 20°C for *Z. californica* and *Candida* sp.; 30°C for *C. melibiosica*, *P. fermentans* and *C. oleophila*. It is also relevant to compare the results obtained from growth in YNB with 2% glucose, to those in YNB with 5% glycerol as sole carbon source at the already mentioned temperatures. From

this data confrontation we observed a great similarity in terms of cell density in exponential phase for four of the investigated species in both carbon sources, and even a larger increase in cellular density for *Z. californica* species using glycerol, compared to glucose. Furthermore, comparing the different species in relation to their growth efficiency under these elected conditions, it is not possible to distinguish anyone as most efficient for raw glycerol assimilation, since they revealed similar capacities to grow with raw glycerol as sole carbon source. Fig1.

Moreover, although low glycerol concentrations favored the cellular growth for all yeast species, it is important to emphasize the tolerance observed for *Z. californica* and *P. fermentans* species to the higher glycerol concentrations analyzed (10 and 15%).

DISCUSSION

The use of microorganisms that naturally present metabolic features of interest for industrial application is preferable comparing to the use of genetically modified microorganisms, since these may present limited commercial use and are regulated by government agencies such as EPA and USDA (D. Glass Associates Inc, 2012). Apart from bureaucratic interference, these regulatory controls may increase the costs associated with biofuel production (Bell & Attfield, 2009). In this context, the investigation of environmental microorganisms with natural metabolic potential to consume the residual glycerol from biodiesel is an interesting strategy to minimize costs and environmental impacts associated with the disposal of this biofuel waste.

Due to the high content of salts and organic solvents present in raw glycerol (Choi *et al.*, 2011), microorganisms capable of consuming it and tolerating these inhibitory components are currently targets of investigations. Furthermore, according to Souza and colleagues (2014), the growth of yeast species in glycerol depends both on cultivation conditions and the type of glycerol utilized. Thus, the optimal cultivate conditions may be

different not only between species, but also between strains. Moreover, as already mentioned, most studies utilize other carbon sources associated with raw glycerol, which can raise the costs of assimilation or bioconversion processes, compared to the use of raw glycerol as a sole carbon source without addition of nutritional supplements.

The five yeast isolates analyzed in this study were able to tolerate the inhibitory components of the raw glycerol at 5% in culture medium. The low cell growth observed at the higher concentrations of glycerol may be explained by the presence of impurities that may have negatively influenced the cell viability (Souza *et al.*, 2014), although *Z. californica* (at 10 and 15% glycerol concentrations) and *P. fermentans* (15%), have demonstrated greater tolerance than the other species analyzed for this conditions.

Regarding the lowest concentration of glycerol (5%), the five species presented significant cell growth using raw glycerol as sole carbon source, with cell densities similar to those observed in cultures using glucose as sole carbon source. This similarity in terms of cell density observed for cultures with glucose and for those with raw glycerol as sole carbon source indicates that all investigated yeast species have a great capacity to assimilate this industrial waste. Data from literature report the utilization of raw glycerol as carbon source by several species and strains of *Candida* (Ashby *et al.*, 2005; Konishi *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2009; Habe *et al.*, 2009; Chatzifragkou *et al.*, 2011, Souza *et al.*, 2014), *Pseudozyma* (Morita *et al.*, 2007), *Geotrichium* and *Metschnikowia* (Koganti *et al.*, 2011) as well as by *Debaryomyces hansenii* (Koganti *et al.*, 2011; Habe *et al.*, 2009), *Trichosporon mycotoxinivorans* (Monteiro *et al.*, 2012), *Pichia membranefaciens* (Chatzifragkou *et al.*, 2011) and *P. fermentans* UFLA DM31.7 (Souza *et al.*, 2014). Nevertheless, the vast majority of these studies used nutritional supplements that are a requirement or at least support the growth with glycerol (Ochoa *et al.*, 2010; Merico *et al.*, 2011). Thus, since the yeast isolates investigated in this study revealed a remarkable efficiency to growth in raw glycerol as sole carbon source, our data strongly indicate that they represent interesting microorganisms to be investigated for further bioremediation studies.

The literature have already reported the assimilation of glycerol by *P. fermentans* and *C. oleophila* (García-Fraile *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2014). Additionally, Chatzifragkou and colleagues (2011) reported the ability for metabolic assimilation of raw glycerol by different species of *Candida* and by one *Pichia* species (*P. membranefaciens*), which corroborates the results found for the species used in this study that belong to these genera. Since the optimal culture conditions may be different between strains and depends of the type of glycerol (Souza *et al.*, 2014), although the glycerol assimilation by *P. fermentans* and *C. oleophila* have already been described, our data reinforce these metabolic capacity for both species.

Interestingly, this is the first report about the metabolic property of the species *Z. californica*, *Candida* sp. and *C. melibiosica* to assimilate biodiesel derived glycerol. Still contributing to the expansion of knowledge about this interesting metabolic ability, this study describes it for the first time for a species of *Zygowilliopsis* genus. There are few reports in literature about the assimilation of raw glycerol by yeast species in which this metabolic property had never been described. Thus, the discovery of this potential in three different yeast species, one of them being a putative new *Candida* species, as reported here, represents an important step in the research and use of new yeast strains in biotechnological applications. Additionally, preliminary analyses have indicated a bioconversion potential of raw glycerol by the some of the analyzed yeasts. HPLC chromatograms of *Z. californica* showed a clear evidence for the ability to deplete the glycerol present in the culture media. Moreover, these analyses also indicate that some other molecules, such as ribitol (as candidate), may be produced by *Z. californica*. Moreover, the investigated *Candida* sp. was able to achieve the interesting index of emulsifying activity (E24) of 66.66% on biodiesel (when cultivated in glycerol 2% as substrate) suggesting potential surfactant production, being an interesting subject of future investigations for this purpose (data not shown).

The data presented here revealed *Z. californica*, *Candida* sp. and *C. melibiosica* as yeast species capable to perform an efficient assimilation of biodiesel derived raw glycerol when it is present in culture medium as the sole carbon source. Moreover, this is the first

study in which a species of *Zygowilliopsis* genus was described as bearing this metabolic feature. Furthermore, this is also the first report about metabolic properties of one candidate new species of *Candida* genus, which are specifically related to the ability to grow with raw glycerol as sole carbon source. Thus, this study revealed that all yeast investigated species, bear remarkable metabolic properties to be considered promising microorganisms as research targets for future biotechnological purposes.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

The authors are grateful to Probolsas – PUCRS and BPA/PUCRS (Praias) 2012 for their financial support to the present work, and to Laboratório de Biologia Genômica e Molecular and Laboratório Analítico de Insumos Farmacêuticos that kindly helped us in the conducting some of the experiments.

References

1. **Almeida, J.R.M., Fávoro, L.C.L., Quirino, B.F. (2012).** Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels* **5**, 48.
2. **Amaral, P.F.F., Ferreira, T.F., Fontes, G.C. (2009).** Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food Bioprod Process* **98**, 1-8.
3. **Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., Foglia, T.A. (2005).** Synthesis of short-/medium-chain-length poly (hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromolecules* **6**, 2106-2112.

