



ARTIGO

## Avaliação da síntese de lipídeo pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33 em meio de cultura com glicose e sulfato de amônio

Priscila Dallé da Rosa<sup>1</sup>, Paula Mattanna<sup>2</sup> e Patricia Valente<sup>1,3\*</sup>

Recebido: 3 de outubro de 2014    Recebido após revisão: 23 de maio de 2015    Aceito: 13 de abril de 2015  
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3175>

**RESUMO:** (Avaliação da síntese de lipídeo pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33 em meio de cultura com glicose e sulfato de amônio). Óleo microbiano pode ser considerado uma fonte de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs). Em trabalhos prévios, foi demonstrado que a levedura *Candida zeylanoides* QU 33 produziu uma grande quantidade de MUFAs e PUFAs em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio. O presente trabalho objetivou determinar os melhores parâmetros para o acúmulo de lipídeos pela levedura *C. zeylanoides* QU 33, sabendo-se que a razão carbono nitrogênio (C:N) nos meios de cultivo, assim como o pH e a temperatura de incubação são os parâmetros que mais influenciam a produção de lipídios microbianos. Para a otimização, foi aplicada a Metodologia de Superfície de Resposta, aplicando os níveis das variáveis temperatura (20 a 28 °C), pH (6,0 a 8,0) e concentração de glicose (8 a 20 % p/v). Apesar de nenhuma das variáveis ter tido influência significativa, houve tendência a um maior acúmulo de lipídeos em altas concentrações do açúcar (acima de 16%), temperaturas medianas (23-26 °C) e pH neutro.

**Palavras-chave:** Sulfato de amônio, óleo microbiano, delineamento composto central.

**ABSTRACT:** (Evaluation of lipid synthesis by yeast *Candida zeylanoides* QU 33 in culture medium with glucose and ammonium sulfate). Microbial oil can be considered a source of monounsaturated (MUFAs) and polyunsaturated (PUFAs) fatty acids. Previous research has shown that the yeast *Candida zeylanoides* QU 33 produces large amounts of MUFAs and PUFAs in culture media containing glucose as carbon source and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as nitrogen source. This study aimed to determine the best parameters for the accumulation of lipids by *C. zeylanoides* QU 33, knowing that the carbon-to-nitrogen ratio (C:N) in the culture media, as well as pH and temperature, are the parameters that most affect the production of microbial lipids. For optimization, the Response Surface Methodology was applied, using levels of the variables temperature (20-28 °C), pH (6.0 to 8.0), and glucose concentration (08-20 % w/v). Although no variable showed significant influence, there was a tendency towards lipid accumulation under conditions of high sugar concentrations (above 16%), mid temperatures (23-26 °C) and neutral pH.

**Keywords:** ammonium sulfate, central composite design, microbial oil.

### INTRODUÇÃO

O efeito benéfico dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs) encontrados no azeite de oliva, óleo de soja, canola, entre outros, é a contribuição para a diminuição do risco de doenças cardiovasculares. Uma dieta rica em MUFAs (ácido oleico, por exemplo) conduz a uma redução da glicose e da pressão arterial e aumenta os níveis do colesterol HDL (Gillingham *et al.* 2011). Os ácidos graxos ômega-3 (PUFAs) podem proteger contra várias doenças, como cardiovasculares, psiquiátricas, neurológicas, dermatológicas e reumatológicas (Assy *et al.* 2009). Atualmente, os organismos marinhos (peixes, frutos do mar e algas) são considerados uma importante fonte de PUFAs, mas possuem o inconveniente de poderem conter vários contaminantes ambientais, como metais pesados (mercúrio, especialmente, e cádmio), pesticidas e outras substâncias perigosas a que estão expostos na água do mar (Stroescu *et al.* 2013).

As leveduras são microrganismos tradicionalmente utilizados em processos fermentativos. Algumas espécies,

como *Lipomyces starkeyi*, acumulam até aproximadamente 70% do peso seco em lipídeos (Angerbauer *et al.* 2008). O alto teor de lipídeos produzidos, aliado à grande produtividade em biomassa, torna as leveduras excelentes candidatas para a produção de óleo microbiano para diversas finalidades (Poli *et al.* 2013, 2014, Mattana *et al.* 2014), tais como surfactantes naturais, nutracêuticos, biocombustíveis, insumos na indústria de alimentos e de cosméticos de modo geral (Vasudevan & Briggs 2008). Dessa forma, estudos estão focados na maximização da produção do óleo por esses microrganismos (Tai & Stephanopoulos 2013).

