

# ANÁLISIS DE BALANCE DE FLUJOS METABÓLICOS APLICADO A LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS MICROBIANOS.

Castañeda, M. Teresita<sup>1,2✉</sup>; Nuñez, Sebastián<sup>1</sup>; Voget, Claudio<sup>2</sup>; Garelli, Fabricio<sup>1</sup>; De Battista, Hernán<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Control Aplicado (GCA), Instituto LEICI, UNLP-CONICET, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), UNLP-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Calle 47 y 115, (B1900ASH), La Plata, Argentina. Tel.: +54 221 483-3794.

e-mail: castaneda@biotec.quimica.unlp.edu.ar

**Palabras clave:** Análisis de balance de flujos metabólicos, lípidos microbianos, *Rhodospiridium toruloides*.

## 1.-INTRODUCCIÓN

Los lípidos microbianos han adquirido relevancia en los últimos años por su creciente empleo en la producción de biodiesel [1, 2]. Este biocombustible constituye una alternativa a la utilización de combustibles fósiles y, de este modo, contribuye a la reducción del impacto ambiental. Estos “biolípidos” son obtenidos mediante procesos biotecnológicos, empleando microorganismos oleaginosos capaces de acumular más del 20% de su peso seco en lípidos, principalmente en forma de triglicéridos (TAG) [1]. *Rhodospiridium toruloides* es una de las especies de levaduras oleaginosas más empleadas debido a su versatilidad nutricional, su elevado rendimiento lipídico y la calidad del perfil de ácidos grasos obtenido [3, 4]. No obstante, uno de los factores limitantes para la utilización de estos procesos en gran escala, es el costo de producción [5]. Es por ello, que resulta indispensable la optimización del proceso incluyendo la composición del medio de cultivo y la estrategia de cultivo empleada. Típicamente, se utiliza una estrategia de producción de TAG en dos etapas. La primera, está dirigida a la producción de elevadas concentraciones de biomasa, generalmente mediante cultivos sumergidos bajo limitación por carbono. En la segunda etapa, por otro lado, se induce la formación de lípidos mediante la limitación de un nutriente esencial para el crecimiento, con la consiguiente asimilación del carbono remanente en el medio de cultivo mediante la acumulación de TAG [6]. Con este modo de operación se han reportado procesos con limitación en nitrógeno [7], fósforo [8], azufre [9], etc. con diferentes relaciones molares entre carbono y el nutriente limitante (C/N, C/P y C/S, respectivamente).

La ingeniería metabólica es una disciplina muy útil a la hora de optimizar procesos biológicos. Dentro de esta disciplina, el Análisis de Balance de Flujos Metabólicos (FBA) es una herramienta muy eficaz para predecir, vía simulación, el comportamiento microbiano frente a diferentes perturbaciones externas [10]. A su vez, mediante el desarrollo de mapas metabólicos adecuados, permite la optimización del proceso *in silico* para luego llevar a cabo la correspondiente validación *in vitro*.

Recientemente, Bommarreddy *et al.* [12] reportaron un modelo metabólico de *R. toruloides* para la producción de TAG en cultivo sumergido. En dicho trabajo, emplearon Modos Elementales (EM) [13] como herramienta para el cálculo de los rendimientos máximos de TAG con diferentes fuentes de carbono, en sistema de cultivo por lotes (batch).

En el presente trabajo, se emplea el modelo metabólico de *R. toruloides* descrito por Bommarreddy *et al.* para la optimización de la producción de TAG mediante FBA, y se contrasta con los rendimientos máximos obtenidos en el citado trabajo. Adicionalmente, se proponen mejoras al citado modelo, con el objetivo de simular más fehacientemente el comportamiento microbiano y alcanzar rendimientos acordes a los resultados experimentales.

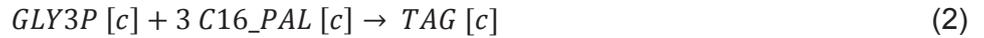
## 2.-MODELO Y MÉTODO DE ANÁLISIS

A continuación se describen brevemente algunos aspectos importantes del modelo bajo estudio y los métodos utilizados en el análisis.