4. **Ashby, R.D, Solaiman, D.K.Y., Strahan, G.D. (2011).** Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) biopolymers. *J Am Oil Chem Soc* **88**,949-959.
5. **Barbirato, F., Suzette, A., Soucaille, P., Camarasa, C., Salmon, J.M., Bories, A. (1997b).** Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitations and regulations. *Microbiology* **143**, 2423-2432.
6. **Bell, P.J.L., Attfield, P.V.(2009).** Breakthrough in yeast for making bio-ethanol from lignocellulosics. URL:<http://www.eri.ucr.edu/ISAFXVCD/ISAFXVAF/YMBL.pdf>.
7. **Bognolo, G. (1999).** Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf A* **152**, 41-52.
8. **Carriquiry, M.A. (2007).** A comparative analysis of the development of the United States and European Union biodiesel industries. Iowa, *Briefing Paper 07-BP 51*.
9. **Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mayrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., & other authors. (2011).** Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy* **36**, 1097-1108.
10. **Choi, W.J., Hartono, R., Chan, W.H., Yeo, S.S. (2011).** Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **89**, 1255-1264.
11. **Ciafardini, G., Zullo, B.A., Iride, A. (2006a).** Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiol* **23**(1), 60-67.
12. **Ciafardini, G., Zullo, B.A., Cioccia, G., Iride, A. (2006b).** Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. *Int J Food Microbiol* **107**(1), 27-32.
13. **Clomburg, J.M., Gonzales, R. (2013).** Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends Biotechnol* **31**(1), 20-28.

14. **Collin, T., Bories, A., Lavigne, C., Moulin, G. (2001).** Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Curr Microbiol* **43**, 238-243.
15. **D. Glass Associates Inc.(2012).** Government and regulatory affairs - Use of modified microorganisms, algae or transgenic plants for biofuels. URL: <http://www.dglassassociates.com/REGUL/services.htm>. Accessed on February 22, 2013.
16. **Dasari, M. (2007).** Crude glycerol potential described. *Feedstuffs* **79**, 1-3.
17. **de los Santos, D.G., Turnes, C.G., Conceição, F.R. (2012).** Bioremediation of parboiled Rice effluent supplemented with biodiesel derived glycerol using *Pichia pastoris* X-33. *Scientific World Journal* **2012**,492925.
18. **Dermibas, M.F., Balat, M. (2006).** Recent advances on the production and utilization trends of biofuels: a global perspective. *Energy Convers Mgmt* **47**, 2371-2381.
19. **Dharmadi, Y., Murarka, A., Gonzales, R. (2006).** Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* **94**, 821-829.
20. **Dobson, R., Gray, V., Rumbold, K. (2012).** Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**, 217-226.
21. **Duarte, S.H., Andrade, C.C.P., Ghiselli, G., Maugeri, F. (2013a).** Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. *Bioresour Technol* **138**,377-381.
22. **Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. (2000).** Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* **50**, 1351-1371.
23. **Franciscon, E., Zille, A., Guimaro, F.D., de Menezes, C.R, Durrant, R.L., Cavaco-Paulo, A.(2009).** Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. *Int Biodeter Biodeg* **63**,280-288.

24. **García-Fraile, P., Silva, L.R., Sánchez-Márquez, S., Velázquez, R., Rivas, R. (2013).** Plums (*Prunus domestica* L.) are a good source of yeasts producing organic acids of industrial interest from glycerol. *Food Chem* **139**,31-34.
25. **Gungormusler, M., Gonen, C., Azbar, N. (2011).** 1,3-Propanediol production potential by a locally isolated strain of *Klebsiella pneumoniae* in comparison to *Clostridium beijerinckii* NRRL B593 from waste glycerol. *J Polym Environ* **19**,812-817.
26. **Habe H, Fukuoka T, Kitamoto D, Sakaki K. (2009).** Glycerol conversion to D-xylulose by two-stage microbial reaction using *Candida parapsilosis* and *Gluconobacter oxydans*. *J Oleo Sci* **11**,595-600.
27. **Hirsch, R.L. Bezdek, R., Wendling, R. (2006).** Peaking of world oil production and its mitigation. *AIChE J* **52**, 2-8.
28. **Hoogendoorn, A., Adriaans, T., van Kasteren, J.M.N., Jayaraj, K.M. (2007).** Glycerine purification via biocatalysis and column adsorption for high quality applications. URL <http://www.ingenia.nl/Flex/Site/Download.aspx?ID=2014>. Accessed on June 10, 2011.
29. **Iqbal, S., Khalid, Z.M., Malik, K.A. (1995).** Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol* **21**, 176–179.
30. **Juszczuk, P., Tomaszewska, L., Kita, A., Rymowicz, W. (2013).** Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Bioresour Technol* **137**,124-131.
31. **Kamm, B., Kamm, M. (2007).** Biorefineries – multi-product processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **105**, 175-204.
32. **Karanth, N.G.K., Deo, P.G., Veenanadig, N.K. (1999).** Microbial production of biosurfactants and their importance. *Curr Sci* **77**, 116-126.
33. **Kerr, R.A. (2007).** Global warming is changing the world. *Science* **316**,188-190.

34. **Khan A, Bhide A, Gadre R. (2009).** Mannitol production from glycerol by resting cells of *Candida magnoliae*. *Bioresour Technol* **100**,4911-4913.
35. **Khanal, S.K., Shrestha, P., Rasmussen, M., Lamsal, B.P., Visvanathan, C., Liu, H., van Leewen, J. (2008).** Bioenergy and biofuel production from wastes/residues of emerging biofuel industries. *Water Environ Res* **80**, 1625-1647.
36. **Koganti, S., Kuo, T.M., Kurtzman, C.P., Smith, N., Ju, L.K. (2011).** Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**, 257-267.
37. **Konishi, M., Fukuoka, T., Morita, T., Imura, T., Kitamoto, D. (2008).** Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *J Oleo Sci* **57**(6),395-396.
38. **Kusserow, B., Schimpf, S., Claus, P. (2003).** Hydrogenation of glucose to sorbitol over nickel and ruthenium catalysts. *Adv Synth Catal* **345**, 289-299.
39. **Koutinas, A.A., Wang, R., Webb, C. (2007).** The biochemurgist – bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. *Biofuels Bioprod Bioref* **1**, 24-38.
40. **Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. (1998).** Identification and phylogeny of the ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Van Leeuw J Microb* **73**, 331-371.
41. **Liu, X., Jensen, P.R., Workman, M. (2012).** Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Bioresour Technol* 579-586.
42. **Maciel, B.M., Dias, J.C., dos Santos, A.C., Filho, R.C., Fontana, R., Loguercio, L.L., Rezende, R.P.(2007).** Microbial surfactant activities from a petrochemical landfarm in a humid tropical region of Brazil. *Can J Microbiol* **53**,937-943.
43. **Makri, A., Fakas, S., Aggelis, G. (2010).** Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Biosesour Technol* **101**, 2351-2358.