De cerca de 600 espécies de leveduras, apenas 5 % foram relatadas como capazes de acumular mais do que 25% da sua biomassa seca como lipídeos (Dey & Maiti 2013). Entre elas, a mais extensivamente estudada é a levedura oleaginosa *Yarrowia lipolytica*, que é capaz de acumular grandes quantidades de lipídeos (em alguns casos, mais de 50% do seu peso seco) (Beopoulos *et al.* 2009). A síntese de lipídeos também tem sido estudada em outras leveduras oleaginosas, como *Rhodospiridium*

1. PPGMAA - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil.

3. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Sarmiento Leite, 500, sala 154, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

\* Autor para contato. E-mail: [patricia.valente@ufrgs.br](mailto:patricia.valente@ufrgs.br)

*toruloides* (Zhu et al. 2012) e *Rhodotorula glacialis* (Amaretti et al. 2010), além da levedura não oleaginosa *Saccharomyces cerevisiae* (Daum et al. 2007). Porém a expansão do número de espécies estudadas é necessária para que haja um melhor conhecimento do metabolismo associado à síntese de lipídeos em leveduras.

Apesar da espécie *Candida zeylanoides* não ser reportada na literatura como oleaginosa, em trabalhos prévios foi observado que a cepa QU33 produziu uma grande quantidade de ácidos graxos mono e poli-insaturados em meio de cultura contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio (Rosa et al. 2014). Neste contexto, o objetivo do trabalho foi otimizar a produção de lipídeo pela levedura *C. zeylanoides* QU33, utilizando glicose como fonte de carbono e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio. Para tanto, foi aplicada a Metodologia de Superfície de Resposta em um planejamento fatorial completo com três variáveis independentes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismo

A levedura *C. zeylanoides* QU 33 (UFMG-CM-Y331), utilizada no presente trabalho, foi isolada de queijo colonial da região litorânea do estado do Rio Grande do Sul (Landell et al. 2006). A cepa foi mantida por meio de sub-cultivo mensal em tubos com agar GYP (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, agar 2%).

### Pré-inóculo

Para obtenção de biomassa metabolicamente ativa, as leveduras foram cultivadas em placas de agar GYP, com incubação por 24h a 25 °C. A partir deste cultivo, as células foram inoculadas em 50 mL de meio A (10% Glicose, 0,1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05% de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  p/v), em Erlenmeyers de 125 mL. Esse pré-inóculo foi incubado a 25 °C e 150 rpm por 40h e o crescimento celular foi avaliado por meio da absorbância a 600nm.

### Condições de Cultura

O experimento foi conduzido em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de meio S (Glicose conforme a Tab. 1, 0,05%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  p/v). Neste meio de cultura foi adicionado 10% do pré-inóculo, que foi incubado em agitador horizontal (IKA, KS 4000), a 25 °C e 150 rpm, durante 120 horas. A razão C:N foi calculada a partir quantidade de gramas de glicose em relação a quantidade de gramas de sulfato de amônio.

**Tabela 1.** Valores reais e codificados das variáveis independentes e seus diferentes níveis utilizados para a otimização da produção de óleo microbiano pela levedura *Candida zeylanoides* QU33.

Variáveis	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	X1	20	21,6	24	26,4	28
pH	X2	6	6,4	7	7,6	8
Glicose (%)	X3	8	11,6	14	16,5	20

### Metodologia de Superfície de Resposta

Para identificar as condições ideais para o acúmulo de lipídeo na levedura QU33 em meio S, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta (MSR) com delineamento composto central (DCC). Para a realização do DCC, foi utilizado um planejamento fatorial  $2^3$ , com adição de pontos axiais e pontos centrais, totalizando 5 níveis analisados para cada um dos três fatores testados. Os fatores avaliados (variáveis independentes) foram diferentes condições de temperatura (20 a 28 °C), pH (6,0 a 8,0) e concentração de glicose (8 a 20 % p/v), enquanto as variáveis de resposta foram produção de biomassa e conteúdo de lipídios. As variáveis independentes temperatura, pH e concentração de glicose foram selecionadas após experimentos preliminares nos quais foram testadas em conjunto com outros fatores, como agitação e tempo de incubação, e demonstraram ter uma maior influência no acúmulo de lipídeo (dados não mostrados).