### 2.1.- Modelo metabólico de *R. toruloides* para la producción de lípidos.

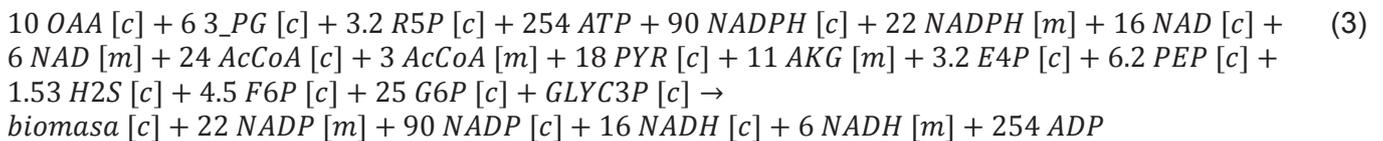
En la Fig. 1 se presenta el modelo metabólico de una cepa de *R. toruloides* [12]. Se trata de un modelo aeróbico, con 85 reacciones y 69 metabolitos, con los que se describe las principales rutas metabólicas del microorganismo: glucólisis, ruta de pentosas fosfato, ciclo de Krebs y ciclo del glioxilato. En dicho modelo se representan dos compartimentos intracelulares: el citosol [c] y la mitocondria [m], por lo que se tienen reacciones de intercambio entre los mismos. Los metabolitos se dividen en dos grupos: los

metabolitos extracelulares o de intercambio con el medio y los metabolitos intracelulares o intermediarios metabólicos. Dentro de los metabolitos extracelulares se encuentran las fuentes de carbono (glucosa, glicerol, xilosa y arabinosa), fuente de nitrógeno (NH<sub>3</sub>), O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y (SO<sub>4</sub>)<sup>-2</sup>. La producción de TAG se representa con las siguientes reacciones:



Nótese a partir de la ecuación (2) que una molécula de TAG se produce a partir de tres moléculas de ácido palmítico (C16\_PAL, ácido graso tomado como referencia) y una molécula de glicerol 3-fosfato (GLYC3P). La producción de C16\_PAL (1) requiere elevadas cantidades de NADPH, y tiene un consumo energético alto. Por su parte, el GLYC3P puede provenir de la asimilación directa de glicerol o bien producirse a partir de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) mediante la deshidrogenasa correspondiente (GPD1).

Por otro lado, el modelo incluye una fórmula de biomasa obtenida por combinación de precursores metabólicos necesarios para la duplicación celular. En el modelo original, ésta es obtenida a partir de datos bibliográficos para *Saccharomyces cerevisiae* [14]:



Al igual que en otros modelos metabólicos la energía necesaria para el mantenimiento no asociado al crecimiento (NGAM) se incorpora al modelo mediante la siguiente reacción (ATPM):