44. **Meher, L.C., Sagar, D.V., Naik, S.N. (2006).** Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. *Renew Sust Energy Rev* **10**, 248-268.
45. **Merico, A., Ragni, E., Galafassi, S., Popolo, L., Compagno, C. (2011).** Generation of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain with a high freeze tolerance and an improved ability to grow on glycerol. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**,1037-1044.
46. **Milic, J.S., Beskoski, V.P., Ilic, M.V., Ali, S.A.M., Cvijovic, G.D., Vrvic, M.M.(2009).** Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. *J Serb Chem Soc* **74**,455-460.
47. **Min, Y.N., Yan, F., Liu, F.Z., Coto, C., Waldroup, P.W. (2011).** Glycerine – a new energy source for poultry. *Int J Poult Sci* **9**, 1-4.
48. **Monteiro, A.S., Domingues, V.S., Souza, M.V.D., Lula, I., Gonçalves, D.B., Siqueira, E.P., Santos, .L. (2012).** Bioconversion of biodiesel refinery waste in the bioemulsifier by *Trichosporon mycotoxinivorans* CLA2. *Biotechnol Biofuels* **5**, 29.
49. **Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Kitamoto, D. (2007).** Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317T. *J Biosci Bioeng* **104**, 78-81.
50. **Mu, Y., Xiu, Z.L., Zhang, D.J. (2008).** A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem Eng J* **40**,537-541.
51. **Ochoa-Estopier, A., Lesage, J., Gorret, N., Guillouet, S.E. (2010).** Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol. *Bioresour Technol* **102** (2),1521-1527.
52. **O'Donnell, K. Fusarium and its near relatives. (1993).** In *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*, pp. 225-233. Edited by Reynolds, D.R., Taylor, J.W. UK: CAB International Wallingford.

53. **Pagliari, M., Criminna, R., Kimura, H., Rossi, M., and Della Pina, C. (2007).** From glycerol to value-added products. *Angew Chem Int* **46**, 2-20.
54. **Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., Marc, I. (2002).** *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol* **92**, 737-744.
55. **Pirollo, M.P.S., Mariano, A.P., Lovaglio, R.B., Costa, S.G.V.A.O., Walter, V., Hausmann, R., Contiero, J. (2008).** Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. *J Appl Microbiol* **105**, 1484-1490.
56. **Rademaker, J.L.W., Bruijin, F.J. (1997).** Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In *DNA markers: protocols, applications, and overviews*, pp 151-171. Edited by Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M. NY: J. Wiley & Sons.
57. **Ramos, J.P., Rosa, C.A., Carvalho, E.M.M., Leoncini, O., Valente, P. (2005).** Heteroduplex mobility assay of the 26S rDNA D1/D2 region for differentiation of clinically relevant *Candida* species. *A Van Leeuw* **1**, 39-44.
58. **Rausch, K.D. and Belyea, R.L. (2006).** The future of coproducts from corn processing. *Appl Biochem Biotechnol* **128**, 47-86.
59. **Robert, M., Mercadé, M.C., Bosh, P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A., Guinea, J. (1989).** Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol Lett* **11**(12), 871-874.
60. **Rymowicz, W., Rywinska, A. (2009).** High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* **31**, 377-389.
61. **Rymowicz, W., Fatykhova, A.R., Kamzolova, S.V., Rywinska, A., Morgunov, I.G.(2010).** Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**,971-979.

62. **Silva, G.P., Mack, M. Contiero, J. (2009).** Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* **27**, 30-39.
63. **Solomon, B.O., Zeng, A.P., Biebl, H., Schlieker, H., Posten, C., Deckwer, W.D. (1995).** Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. *J Biotechnol* **39**, 107-117.
64. **Souza, K.S.T., Schwan, R.F., Dias, D.R. (2014).** Lipid and citric acid production by wild yeasts grown in glycerol. *J Microbiol Biotechnol* **24**(4),497-506.
65. **Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M.P., Voordeckers, K., Verstrepen, K.J. (2014).** Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol Rev* 1-49.
66. **Swinnen, S., Klein, M., Carillo, M., McInnes, J., Nguyen, H., Nevoigt, E. (2014).** Re-evaluation of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an isolate that grows on glycerol without supporting supplements. *Biotechnol Biofuels* **6**,157.
67. **US Energy Information Administration. (2011).** URL: <http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?tid=79&pid=81&aid=1&cid=regions,&syid=2005&eyid=2011&unit=TBPD> . Accessed on January 15, 2013.
68. **van Eck, J.H., Prior, B.A., Brandt, E.V. (1985).** Accumulation of polyhydroxy alcohols by *Hansenula anomala* in response to water stress. *Can J Microbiol* **11**, 1061-1064.
69. **Walmsley, R.M., Keenan, P. (2000).** The eukaryote alternative: Advantages of using yeasts in place of bacteria in microbial biosensor development. *Bioprocess Eng* **5**, 387-394.
70. **Wang, Z-X., Zhuge, J., Fang, H., Prior, B.A. (2001).** Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol Adv* **19**, 201-223.

71. **Workman, M., Holt, P., Thykaer, J. (2013).** Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express* **3**,58.
72. **Xu, J. (2006).** Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics concepts, tools, and recent advances. *Mol Ecol* **15**, 1713-1731.
73. **Yang, L.B., Zhan, X.B., Zheng, Z.Y., Wu, J.R., Gao, M.J., Lin, C.C. (2014).** A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. *Bioresour Technol* 120-127.
74. **Yazdani, S., Gonzalez, R. (2007).** Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotech* **18**, 213-219.
75. **Yoshikawa, J., Habe, H., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Iwabuchi, H., Uemura, S., Tamura, T., Kitamoto, D. (2014).** Production of mannitol from raw glycerol by *Candida azyma*. *J Biosci Bioeng* **117** (6), 725-729.
76. **Yuzbahev, T.V., Yuzbaheva, E.Y., Sobolevskava, T.I., Laptev, I.A., Vybornaya, T.V., Larina, A.S., Matsui, K., Fukui, K., Sineoky, S.P. (2010).** Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng* **107**(4), 673-83.