Os experimentos foram projetados usando o Programa STATISTICA Trial version 7.0, sendo que cada variável foi testada em cinco níveis diferentes codificados:  $-\alpha$  (1,68), baixo (1), médio (0), e alta (1),  $+\alpha$  (1,68) (Tab. 1). Foram realizados 17 experimentos (Tab. 2), com cinco repetições no ponto central. Para predição do ponto ótimo, um modelo de segunda ordem foi ajustado para correlacionar as variáveis independentes e as respostas (Equação 1, abaixo),

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j}^{3-1} \sum_{j>i}^3 \beta_{ij} x_i x_j$$

onde Y é a resposta predita,  $\beta_0$  é o intercepto, e  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  são os coeficientes linear, quadrático e de interação, respectivamente.  $x_i$  e  $x_j$  representam as variáveis independentes.

A significância estatística do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher (teste F). A qualidade da equação do modelo gerado foi avaliada estatisticamente pelo coeficiente  $R^2$ . A equação polinomial ajustada foi então expressa na forma de gráficos de contorno tridimensionais, para ilustrar a relação entre as respostas e os níveis experimentais de cada variável independente.

### Determinações da biomassa

Para a análise gravimétrica, 100 mL de culturas foram transferidos para um tubo cônico com capacidade de 50 mL e centrifugados a 6.000 rpm durante 5 minutos para remover o sobrenadante. Em seguida, foi realizada a lavagem com 15 mL de água estéril, repetindo o processo por duas vezes. As amostras de biomassa foram armazenadas durante 24 h, a - 30 °C no freezer Indrel® CLC300DAF e liofilizadas no Liotop L 1001, a - 48 °C, durante 24 h. Os sedimentos de células liofilizadas foram pesados em balança analítica Shimadzu AY220.

### Extração de lipídeo

Os lipídeos foram extraídos a partir da biomassa liofilizada das leveduras de acordo com Bligh & Dyer

**Tabela 2.** Matriz do desenho experimental com as respostas observadas para biomassa e lipídeos, previstas para lipídeo, rendimento de biomassa e de lipídeo a partir da conversão de glicose.

Exp.	T (°C)	pH	Glicose %	X Observado (g/L)	L Observado (g/L)	L Predito (g/L)	Lipídeo Residual (g/L)	L/X (g/g)	Y X/Glc (g/g)	Y L/Glc (g/g)
1	-1	-1	-1	2,97	0,017	0,065	-0,048	0,006	0,0256	0,0001
2	1	-1	-1	3,05	0,070	0,080	-0,010	0,023	0,0265	0,0006
3	-1	1	-1	3,23	0,020	0,070	-0,050	0,006	0,0279	0,0002
4	1	1	-1	3,28	0,076	0,096	-0,019	0,023	0,0285	0,0007
5	-1	-1	1	3,40	0,043	0,056	-0,013	0,013	0,0206	0,0003
6	1	-1	1	3,05	0,108	0,092	0,016	0,035	0,0185	0,0007
7	-1	1	1	3,45	0,077	0,100	-0,022	0,022	0,0209	0,0005
8	1	1	1	3,68	0,162	0,148	0,015	0,044	0,0223	0,001
9	-1,68	0	0	4,02	0,114	0,051	0,063	0,028	0,0288	0,0008
10	1,68	0	0	2,67	0,086	0,103	-0,017	0,032	0,0191	0,0006
11	0	-1,68	0	2,53	0,061	0,044	0,017	0,024	0,0181	0,0004
12	0	1,68	0	2,99	0,123	0,093	0,030	0,041	0,0374	0,0015
13	0	0	-1,68	3,00	0,135	0,135	0,100	0,045	0,015	0,0007
14	0	0	1,68	3,93	0,138	0,138	0,152	0,035	0,0281	0,001
15	0	0	0	3,25	0,140	0,140	0,126	0,043	0,0232	0,001
16	0	0	0	3,05	0,125	0,125	0,126	0,041	0,0218	0,0009
17	0	0	0	3,23	0,130	0,130	0,126	0,040	0,0231	0,0009