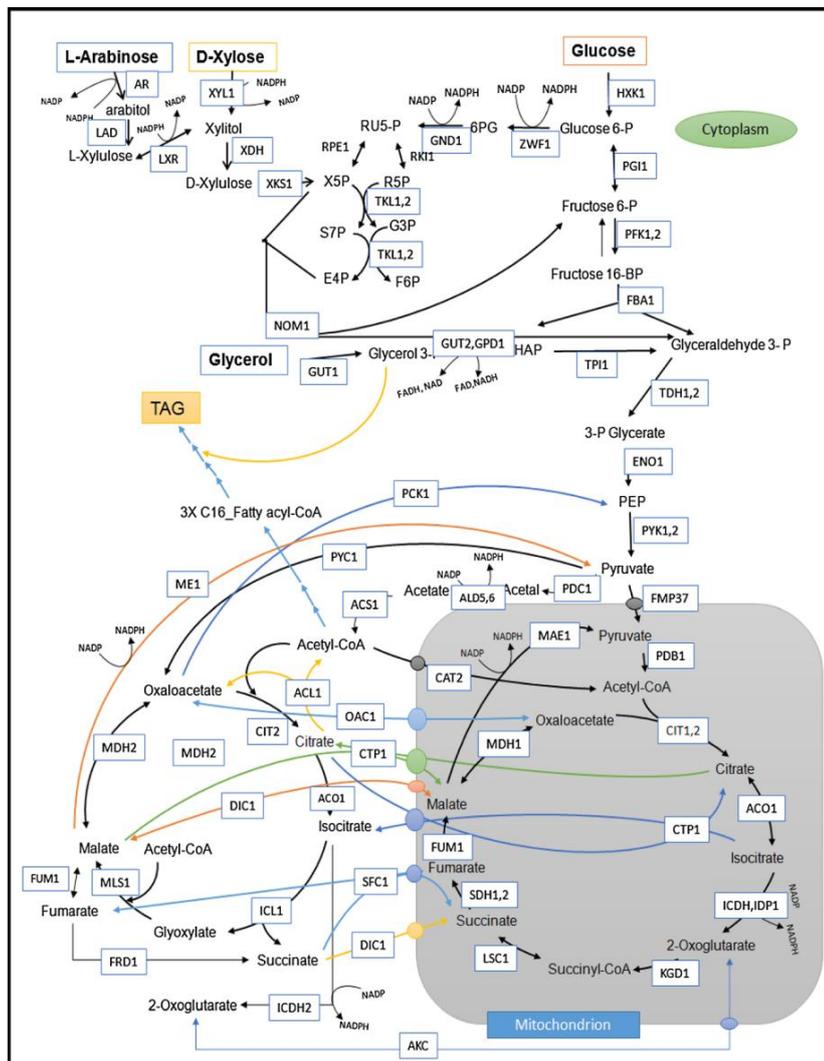


Figura 1. Modelo metabólico de *Rhodosporidium toruloides* [12]

Esta reacción ficticia permite considerar el flujo de ATP (mmol de ATP por unidad de biomasa y de tiempo) requerido en diferentes procesos no asociados al crecimiento [10].

## 2.2.- Análisis de balance de flujos metabólicos (FBA).

A partir de un balance de masas puede encontrarse un conjunto de ecuaciones diferenciales que describen la evolución temporal de los metabolitos intracelulares:

$$\frac{dc}{dt} = Sv - \mu c \quad (5)$$

donde  $c = (c_1 \ c_2 \ \dots \ c_m)^T$  es el vector con las concentraciones de los  $m$  metabolitos,  $v = (v_1 \ v_2 \ \dots \ v_n)^T$  es el vector de  $n$  flujos intracelulares,  $S$  es la matriz estequiométrica (de dimensión  $m \times n$ ) y  $\mu$  la tasa específica de producción de biomasa [13].

Dado que la dinámica intracelular es mucho más rápida que la extracelular, puede suponerse que la concentración de metabolitos intracelulares se encuentra en estado estacionario. En esa condición, y a partir de (5), se obtiene que el vector

de flujos debe cumplir la expresión  $Sv - \mu c = 0$ . Además, el término  $-\mu c$  puede ser despreciado con respecto a  $Sv$ , ya que su valor es mucho menor que los flujos metabólicos que afectan dicho metabolito. Luego, el valor de flujos en estado estacionario se obtiene de la ecuación general:

$$Sv = 0 \quad (6)$$

En los modelos metabólicos típicamente se tiene más cantidad de reacciones que de metabolitos ( $n > m$ ), lo que implica que el sistema es indeterminado y existen entonces  $n - m$  grados de libertad para definir la solución de (6). No obstante, el comportamiento celular es limitado por naturaleza, con lo cual es factible la reducción del conjunto de soluciones mediante la adición de restricciones que definan el espacio de soluciones factibles desde un punto de vista biológico. Algunos ejemplos de restricciones son las restricciones termodinámicas (determinan la irreversibilidad de algunas reacciones), y la capacidad máxima de las enzimas y de los transportadores (fijan el flujo máximo de las reacciones).