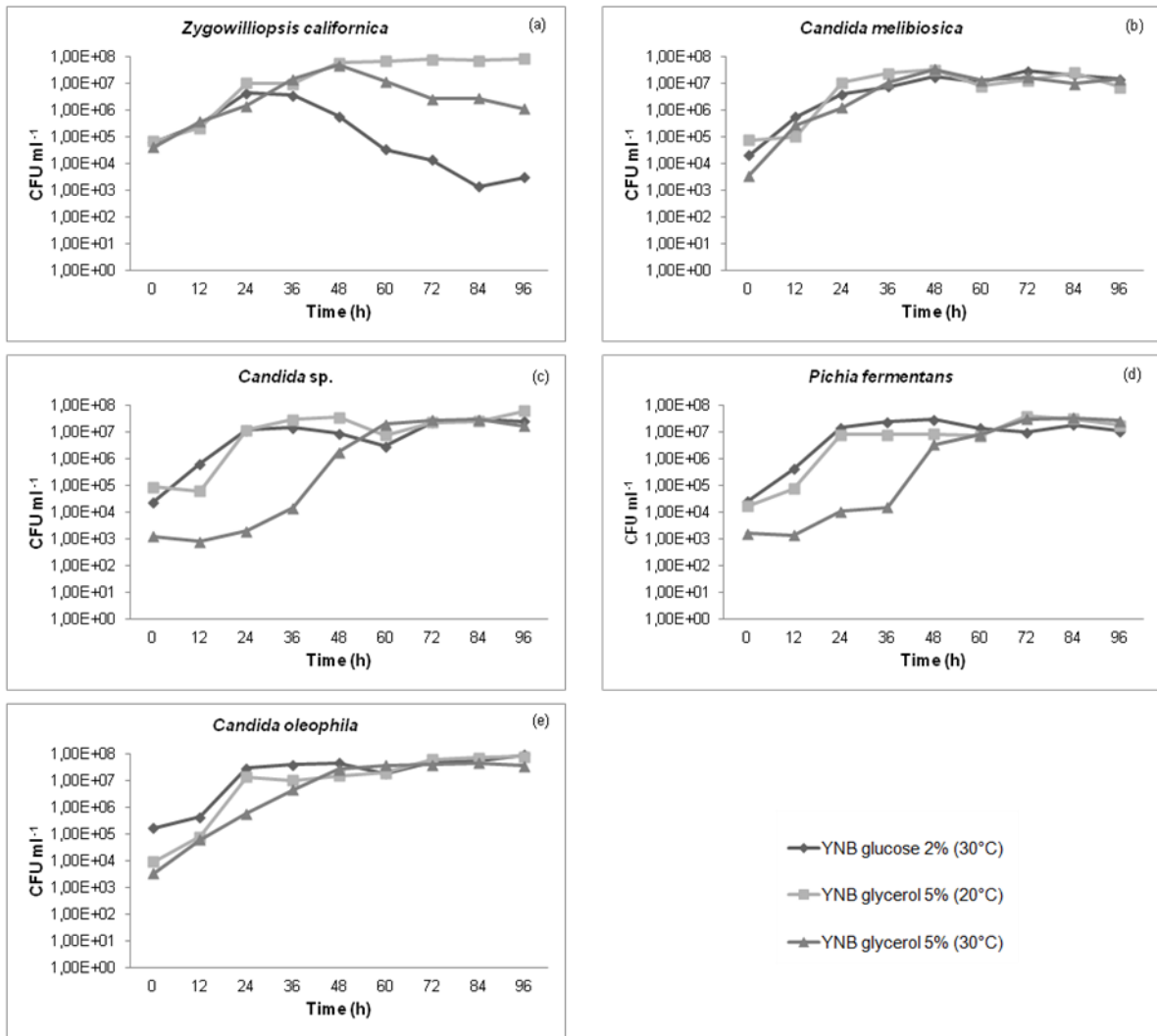
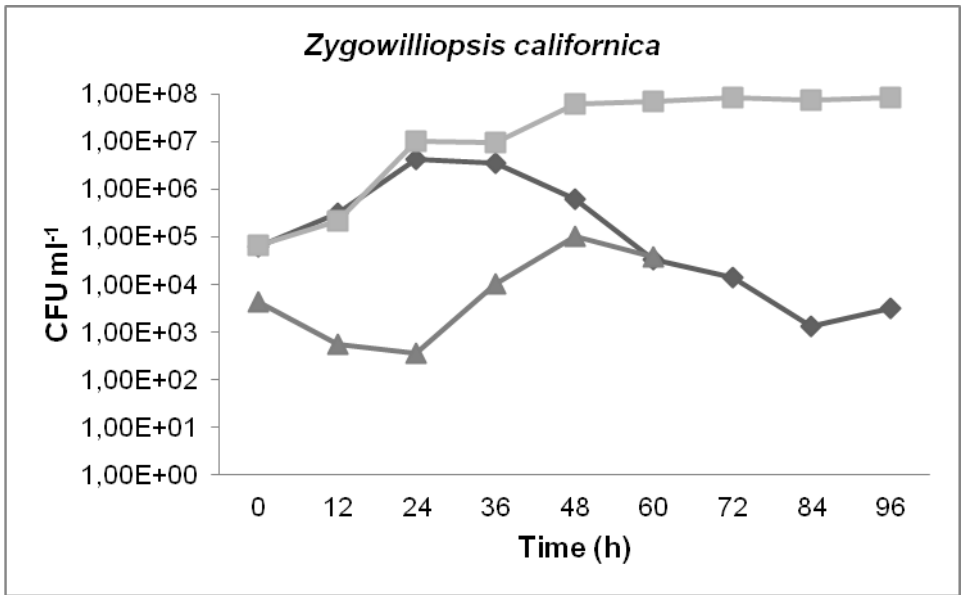


Fig.1. The growth efficiency of the five investigated yeast species in YNB glycerol 5% at different temperatures (20°C and 30°C) and in YNB glucose 2% (at 30°C) as control. *Zygowillipsis californica* (a). *Candida melibiosica* (b). *Candida sp.* (c). *Pichia fermentans* (d). *Candida oleophila* (e).



- ◆ YNB glucose 2% (30°C)
- YNB glycerol 5% (20°C)
- ▲ YNB glycerol 10% (30°C)

Fig.2. Difference in terms of cell growth of *Z.californica* in YNB with 5% raw glycerol (at 20°C) and 10% raw glycerol (at 30°C). YNB with 2% glucose (at 30°C) is presented as a control.