Abreviaturas: Exp., experimento; X, biomassa (g/L); L, quantidade de lipídeos (g/L); L/X, Lipídeo/Biomassa (g/g); YX, Rendimento de biomassa a partir de glicose (X/Glc); YL, Rendimento de lipídeo a partir de glicose (L/Glc).

(1959). A biomassa foi ressuspensa em clorofórmio/metanol (2:1, v/v), e a lise celular foi obtida com auxílio do homogeneizador T 18 BASIC ULTRA- TURRAX® / IKA por 3 min, com intervalos a cada minuto para refrigeração em gelo de forma a evitar o aquecimento dos lipídeos. A lise foi seguida por filtração em papel filtro (MN - 615, Macherey - Nagel) e os solventes foram removidos utilizando um Rotaevaporador (Laborota 4000eco, Heidolph) a 60 ° C. As amostras foram secas a 60°C por 24h até peso constante e pesadas em balança analítica Shimadzu AY220.

#### Dosagens da glicose residual

A concentração de glicose residual foi medida utilizando o kit Labtest Glicose-GOD em OD505 com um espectrofotômetro (UV-VIS UV SP2000, Spectrum).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores com a levedura *C. zeylanoides* QU33, foi observado que havia produção de lipídeos com alto teor de ácidos graxos insaturados em meio contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio (meio S), predominando os ácidos oleico (18:1) e linoleico (18:2) (Rosa *et al.* 2014). Infelizmente, o rendimento de biomassa e de lipídeos não foram adequados. No presente trabalho, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para otimizar as condições de cultivo (temperatura), composição do meio de cultura (razão C:N, decorrente de alteração na concentração de glicose utilizada) e pH, com o objetivo de melhorar o rendimento de biomassa e lipídeos produzidos por esta levedura. Estes fatores foram selecionados porque são reportados na literatura como sendo influentes para a produção de lipídeos (e.g. Zhang *et al.* 2011, Sitepu *et al.* 2013).

#### Metodologia de Superfície de Resposta

Inicialmente, foi utilizado um modelo de 1ª ordem para

avaliar a relação entre as variáveis respostas e as variáveis independentes, porém não houve ajuste do modelo (dados não mostrados). Sendo assim, foi avaliado um modelo de superfície de resposta de segunda ordem, conforme a Equação 1. A Tabela 2 apresenta a matriz do desenho experimental com as respostas observadas e previstas para os lipídeos, os valores observados para biomassa, além dos rendimentos de biomassa e de lipídeo em relação ao substrato (glicose) disponibilizado. As produções máximas de biomassa e de lipídeo pela levedura *C. zeylanoides* QU33 obtidas experimentalmente foram 4,02 g/L (experimento 9) e 0,16 g/L (experimento 8), respectivamente. Tivemos uma variação na produção de biomassa de 2,53 g/L a 4,02 g/L, enquanto a quantidade de lipídeo variou de 0,02 g/L a 0,16 g/L entre os experimentos; esses valores equivalem a um incremento de mais de 60% na produção de biomassa e 700% na produção de lipídeos. As condições do experimento 8 (26,4 °C, pH 7,6 e 16,5% de glicose) foram as melhores observadas para acúmulo de lipídeos, apresentando um valor residual de 0,015g/L de lipídeos em relação ao valor predito com a metodologia de superfície de resposta. Os pontos centrais, que são uma triplicata, tiveram uma pequena diferença dos seus valores residuais, sendo mínima a diferença do valor experimental em relação ao teórico do planejamento, confirmando que os valores obtidos são confiáveis (Tab. 2).