El análisis de balance de flujos es una técnica predictiva basada en restricciones en la que se considera que el comportamiento microbiano es óptimo para una dada función objetivo y, por ende, la distribución óptima de flujos se calcula siguiendo una rutina de optimización [13]. En términos matemáticos, se requiere resolver el siguiente problema de optimización lineal:

$$\begin{aligned} \text{máx.} \quad & Z = wv, \\ \text{sujeto a} \quad & Sv = 0, \\ & v_{min} \leq v \leq v_{max} \end{aligned} \quad (7)$$

donde  $w$  es el vector de coeficientes que define a la función objetivo ( $Z$ ) como una combinación lineal de los  $v_i$ . Los vectores  $v_{min}$  y  $v_{max}$  contienen las cotas mínimas y máximas para cada una de las reacciones. Esto permite incorporar información de las restricciones conocidas en los flujos (por ej. limitaciones en los flujos de entrada, de salida y de intercambio) y también indicar las reacciones que son irreversibles. La función objetivo utilizada en la definición del problema (7) puede ser una reacción o una combinación lineal de reacciones del modelo. En particular, la función objetivo más utilizada es la denominada ecuación de biomasa, ya que permite hacer predicciones consistentes con los datos experimentales [13]. Otras funciones objetivo que se pueden emplear para evaluar las capacidades de la red metabólica son: producción de ATP, la tasa de consumo de un determinado nutriente y la producción del metabolito de interés, entre otros [10]. También es posible realizar el cálculo de rendimientos, definidos como el cociente entre dos flujos de interés, para las condiciones impuestas por el usuario.

A diferencia del análisis predictivo obtenido por FBA, el análisis por modos elementales (EM) determina la potencialidad o capacidad del microorganismo, dicho de otro modo, todos los fenotipos que pueden ser expresados. Cada EM representa la ruta más simple, estequiométricamente y termodinámicamente posible, para la conversión de sustratos en productos [13].

### 2.3.- Metodología.

Las simulaciones fueron realizadas empleando el toolbox COBRA para Matlab [15]. El modelo metabólico de *R. toruloides* presentado en [12] fue cargado en el formato de datos adecuado con ayuda de la aplicación rBioNet [16]. Las soluciones de ecuación (7) fueron obtenidas con el solver glpk [17]. La matriz de modos elementales, utilizada para calcular los rendimientos óptimos reportados en [12], fue obtenida utilizando METATOOL 5.0 [18].

### 2.4.- Mejoras propuestas.

Para lograr predecir el comportamiento del microorganismo *in vivo*, algunas mejoras se han propuesto al modelo original [12]. En principio, no contempla la incorporación de nitrógeno, ya que la fórmula de biomasa solamente incluye la asimilación de C. Debido a ello, con el modelo actual sólo es posible calcular el rendimiento máximo de TAG, que es aquel en el cual no hay formación de biomasa, y viceversa. Por ende, no es posible un sistema donde coexistan biomasa y el producto de interés. Debido a ello, se contempla una disparidad entre los resultados predichos *in silico* de los valores experimentales reportados en dicho paper [12].

Para la incorporación de la asimilación de nitrógeno en el presente modelo, se incluyeron los aminoácidos glutamato (GLUT) y glutamina (GLUM) como precursores metabólicos en la fórmula de la biomasa. Para ello, se tomó como referencia la composición de aminoácidos en *S. cerevisiae* del trabajo [19] de donde se basaron para estimar el resto de los precursores presentes en la ecuación de biomasa utilizada por Bomareddy *et al.* Para estimar el flujo de ingreso de nitrógeno, se empleará una relación C/N (molar) reportada como óptima para la producción de lípidos [20].