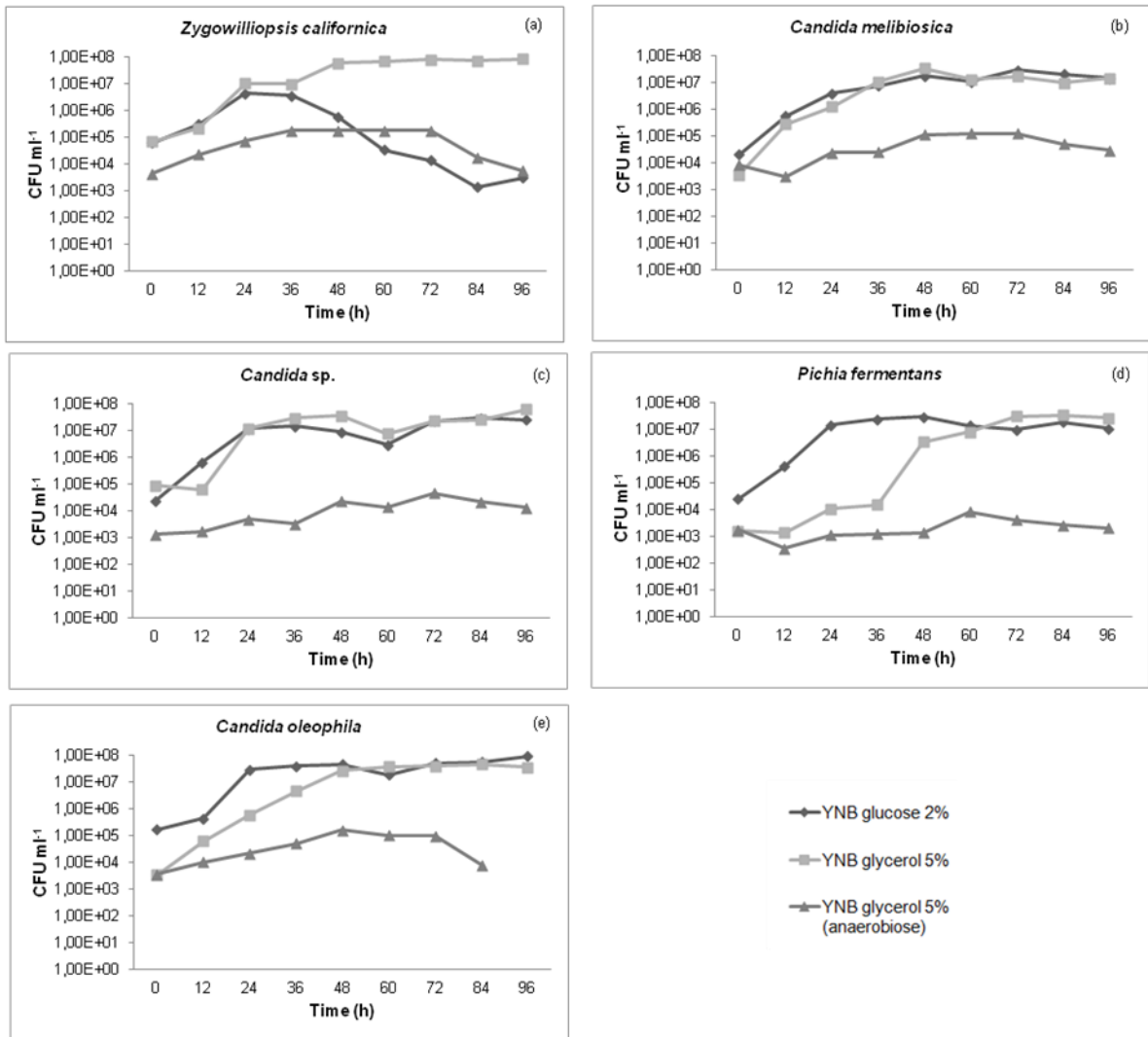


Fig.3. Comparison of growth efficiency of the five investigated yeast species in YNB glycerol 5% under aerobiose and anaerobiose. *Zygowillipsis californica* at 30°C (a). *Candida melibiosica* at 30°C (b). *Candida sp.* at 20°C (c). *Pichia fermentans* at 30°C (d). *Candida oleophila* at 30°C (e). YNB with 2% glucose (at 30°C) is presented as a control.

Table 1.

Origin and molecular identification (based on D1/D2 fragment of 26S rDNA sequence) of the selected yeast isolates investigated in this study.

Isolate code	Origin	Identified species
VP3	<i>Vriesea</i> sp. water tanks	<i>Zygowilliopsis californica</i>
EH13	<i>Eryngium horridum</i> water tanks	<i>Candida melibiosica</i>
UV1	Colonial grape juice	<i>Pichia fermentans</i>
VTA9	<i>Vriesea</i> sp. water tanks	<i>Candida oleophila</i>
VTA3	<i>Vriesea</i> sp. water tanks	<i>Candida</i> sp. (maximum similarity index of 87% with <i>Candida danielliae</i>)

Capítulo 3

Considerações finais

3.1 Considerações finais

Com a rápida expansão da capacidade de produção do biodiesel observada nos últimos anos (6), existe uma grande preocupação da indústria de biocombustíveis em relação ao incremento na quantidade de resíduos gerados durante o processo. Essa preocupação se deve basicamente a três fatores: o baixo valor comercial do glicerol bruto, sua reduzida assimilação (não proporcional à sua produção) após processo de purificação por indústrias de outros setores e aos altos custos associados ao seu descarte (18). Em caso de descarte no meio ambiente, o glicerol bruto pode contaminar tanto o solo, como águas subterrâneas, através da dispersão de substâncias tóxicas como o metanol (81), além de promover elevações de pH devido à presença de sódio ou hidróxido de potássio (caso o glicerol seja descartado sem passar por processos de neutralização) (82). Essas alterações têm potencial de afetar toda a estrutura biótica das áreas impactadas pelo descarte, representando, portanto, um importante desafio ambiental (21).

Nesse contexto, a aplicação de microrganismos em processos de biorremediação (83, 84, 85, 86) ou bioconversão do glicerol residual de biodiesel (10, 24, 25) a moléculas de maior valor agregado tende a valorizar a cadeia produtiva do biodiesel, e a minimizar impactos ambientais associados ao descarte inadequado de rejeitos oriundos do processo. É interessante, entretanto, que esses microrganismos apresentem naturalmente a capacidade de utilizar o glicerol, uma vez que o emprego de microrganismos modificados geneticamente, além de envolver metodologias complexas para as suas construções (87), possuem uso comercial restrito, são regulados por agências governamentais (88) e ainda podem representar custos na cadeia produtiva de biocombustíveis (89). Devido a esses fatores, a presente pesquisa buscou analisar espécies de leveduras originárias da biodiversidade brasileira, ainda tão pouco explorada (79, 80), e que naturalmente apresentam o potencial de utilização de glicerol residual de biodiesel.

Os cinco isolados de levedura analisados neste trabalho mostraram habilidade de utilizar o glicerol bruto como única fonte de carbono, sendo este o primeiro relato quanto a

este potencial metabólico para três das cinco espécies investigadas (apenas *C. oleophila* e *P. fermentans* já havia, sido investigadas quanto a esta habilidade metabólica).

Todos os isolados investigados, em especial *Z. californica* e *P. fermentans*, se mostraram tolerantes aos componentes inibitórios do glicerol residual de biodiesel. As densidades celulares observadas em aerobiose na concentração mais baixa de glicerol testada apresentaram similaridade com as densidades celulares observadas utilizando glicose como fonte de carbono.

De forma igualmente importante, esta é a primeira vez que esta habilidade metabólica é relatada para uma espécie do gênero *Zygowilliopsis*. Além disso, este estudo também levantou dados iniciais a respeito da produção de moléculas de interesse industrial a partir do glicerol bruto para as espécies *Candida* sp. e *Z. californica*.

Dentre as leveduras isoladas e analisadas, foi descoberta, durante este estudo, uma provável nova espécie (*Candida* sp.), a qual se encontra em fase de caracterização molecular e bioquímica para fins de descrição. Tais inferências se baseiam nos dados de identificação molecular inicial, que indicam que, com relação ao fragmento de DNA analisado, a espécie mais próxima a este isolado presente no banco de dados GeneBank (*Candida danielliae*) apresenta um índice de similaridade de apenas 87%, o que para filogenia de leveduras é considerado um índice de similaridade muito baixo.

Este mesmo isolado apresentou um índice de atividade emulsificante bastante satisfatório (66,66%) (apêndice A) sugerindo sua potencial aplicação para produção de surfactante utilizando glicerol bruto como matéria-prima. Trata-se de um dado muito interessante, uma vez que o uso de materiais de baixo valor comercial (como o glicerol) como substrato para a produção de biosurfactantes se mostra uma promissora alternativa para ampliar a sua utilização no mercado, uma vez que a demanda atual é coberta por surfactantes de origem química (sabidamente tóxicos ao ambiente) (76), em função dos custos associados ao processo. Ainda são previstas novas análises com a finalidade de

identificar e purificar as moléculas com propriedade emulsificante produzidas por *Candida* sp.

Dados provenientes das análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicam que *Z. californica* é um alvo de investigações promissor no que se refere ao potencial de assimilação de glicerol, que também está sendo relatado pela primeira vez neste estudo. Esta espécie mostrou claramente uma ótima habilidade em consumir o glicerol bruto presente no meio de cultura, conforme foi possível observar a partir das análises de CLAE. A presença de picos diferentes dos observados no meio controle (YNB adicionado de glicerina bruta a 5%) sugere ainda a produção de outras moléculas a partir deste resíduo do biodiesel. Embora a elucidação de alguns picos observados no cromatograma do sobrenadante do cultivo analisado ainda se encontre em andamento através da otimização dos parâmetros de análise, sugere-se, para o caso de *Z. californica* a presença de ribitol devido ao seu tempo de retenção (16,8 minutos), que se mostrou bastante similar ao indicado pelo fabricante da coluna cromatográfica (16,7 minutos) (apêndice B).

A produção de ácidos orgânicos (como ácido cítrico e ácido succínico) por leveduras utilizando glicerol bruto como fonte de carbono também é reportada pela literatura (52, 53), embora poucas espécies tenham sido relacionadas a este potencial metabólico. Nos isolados analisados, esta possibilidade ainda será investigada através de análises de CLAE utilizando uma coluna cromatográfica (Aminex HPX-87H, Bio-Rad) adequada para a detecção destas moléculas.

