

17TCQ. Modelizado metabólico de la producción biotecnológica de lípidos en cultivo continuo.

Metabolic modeling of lipid production in continuous cultures.

María Teresita Castañeda^{1,2}, Sebastián Nuñez², Fabricio Garelli², Claudio Voget¹, Hernán De Battista²

2. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI-CONICET-UNLP). 50 y 115, La Plata, Buenos Aires Argentina.
3. Grupo de Control Aplicado (GCA), Instituto de Investigaciones en Electrónica, Control y Procesamiento de Señales (LEICI-CONICET-UNLP). 48 y 116, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
E- mail: castaneda@biotec.quimica.unlp.edu.ar.

Resumen

Los lípidos microbianos son ampliamente estudiados como alternativa a los aceites vegetales para su empleo en la producción de biodiesel y la industria alimentaria. La producción a escala industrial requiere la utilización de cepas oleaginosas cultivadas en condiciones óptimas para la producción de lípidos. En este trabajo se empleó un modelo metabólico de *Rhodospiridium toruloides* para la optimización de la producción de lípidos en cultivo continuo empleando Análisis de Balance de flujos (FBA). A partir de datos experimentales, se calcularon parámetros que permitieron adicionar restricciones metabólicas al análisis. Una vez obtenidas las distribuciones de flujos y los valores óptimos de lípidos para diferentes diluciones y relaciones C/N, se contrastaron con información bibliográfica. Mediante el empleo del modelo metabólico se pudo simular los cambios bioquímicos que ocurren intracelularmente durante la lipogénesis. En cuanto a los resultados obtenidos mediante FBA, se logró una buena correlación para diluciones por debajo de 0,08 h⁻¹, la cual corresponde a relaciones C/N ≥ 20 Cmol/Nmol. Estos resultados indican que el modelo metabólico y la aplicación de FBA son muy útiles para predecir el comportamiento de *R. toruloides* durante el proceso de lipogénesis en cultivo continuo, con el consiguiente ahorro de tiempo y recursos económicos.

Palabras clave: Lípidos microbianos, FBA, modelo metabólico, *Rhodospiridium toruloides*.

Abstract

Microbial lipids are extensively studied as an alternative to vegetable oils for biodiesel production and food supplementation. The production of lipids at industrial scale requires the cultivation of oleaginous microorganisms in optimal conditions for lipid synthesis. In this work, a metabolic model of *Rhodospiridium toruloides* was used to optimize the lipid production using Flux Balance Analysis (FBA). The parameters used to constrain the number of solutions were calculated from experimental data. Then, flux distribution and FBA solutions at several dilution rates and C/N ratios were compared with reported data of continuous cultures. The metabolic model was effective to simulate the biochemical changes that occur under lipogenesis. Optimal solutions obtained by FBA were consistent with experimental data for dilution rates below 0,08 h⁻¹, corresponding to a C/N ratio of 20 Cmol/Nmol. These results indicate that the metabolic model along with the application of FBA is useful to predict lipid production in *R. toruloides* in continuous cultures, with the concomitant reduction of process time and resources.

Keywords: Microbial lipids, FBA, modelo metabólico, *Rhodospiridium toruloides*.

1. Introducción

Los lípidos microbianos o Single cell oils (SCOs) son lípidos obtenidos mediante el cultivo de microorganismos capaces de acumular más del 20% de su peso en lípidos (Economou *et al.*, 2011). Estos microorganismos, también conocidos como oleaginosos, poseen la maquinaria metabólica necesaria para canalizar el sobreflujo de fuente de carbono en lípidos (Papanikolaou y Aggelis, 2011). Los SCOs se acumulan intracelularmente en depósitos lipídicos, principalmente en forma de triglicéridos (TAG) (Ageitos *et al.*, 2011). El creciente interés por los SCOs radica en su potencial empleo como alternativa a los aceites vegetales para la producción de biodiesel (Faife-Pérez *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Koutinas *et al.*, 2014). Además, mediante la variación de los parámetros del proceso se puede modificar el perfil de ácidos grasos, siendo esto último de interés para su uso en la industria alimentaria (Xue *et al.*, 2013; Béligon *et al.*, 2016).