Por otro lado, debido a que el modelo no fija un valor mínimo de mantenimiento no asociado al crecimiento, se sobreestima la producción de TAG. Para estimar el valor mínimo de ATPM para un determinado sustrato, se calcula el requerimiento de ATP para el mantenimiento no asociado al crecimiento (NGAM). Este puede determinarse a partir del coeficiente de mantenimiento celular, de la siguiente forma:

$$NGAM = m_s * y_{ATP/S} \quad (8)$$

donde  $y_{ATP/S}$  es el rendimiento máximo teórico de ATP y puede calcularse maximizando la reacción ATPM mediante FBA, para una tasa de ingreso de glucosa de  $-1 \text{ mmol/g h}$  [10]. Por otro lado, para la estimación del mantenimiento celular ( $m_s$ ), se emplearon los datos experimentales de Shen *et al.* [11].

### 3.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1.- Estimación de rendimientos máximos.

A partir del mapa metabólico de *R. toruloides*, Bommarreddy *et al.* [12] calcularon los rendimientos máximos de TAG en diferentes fuentes de carbono (glucosa, glicerol, xilosa y arabinosa), mediante la relación entre los flujos (expresados como velocidades específicas) de TAG y sustrato (9), obtenidos por EM.

$$y_{TAG/S} = \frac{q_{TAG}}{q_S} \quad (9)$$

En el presente trabajo, se empleó el modelo original para calcular los flujos por FBA y poder comparar los rendimientos calculados, con los obtenidos en el trabajo anteriormente citado. Para llevar a cabo el cálculo de los flujos óptimos se utilizó como función objetivo la producción de TAG (2) y se maximizó dicha función. Bajo estas circunstancias, la producción de biomasa es nula, lo cual es acorde a la definición de rendimiento máximo. De manera análoga, se procedió a determinar el rendimiento máximo en biomasa, reemplazando la función objetivo por la reacción de crecimiento microbiano. En este caso, al maximizar la producción de biomasa, la producción de TAG resultó nula. Los resultados obtenidos, y los reportados previamente [12], se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento máximo de TAG y biomasa respecto a diferentes FC.

Fuente de carbono	$y_{TAG/S}$ (Cmol <sub>TAG</sub> /Cmol <sub>S</sub> )		$y_{X/S}$ (Cmol <sub>X</sub> /Cmol <sub>S</sub> )	
	EM [12]	FBA	EM [12]	FBA*
Glucosa	0,58	0,578	0,67	0,669
Glicerol	0,63	0,628	0,73	0,727
Xilosa	0,55	0,552	0,66	0,647
Arabinosa	0,53	0,526	0,63	0,616

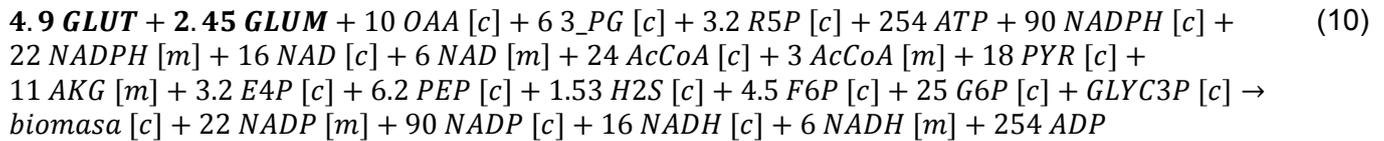
\* peso por Cmol calculado a partir de la composición elemental de *R. toruloides* [2,21,22].

Se logró una muy buena correlación entre los datos reportados por Bommarreddy *et al.*[12] y los obtenidos por FBA. La similitud entre estos resultados demuestra que FBA es una herramienta útil para determinar la potencialidad máxima del microorganismo, tanto para su crecimiento como para la producción de TAG. El conocimiento de esta potencialidad nos brinda la cota superior real de la cantidad de producto y biomasa que podemos obtener. Estos rendimientos son significativamente menores a los rendimientos máximos teóricos calculados a partir de los grados de reducción de los sustratos respecto a los productos que deseamos obtener y, es por ello que su cálculo resulta valioso.