O conjunto de dados levantados neste estudo sugerem as espécies *Z. californica*, *Candida* sp. e *C. melibiosica* como promissores alvos de investigação biotecnológica por apresentarem naturalmente a capacidade metabólica de utilizar o glicerol residual de biodiesel como única fonte de carbono. Este é também o primeiro relato sobre esta a capacidade metabólica para uma espécie pertencente ao gênero *Zygowilliopsis*, com indícios de produção de moléculas de aplicação industrial. Além disso, a descoberta de uma provável nova espécie pertencente à biodiversidade local, que apresenta indícios de

aplicabilidade biotecnológica, a partir da conversão de glicerol residual de biodiesel a moléculas com propriedades emulsificantes, reitera a importância das investigações a cerca da existência de tipos metabólicos microbianos ainda desconhecidos na natureza.

REFERÊNCIAS

1. Nwafor OMI. Emission characteristics of Diesel engine operating on rapessed methyl Ester. *Renew Energy*. 2004;29:119-129.
2. Kerr, R.A. Global warming is changing the world. *Science*. 2007;316:188-190.
3. Hirsch, R.L. Bezdek, R., Wendling, R. Peaking of world oil production and its mitigation. *AICHE J*. 2006;52, 2-8.
4. Meher LC, Sagar DV, Naik SN. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. *Renew Sust Energ Rev*. 2006;10:248-268.
5. Dermibas MF, Balat M. Recent advances on the production and utiization trends of biofuels: a global perspective. *Energy Convers Mgmt*. 2006;47:2371-2381.
6. Carriquiry MA. A comparative analysis of the development of the United States and European union biodiesel industries. Iowa, Briefing Paper 07-BP 51, 2007.
7. Silva GP, Mack M, Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv*. 2009;27:30-39.
8. US Energy Information Administration. Disponível em: <http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?tid=79&pid=81&aid=1&cid=regions,&syid=2005&eyid=2011&unit=TBPD>. Acesso em 15 de janeiro de 2013.
9. Almeida JRM, Fávaro LCL, Quirino BF. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels*. 2012;5:48.

10. Solomon BO, Zeng AP, Biebl H, Schlieker H, Posten C, Deckwer WD. Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. J Biotechnol. 1995;39:107-117.
11. Barbirato F, Suzette A, Soucaille P, Camarasa C, Salmon JM, Bories A. Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitations and regulations. Microbiology. 1997b;143:2423-2432.
12. Collin T, Bories A, Lavigne C, Moulin G. Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. Curr Microbiol. 2001;43:238-243.
13. Thompson JC, He BB. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. Appl Eng Agric. 2006;22(2):261-5.
14. Wang Z-X, Zhuge J, Fang H, Prior BA. Glycerol production by microbial fermentation: a review. Biotechnol Adv. 2001;19:201-223.
15. Choi WJ, Hartono R, Chan WH, Yeo SS. Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;89:1255-1264.
16. Amaral PFF, Ferreira TF, Fontes GC. Glycerol valorization: New biotechnological routes. Food Bioprod Process. 2009;98:1-8.
17. Hoogendoorn A, Adriaans T, van Kasteren JMN, Jayaraj KM. Glycerine purification via biocatalysis and column adsorption for high quality applications [Eletrônico]. Novembro, 2007. Disponível em: <http://www.ingenia.nl/Flex/Site/Download.aspx?ID=2014>. Acesso em 20 de junho de 2011.
18. Yazdani S, Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. Curr Opin Biotech. 2007;18:213-219.

19. Dasari M. Crude glycerol potential described. *Feedstuffs*. 2007;79:1-3.
20. Min YN, Yan F, Liu FZ, Coto C, Waldroup PW. Glycerine – a new energy source for poultry. *Int J Poult Sci*. 2011;9:1-4.
21. Dobson R, Gray V, Rumbold K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2012;39:217-226
22. Juszczak, P., Tomaszewska, L., Kita, A., Rymowicz, W. Biomass production by novel strains of *Yarrowia lipolytica* using raw glycerol, derived from biodiesel production. *Bioresour Technol* . 2013;137:124-131.
23. Workman, M., Holt, P., Thykaer, J. Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *AMB Express*. 2013; 3,58.
24. Koutinas AA, Wang R, Webb C. The biochemurgist – bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. *Biofuels Bioprod Bioref*. 2007;1:24-38.
25. Barbirato F, Chedaille D, Bories A. Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1997a;47:441-446.
26. Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol*. 1997a;20:82-86.
27. Kamm B, Kamm M. Biorefineries – multi-product processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2007;105:175-204.
28. Dharmadi Y, Murarka A, Gonzales R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng*. 2006; 94:821-829.

29. Clomburg JM, Gonzales R. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends Biotechnol.* 2013;31(1):20-28.
30. Walmsley RM, Keenan P. The eukaryote alternative: Advantages of using yeasts in place of bacteria in microbial biosensor development. *Bioprocess Eng.* 2000;5:387-394.
31. Xu J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics concepts, tools, and recent advances. *Mol Ecol.* 2006;15:1713-1731.
32. Zhao Y-N, Chen G, Yao S-J. Microbial production of 1,3 propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem Eng J.* 2006;32:93-99.
33. Easterling ER, French WT, Hernandez R, Licha M. The effect of glycerol as a sole source and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technol.* 2009;100:356-361.
34. Blomberg A, Adler L. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microbiol Physiol.* 1992;33:145-212.
35. Erkamova IT, Morgunov IG. Pathways of glycerol metabolism in *Yarrowia (Candida) lipolytica* yeasts. *Mikrobiologiya.* 1987;57:533-537;
36. Levinson WE, Kurtzman CP, Kuo T. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enzyme Microb Tech.* 2007;41:292-295.
37. Makri A, Fakas S, Aggelis G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technol.* 2010;101:2351-2358.
38. Gancedo C, Llobell A, Ribas JC, Luchi F. Isolation and characterization of mutants of *Schizosaccharomyces pombe* defective in glycerol catabolism. *Eur J Biochem.* 1986;159:171-174.

39. Adler L, Blomberg A, Nilsson A. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J Bacteriol. 1985;162:300-306.
40. van Zyl PJ, Prior BA, Kilian SG. Regulation of glycerol metabolism in *Zygosaccharomyces rouxii* to osmotic stress. Appl Microbiol Biotechnol. 1991;36:369-74.
41. Wang Z-X, Zughe J, Cao Y, Chen J, Fang H. The key enzymes of metabolism of glycerol in *Candida glycerolgenesis*. Acta Microbiol Sin. 2000;40:180-187.
42. May JW, Marshall JH, Sloan J. Glycerol utilization by *Schizosaccharomyces pombe*: phosphorylation of dihydroxyacetone by a specific kinase as the second step. J Gen Microbiol. 1982;128:1736-1736.
43. Pavlik P, Simon M, Schuster T, Ruis H. The glycerol kinase (*GUT1*) gene of *Saccharomyces cerevisiae* : cloning and characterization. Curr Genet. 1993;24:21-25.
44. Sprague GF, Cronan JE. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism. J Bacteriol. 1997;129:1335-1342.
45. Ronnow B, Kielland-Brandt MC. GUT2, a gene for mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 1993;9:1121-1130.
46. Grauslund M, Lopes JM, Ronnow B. Expression of *GUT1*, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. Nucleic Acids Res. 1999;22:4391-4398.
47. Norbeck, J., Blomberg, A. Metabolic and Regulatory Changes Associated with Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. J Biol Chem. 1997; 272(9): 5544–5554.