Os efeitos dos parâmetros testados (temperatura, pH e concentração de glicose) na produção de biomassa e de lipídeos podem ser vistos nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Nestas tabelas estão demonstrados os efeitos lineares, quadráticos e da interação entre os fatores, segundo a equação 1, além da significância estatística de cada efeito. Como nenhum dos efeitos apresentou  $p < 0,05$ , pode-se concluir que, apesar de termos tido acréscimo na quantidade de biomassa e de lipídeos em alguns dos experimentos, nenhum dos parâmetros avaliados apresentou efeito significativo ao nível de significância de

**Tabela 3.** Dados experimentais para a produção de biomassa e valores reais para as variáveis independentes utilizados no planejamento fatorial completo.

Fator	SS <sup>a</sup>	df <sup>b</sup>	MSS <sup>c</sup>	F	p <sup>d</sup>
X1: Temperatura linear	0,37	1,00	0,37	3,83	0,09
X1: Temperatura quadrática	0,07	1,00	0,07	0,75	0,42
X2: pH linear	0,28	1,00	0,28	2,83	0,14
X2: pH quadrática	0,16	1,00	0,16	1,69	0,23
X3: Glicose linear	0,56	1,00	0,56	5,80	0,05
X3: Glicose quadrática	0,11	1,00	0,11	1,15	0,32
X1xX2	0,04	1,00	0,04	0,38	0,56
X1xX3	0,01	1,00	0,01	0,07	0,79
X2xX3	0,00	1,00	0,00	0,04	0,84
Erro	0,68	7,00	0,10		
Total soma dos quadrados	2,47	16,00			

ANOVA; Var.:Biomassa (g/L); R<sup>2</sup>=0,72416; 17 experimentos; MS Residual=,0972782

SS<sup>a</sup>: Soma dos quadrados

DF<sup>b</sup>: Graus de liberdade

MSS<sup>c</sup>: Média da soma dos quadrados

p<sup>d</sup>: < 0,05 são considerados significativos

95%, tanto isoladamente quanto nas interações entre os parâmetros. Apesar dos efeitos testados não terem sido significativos, foram gerados gráficos de contorno para avaliar as condições de cultivo que pudessem favorecer a produção de lipídeos pela levedura *C. zeylanoides* QU33 (Figs. 1A-C). Quando a interação das variáveis pH e temperatura foi avaliada, houve produção de lipídeos (g/L) em uma ampla faixa dos parâmetros, indicando que os valores de pH e temperaturas testados foram adequados e que diferentes combinações entre estes parâmetros podem ser utilizadas para o cultivo de *C. zeylanoides* QU33 com a finalidade de obtenção de óleo (Fig. 1A). Quando as interações entre a variável concentração de glicose com o pH (Fig. 1B) e com a temperatura (Fig. 1C) foram avaliadas, houve tendência a um maior acúmulo

**Tabela 4.** Dados experimentais para a produção do óleo microbiano e valores reais para as variáveis independentes utilizados para o planejamento fatorial completo.

Fator	SS <sup>a</sup>	df <sup>b</sup>	MSS <sup>c</sup>	F	p <sup>d</sup>
X1: Temperatura linear	0,003	1,000	0,003	1,706	0,233
X1: Temperatura quadrática	0,003	1,000	0,003	1,656	0,239
X2: pH linear	0,003	1,000	0,003	1,556	0,252
X2: pH quadrática	0,004	1,000	0,004	2,273	0,175
X3: Glicose linear	0,002	1,000	0,002	1,167	0,316
X3: Glicose quadrática	0,000	1,000	0,000	0,000	0,998
X1xX2	0,000	1,000	0,000	0,034	0,859
X1xX3	0,000	1,000	0,000	0,127	0,732
X2xX3	0,001	1,000	0,001	0,401	0,547
Erro	0,014	7,000	0,002		
Total soma dos quadrados	0,030	16,000			

ANOVA; Var.: Lipídeo (g/L); R<sup>2</sup>=0,55572; 17 experimentos; MS Residual=,0019329