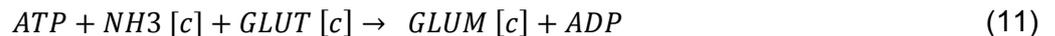
#### 3.2.- Predicción del rendimiento real de TAG en las condiciones de cultivo establecidas.

Si bien los cálculos anteriores permiten definir la potencialidad del microorganismo para producir TAG, dichos valores raramente pueden alcanzarse ya que el microorganismo ante todo prevalecerá el crecimiento. Solamente en condiciones donde un nutriente esencial para el crecimiento se agote, puede acumular el carbono remanente en forma de TAG. Es por esta razón que normalmente en medios con sustratos fácilmente asimilables como la glucosa, los rendimientos en TAG obtenidos experimentalmente suelen ser mucho menores a los rendimientos máximos predichos. En Bommarreddy *et al.*[12], se presentan los datos experimentales obtenidos a partir del cultivo de glucosa como única fuente de carbono y energía. El rendimiento obtenido experimentalmente fue de  $0,229 \text{ Cmol}_{TAG}/\text{Cmol}_S$ , ~40% del valor máximo calculados por EM y FBA.

Para lograr predecir el comportamiento *in vivo* del microorganismo en las condiciones de cultivo, se agregaron dos precursores a la fórmula original de biomasa (GLUT y GLUM), los cuales incorporan la asimilación de nitrógeno, ausente en el modelo original. A partir de esta modificación, la ecuación de biomasa queda representada de la siguiente manera:



Ambos precursores derivan del  $\text{NH}_3$  incorporado a la célula y se producen a partir de las enzimas glutamina sintetasa (GLN1) y glutamato sintetasa (GLT1), de la siguiente manera:



Adicionalmente, la energía consumida para mantenimiento no asociado al crecimiento (NGAM) se calculó a partir de la ecuación (8). Por un lado, el rendimiento máximo de ATP en glucosa ( $y_{\text{ATP/S}}$ ) se determinó por FBA, resultando en un valor de 18,4  $\text{mmol}_{\text{ATP}}/\text{mmol}_s$ . En cuanto al mantenimiento celular (ms) tiene un valor de 5.7 mg/g h, según datos experimentales de Shen et al. [11]. De esta manera, el NGAM resulta ser de 0.583  $\text{mmol}_{\text{ATP}}/\text{g h}$ . Luego, este valor es incorporado en el modelo como la restricción inferior del flujo de ATPM.

Con estas modificaciones se simuló el cultivo de *R. toruloides* en un medio limitado en nitrógeno, con una relación C/N (moles) igual a 100. Si bien se empleó como función objetivo la producción de TAG, teniendo en cuenta que el microorganismo tratará de asimilar toda la glucosa que hay en el medio y a su vez priorizará su crecimiento, se fijaron las restricciones estequiometrias en un valor constante tanto para la asimilación de fuente de carbono (FC), como de nitrógeno (FN). De este modo, se optimizó indirectamente la tasa de ingreso de glucosa ( $q_s$ ) así como también la tasa de crecimiento ( $\mu$ ). Los resultados de las simulaciones empleando glucosa como FC, se muestran a continuación:

Tabla 2. Contraste entre los rendimientos lipídicos obtenidos con glucosa como FC.

$y_{\text{TAG/S}}$	( $\text{Cmol}_{\text{TAG}}/\text{Cmol}_s$ )
Máximo EM [12]	0,58
Máximo FBA	0,578
Experimental [12]	0,229
Predicho FBA	0,232

A partir de la incorporación de la asimilación de nitrógeno y de un valor de ATPM en el modelo de *R. toruloides*, se lograron obtener resultados muy similares a los experimentales. En este sentido, FBA no sólo constituye una alternativa a EM como método de estimación de rendimientos máximos, sino que también permite predecir el comportamiento del microorganismo en un entorno real, donde el crecimiento y la producción de TAG coexisten.