48. Silva-Graça, M. Salt stress response of the extremely halotolerant yeast *Candida halophila* (syn *vesatillis*) CBS 4019: biochemical and physiological studies. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Ciências, Universidade do Minho, Braga, 2004.
49. Koganti S, Kuo TM, Kurtzman CP, Smith N, Ju LK. Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90:257-267.
50. Rymowicz W, Rywinska A. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett.* 2009;31:377-389.
51. Khan A, Bhide A, Gadre R. Mannitol production from glycerol by resting cells of *Candida magnoliae*. *Bioresource Technol.* 2009;100:4911-4913
52. Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol.* 2002;92:737-744.
53. Yuzbahev TV, Yuzbaheva EY, Sobolevskaya TI, Laptev IA, Vybornaya TV, Larina AS, Matsui K, Fukui K, Sineoky SP. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Bioeng.* 2010;107(4):673-83.
54. Morita T, Konishi M, Fukuoka T, Imura T, Kitamoto D. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317T. *J Biosci Bioeng.* 2007;104:78-81.
55. Polyols – a global strategic business report. Disponível em: http://www.prweb.com/releases/polyols/sugar_alcohols_replacers/prweb8061551.htm. Acesso em 15 de junho de 2011.
56. Kusserow B, Schimpf S, Claus P. Hydrogenation of glucose to sorbitol over nickel and ruthenium catalysts. *Adv Synth Catal.* 2003;345:289-299.

57. Soetaert W, Vanhooren PT, Vandamme EJ. Production of mannitol by fermentation. *Methods in Biotechnology*, vol 10. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 1999, p. 261-275.
58. Onishi H, Suzuki T. Microbial Production of D-Mannitol and D-Fructose from glycerol. *Biotechnol Bioeng*. 1970;12:913.
59. Habe H, Fukuoka T, Kitamoto D, Sakaki K. Glycerol conversion to D-xylulose by two-stage microbial reaction using *Candida parapsilosis* and *Gluconobacter oxydans*. *J Oleo Sci*. 2009;11:595-600.
60. Schwartz D, Stein M, Schneider KH, Giffhorn F. Synthesis of D-xylulose from D-arabitol by enzymatic conversion with immobilized mannitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Biotechnol*. 1994;33:95-101.
61. Drueckhammer DG, Hennen WJ, Pederson RL, Barbas CF, Gautheron CM, Krach Tet, et al . Enzymatic catalysis in synthetic carbohydrate chemistry. *Synthesis*. 1991;7:499-525.
62. Nobre MF, Costa MS. The accumulation of polyols by the yeast *Dabaryomyces hansenii* in response to water stress. *Can J Microbiol*. 1985;11:1061-1064.
63. Aioki M, Pastore GM, Park YK. Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotechnol Lett*. 1993;15:338-383.
64. Marina A, Glaucia MP, Park YK. Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotechnol Lett*. 1993;15:383-388.
65. Amaral PFF, Lehocky M, Barros-Timmons AMV, Rocha-Leão MHM, Coelho MAS, Coutinho JAP. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Yeast*. 2006;23(12):867-877.

66. Fickers P, Benetti P-H, Wache Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS, et al. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* 2005;5:527-543.
67. Magnuson JK, Lasure LL. Organic acid production by filamentous fungi. In *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*. 2004 ed. Tkacz JS, Lange L. Kluwer Academic, Plenum Publishers, Nova York, p:307-340.
68. Soccol CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Pandey A. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol Biotechnol.* 2006;44:141-149.
69. Anastassiadis S, Morgunov IG, Kamzolova SV, Finogenova TV. Citric acid production patent review. *Recent Pat Biotechnol*, 2008;2(2):107-123.
70. Arikawa Y, Kuroyanagi T, Shimosaka M, Muratsubaki H, Enomoto K, Kodaira R, Okazaki M. Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 1999;87:28-36.
71. Saliola M, Bartoccioni PC, De Maria I, Lodi T, Falcone C. The deletion of the succinate dehydrogenase gene *KISDH1* in *Kluyveromyces fragilis* does not lead to respiratory deficiency. *Eukaryot Cell.* 2004;3:589-597.
72. McKinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;76:727-740.
73. Song H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39:352-361.
74. Ashby RD, Solaiman DKY, Foglia TA. Synthesis of short-/medium-chain-length poly (hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromolecules.* 2005;6:2106-2112.

75. Konishi M, Fukuoka T, Morita T, Imura T, Kitamoto D. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. J Oleo Sci. 2008;57(6):395-396.
76. Karanth NGK, Deo PG, Veenanadig NK. Microbial production of biosurfactants and their importance. Curr Sci. 1999;77:116-126.
77. Bognolo G. Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids Surf A. 1999;152:41-52.
78. Rosenberg E, Ron EZ. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol. 1999;52:154-162.
79. Landell MF, Mautone JN, Valente P. Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã Park Viamão/RS. Biociencias. 2006;14:144-149.
80. Cadete RM, Melo MA, Dussán KJ, Rodrigues RC, Silva SS, Zilli JE, Vital MJ, Gomes FC, Lachance MA, Rosa CA. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. Plos One. 2012;7(8):43135.
81. Selembo PA, Perez JM, Lloyd WA, Logan BE. High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. Int J Hydrog Energy. 2009;34:5373–5381.
82. Nwachukwu, R.E.S, Shahbazi, A., Wang, L., Worku, M., Ibrahim, S., Schimmel, K. Optimization of cultural conditions for conversion of glycerol to ethanol by *Enterobacter aerogenes* S012. Amb Express. 2013;3:12.
83. Maciel, B.M., Dias, J.C., dos Santos, A.C., Filho, R.C., Fontana, R., Loguercio, L.L., Rezende, R.P. Microbial surfactant activities from a petrochemical landfarm in a humid tropical region of Brazil. Can J Microbiol. 2007;53:937-943.

84. Milic, J.S., Beskoski, V.P., Ilic, M.V., Ali, S.A.M., Cvijovic, G.D., Vrvic, M.M. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. *J Serb Chem Soc.* 2009; 74:455-460.
85. Franciscon, E., Zille, A., Guimaro, F.D., de Menezes, C.R, Durrant, R.L., Cavaco-Paulo, A. Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. *Int Biodeter Biodeg.* 2009;63:280-288.
86. Duarte, S.H., Andrade, C.C.P., Ghiselli, G., Maugeri, F. Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. *Bioresour Technol.* 2013a;138:377-381.
87. Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M.P., Voordeckers, K., Verstrepen, K.J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 2014; 1-49.
88. D. Glass Associates Inc.(2012). Government and regulatory affairs - Use of modified microorganisms, algae or transgenic plants for biofuels. Disponível em: <http://www.dglassassociates.com/REGUL/services.htm>. Acesso em 22 de fevereiro de 2013.
89. Bell, P.J.L., Attfield, P.V.(2009). Breakthrough in yeast for making bio-ethanol from lignocellulosics. Disponível em: <http://www.eri.ucr.edu/ISAFXVCD/ISAFXVAF/YMBL.pdf>. Acesso em 15 de agosto de 2012.

APÉNDICE

APÊNDICE A - Avaliação de atividade emulsificante. Biodiesel em meio mineral com glicerol a 2% como substrato.