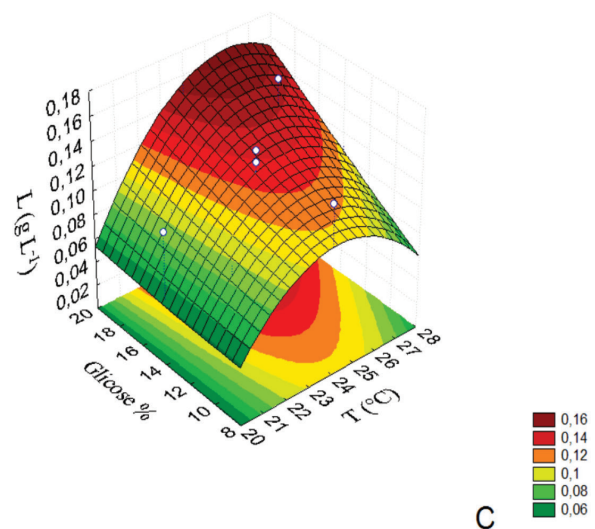
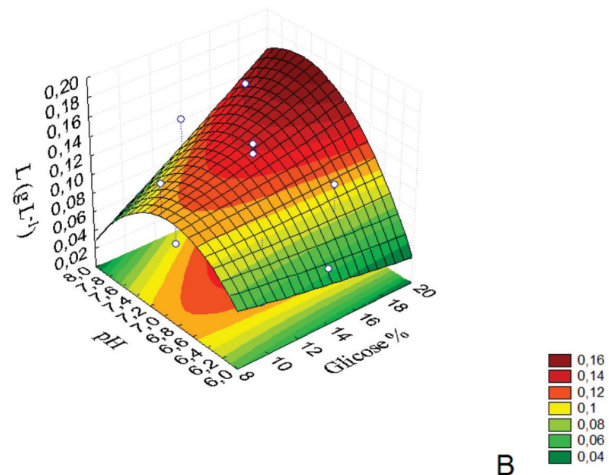
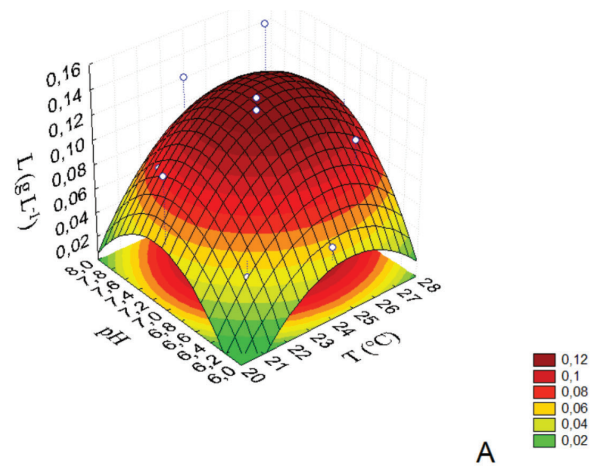
SS<sup>a</sup>: Soma dos quadrados

df<sup>b</sup>: Graus de liberdade

MSS<sup>c</sup>: Média da soma dos quadrados

p<sup>d</sup>: < 0,05 são considerados significativos

de lipídeos em altas concentrações do açúcar (acima de 16%), temperaturas medianas (23-26°C) e pH neutro. Esse resultado está de acordo com a literatura, que relata



**Figura 1.** Efeito na produção de óleo microbiano pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33 cultivada em meio S por 120 h e 150rpm: Acúmulo de óleo microbiano com os fatores temperatura x pH (A), pH x glicose (B) e temperatura x glicose (C). Os círculos brancos correspondem aos pontos experimentais utilizados para a construção da superfície de resposta.

que um dos fatores mais importantes para produção de lipídeos por leveduras é a razão C:N (Zhang *et al.* 2011, Sitepu *et al.* 2013), que é determinada pela concentração das fontes de carbono e de nitrogênio no meio de cultura. Na condição experimental ótima avaliada no presente estudo (experimento 8), por exemplo, a razão C:N foi de 330:1 com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio. Em um estudo anterior usando peptona como fonte de nitrogênio, a razão C:N que resultou no maior acúmulo de lipídeos pela *C. zeylanoides* QU33 foi 200:1 (Rosa *et al.* 2014), demonstrando que a razão C:N ideal é dependente do tipo de fonte de nitrogênio utilizada.