#### 4.-CONCLUSIONES

La aplicación de FBA para la optimización de la producción de TAG logró estimar resultados similares que la técnica de EM en lo que refiere a rendimientos máximos y también permitió analizar las capacidades de la red metabólica en diferentes condiciones. Éstas fueron simuladas a partir de la modificación de las cotas en las reacciones, la incorporación del metabolismo del nitrógeno y el gasto energético por mantenimiento no asociado al crecimiento. De esta forma, FBA logró predecir el comportamiento microbiano en un entorno real, transformándose en una herramienta útil a la hora de encarar un estudio metabólico, ya que posibilitaría el ahorro de recursos económicos y tiempo, ambos de gran importancia en la industria biotecnológica.

Futuros estudios estarán dirigidos a la validación experimental del modelo propuesto en diversos sistemas de cultivo y al estudio de la influencia de los componentes extracelulares en la producción de TAG (e.g. limitación por oxígeno).

## 5.-AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por proyectos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2014-2394), CONICET (PIP 112-201501-00837) y la Universidad Nacional de La Plata (Proyecto I216).

## 6.-REFERENCIAS

- [1] Faife-Pérez, E. *et al.* (2012). Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable. Parte I. Levaduras y bacterias. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46(1):22-32.
- [2] Koutinas, A. A. *et al.* (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, 116:566-577.
- [3] Li, Q. *et al.* (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(5):749-756.
- [4] Tanimura, A. *et al.* (2014). Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresource technology*, 153:230-235.
- [5] Zhao, X., Hu, C., Wu, S., Shen, H., & Zhao, Z. K. (2011). Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(5), 627-632.
- [6] Li, Y., Zhao, Z. K., & Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and microbial technology*, 41(3):312-317.
- [7] Wiebe, M. G., Koivuranta, K., Penttilä, M., & Ruohonen, L. (2012). Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC biotechnology*, 12(1):1.
- [8] Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X., & Zhao, Z. K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource technology*, 101(15):6124-6129.
- [9] Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., & Zhao, Z. K. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource technology*, 102(2):1803-1807.
- [10] Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis?. *Nature biotechnology*, 28(3):245-248.
- [11] Shen, H., Gong, Z., Yang, X., Jin, G., Bai, F., & Zhao, Z. K. (2013). Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of biotechnology*, 168(1):85-89.
- [12] Bommarreddy, R. R., Sabra, W., Maheshwari, G., & Zeng, A. P. (2015). Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microbial cell factories*, 14(1):1.
- [13] Llaneras, F., & Picó, J. (2008). Stoichiometric modelling of cell metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(1): 1-11.
- [14] Gruchattka, E., Hädicke, O., Klamt, S., Schütz, V., & Kayser, O. (2013). In silico profiling of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* as terpenoid factories. *Microbial cell factories*, 12(1):1.
- [15] Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R. M., Thiele, I., Orth, J. D., Feist, A. M., ... & Kang, J. (2011). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nature protocols*, 6(9):1290-1307.
- [16] Thorleifsson, S. G., & Thiele, I. (2011). rBioNet: A COBRA toolbox extension for reconstructing high-quality biochemical networks. *Bioinformatics*, 27(14):2009-2010.
- [17] GLPK (GNU Linear Programming Kit). <https://www.gnu.org/software/glpk> [Online; accessed 14-Dic-2016].
- [18] Von Kamp, A., & Schuster, S. (2006). Metatool 5.0: fast and flexible elementary modes analysis. *Bioinformatics*, 22(15):1930-1931.
- [19] Gombert, A. K., dos Santos, M. M., Christensen, B., & Nielsen, J. (2001). Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *Journal of bacteriology*, 183(4):1441-1451.
- [20] Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., & Marc, I. (2002). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of applied microbiology*, 92(4):737-744.
- [21] Zhou, W., Li, Y., Zhang, Y., & Zhao, Z. (2011). Energy efficiency evaluation of lipid production by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 108(1):119-126.
- [22] Cescut, J., Fillaudeau, L., Molina-Jouve, C., & Uribelarrea, J. L. (2014). Carbon accumulation in *Rhodotorula glutinis* induced by nitrogen limitation. *Biotechnology for biofuels*, 7(1):1.