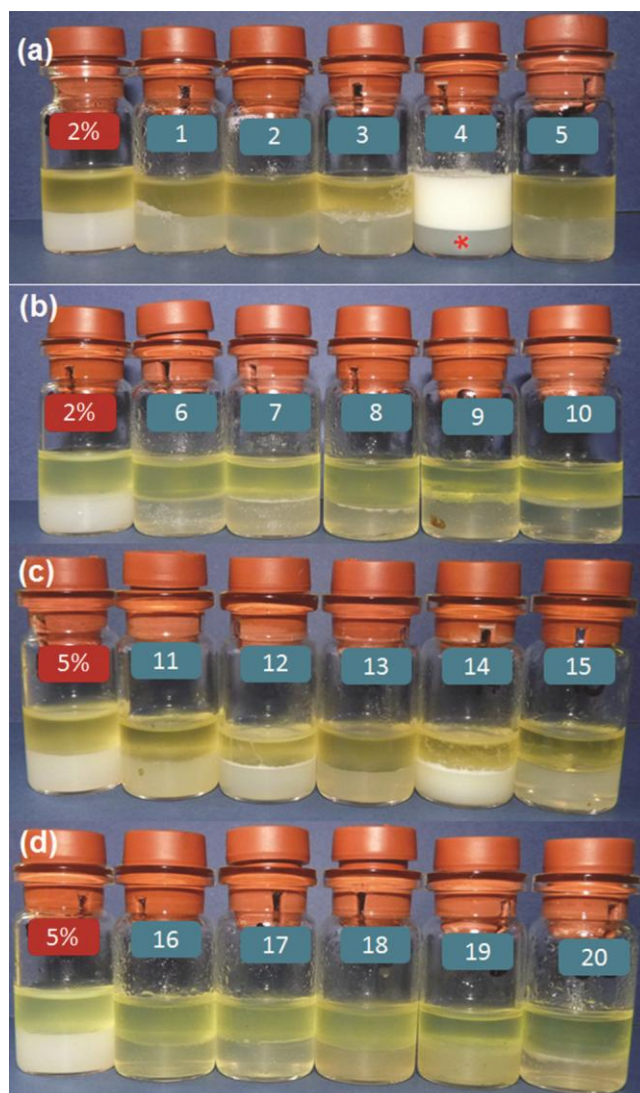


Figura A. Avaliação de atividade emulsificante. (a) Diesel em meio mineral com 2% de glicerol como substrato (b). Biodiesel em meio mineral com 5% de glicerol como substrato (c). Diesel em meio mineral com 5% de glicerol como substrato (d). 1, 6, 11 e 16: testes com sobrenadante de cultivo de *Z. californica*; 2, 7, 12 e 17: testes com sobrenadante de cultivo de *P. fermentans*; 3, 8, 13 e 18: testes com sobrenadante de cultivo de *C. melibiosica*; 4, 9, 14 e 19: testes com sobrenadante de cultivo de *Candida* sp.; 5, 10, 15 e 20: testes com sobrenadante de *C. oleophila*; * indica atividade emulsificante.

APÊNDICE B - Cromatogramas das análises de CLAE

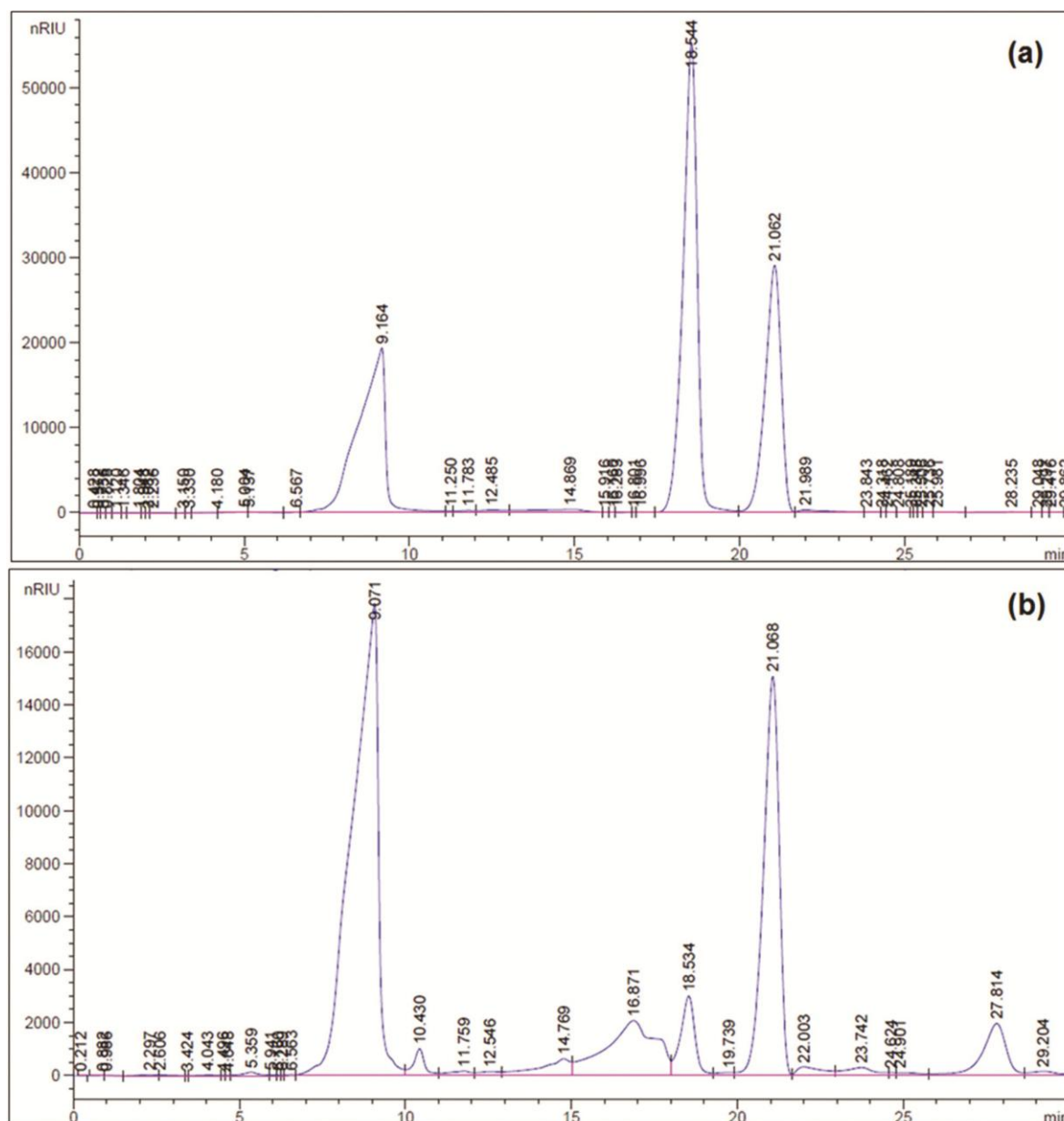


Figura B. Cromatogramas das análises de CLAE. (a) Cromatograma de YNB com glicerol a 5% não cultivado: três picos podem ser observados, um referente ao glicerol (18,5 minutos), e outros dois ainda não identificados (em 9,1 e 21 minutos). (b) Cromatograma de YNB com glicerol a 5% após cultivo com *Z. californica*; observação de significativa redução do pico de glicerol (18,5 minutos), presença de três picos ausentes no meio comparativo (em 10,4,16,8 e 27,8 minutos) e aumento dos picos em 14,7, 22 e 23,7 minutos.