Em conclusão, a metodologia de superfície de resposta permitiu o desenvolvimento de um modelo polinomial de segunda ordem empírico para a previsão da produção de biomassa e do conteúdo lipídico celular pela levedura *Candida zeylanoides* QU33 cultivada em glicose como fonte de carbono e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio. Foi possível identificar a condição ótima para a obtenção máxima de biomassa e de lipídios. No experimento com a temperatura, pH e concentração de glicose ideais, foi obtido até 0,16 g/L de lipídeo.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e à FAPERGS (processo 11/2047-0), pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS

- AMARETTI A., RAIMOND S., SALA, M., RONCAGLIA L., LEONARDI A., & ROSSI, M. 2010. Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. *Microb Cell Fact*, 9: 73-78.
- ANGERBAUER, C., SIEBENHOFER, M., MITTELBACH, M., & GUEBITZ, G. M. 2008. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour Technol*, 99: 3051-3056.
- ASSY, N., NASSAR, F., NASSER, G., & GROSOVSKI, M. 2009. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 15: 1809-1815.
- BEOPOULOS, A., CHARDOT, T., & NICAUD, J.M. 2009. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91: 692-6.
- BLIGH, E.G. & DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37: 911-917.
- DAUM, G., WAGNER, A., CZABANY, T., & ATHENSTAEDT, K. 2007. Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. *Biochimie*, 89: 243-248.
- DEY, P., & MAITI, M. K. 2013. Molecular characterization of a novel isolate of *Candida tropicalis* for enhanced lipid production. *J Appl Microbiol*, 114: 1357-1368.
- GILLINGHAM, L. G., GUSTAFSON, J. A., HAN, S., JASSAL, D. S., & JONES, P. J. H. 2011. High-oleic rapeseed (canola) and flaxseed oils modulate serum lipids and inflammatory biomarkers in hypercholesterolaemic subjects. *British J Nutrition*, 1: 417-427.
- LANDELL, M.F., HARTFELDER, C. & VALENTE, P. 2006. Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Acta Sci Vet*, 34: 49-55.
- MATANNA P., ROSA, P.D., POLI, J. S., RICHARDS, N. S. P. S., DABOIT, T. C., SCROFERNEKER, M. L., PASTORE, A. P. W., CORCAO, G., BERTOLDI, F. C., DESCHAMPS, F. C., & VALENTE, P. 2014. Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. *R Bras Bioci*, 12: 121-126.
- POLI, J.S., DALLÉ, P., SENTER, L. MENDES, S. RAMIREZ, M., VAINSTEIN, M.H. & VALENTE, P. 2013. Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *R bras Bioci*, 11(2): 203-208.
- POLI, J.S., LÜTZHØFT, H.H., KARAKASHEV, D.B., VALENTE, P. & ANGELIDAKI, I. 2014. An environmentally-friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast. *Bioresour Technol*, 51: 388-391.
- ROSA, P. D., MATTANNA, P., CARBONI, D. S., AMORIM, L., RICHARDS, N., & VALENTE, P. 2014. *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. *Folia Microbiol*, 59:477-84.
- SITEPU, I.R., SESTRIC, R., IGNATIA, L., LEVIN, D., GERMAN, B., GILLIES, L.A., ALMADA L., & BOUNDY-MILLS K. 2013. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. *Bioresour Technol*, 144: 360-369 .
- STROESCU, M., STOICA-GUZUN, A., GHERGU, S., CHIRA, N., & JIPA, I. 2013. Optimization of fatty acids extraction from *Portulaca oleracea* seed using response surface methodology. *Ind Crops Prod*, 43: 405-411.
- TAI, M. & STEPHANOPOULOS, G. 2013. Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metab Eng*, 15:1-9.
- VASUDEVAN, P. T., & BRIGGS, M. 2008. Biodiesel production--current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35: 421-30.
- ZHANG J., FANG X., ZHU X., LI Y., XU H., ZHAO B., CHEN L., & ZHANG X. 2011. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. *Biomass Bioenerg*, 35: 1906-1911.
- ZHU, Z., ZHANG,S., LIU, H., SHEN, H., LIN, X., YANG, F., ZHOU, Y., JIN, G., YE, M., ZOU, H. & ZHAO, Z.K.. 2012. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nat Commun*, 3: 1112-1122.