Para la producción a gran escala de SCOs se requiere de cepas fácilmente cultivables, versátiles en cuanto a sus requerimientos nutricionales, de elevado rendimiento lipídico, de bajo tiempo de duplicación celular y fáciles de escalar. Las levaduras oleaginosas han demostrado cumplir con la mayoría de los requisitos anteriores lo cual las vuelve muy atractivas para su aplicación industrial (Ageitos *et al.*, 2011). Entre ellas, *Rhodospodium toruloides* es muy prometedora ya que se ha demostrado que la cepa nativa puede acumular una elevada cantidad de TAG sumado a que puede crecer en diversas fuentes de carbono (Zhang *et al.*, 2016). A pesar de ser una cepa muy estudiada, la productividad lipídica es muy variable pudiendo ser entre el 20 al 70%, dependiendo de la calidad del medio de cultivo, las condiciones de cultivo, el sistema de operación de los biorreactores, etc. (Castañeda *et al.*, 2017). Esta variabilidad, sumada a la escasa información sobre el mecanismo de lipogénesis en *R. toruloides*, conlleva a que muchas veces se trabaje en condiciones subóptimas, con el perjuicio económico que esto implica.

El modelizado de las redes metabólicas basado en restricciones (CBM) permite estudiar y analizar el comportamiento microbiano bajo diferentes perturbaciones externas, como pueden ser cambios en el entorno (medio de cultivo) o modificaciones genéticas. Dentro de este campo de estudio, el Análisis de Balance de Flujos (FBA) es una técnica muy empleada, ya que permite predecir el comportamiento microbiano por medio de la optimización de una función objetivo elegida racionalmente (Llaneras y Picó, 2008). La precisión de las predicciones obtenidas depende en gran medida de la calidad del modelo metabólico empleado.

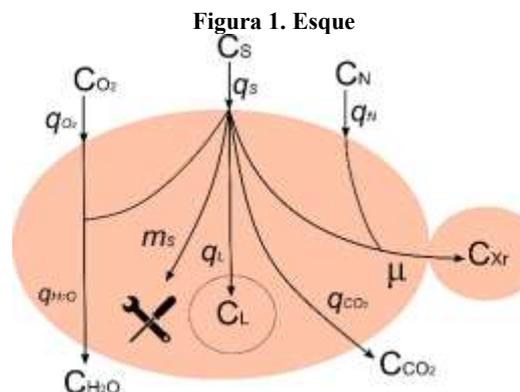
Nuestro grupo ha desarrollado recientemente un modelo metabólico a baja escala, el cual se basó en una reconstrucción previa (Bommareddy *et al.*, 2015) y ha pasado por un proceso de depuración exhaustivo (Castañeda *et al.*, 2017; Nuñez *et al.*, 2017). En este trabajo, se empleará dicho modelo para simular mediante FBA el proceso de lipogénesis en un cultivo continuo y predecir los rendimientos óptimos que pueden alcanzarse en estas condiciones.

2. Materiales y métodos

2.1 Modelizado cinético del proceso de lipogénesis en cultivo continuo.

Para calcular los parámetros de proceso que permitieron adicionar restricciones metabólicas y acotar el espacio de soluciones, se modelizó un cultivo continuo. Esta forma de operación permitió establecer un estado quasi-estacionario, donde las velocidades específicas son constantes y pueden ser controladas mediante la tasa de dilución (D).

El metabolismo de levaduras oleaginosas bajo condiciones apropiadas para la lipogénesis en un cultivo continuo se esquematiza en la Figura 1. En



ma de caja negra que representa el proceso de lipogénesis de *R. toruloides*. C_S , C_N , C_{O_2} , C_{Xr} , C_{CO_2} , C_L y C_{H_2O} representan las concentraciones de fuente de carbono y energía, fuente de nitrógeno, O_2 , biomasa residual, CO_2 , TAG y H_2O , respectivamente. Las velocidades específicas están representadas por q_i a excepción de la velocidad específica de crecimiento (μ) y el coeficiente de mantenimiento celular (m_s).

R. toruloides, la lipogénesis ocurre cuando un nutriente esencial para el crecimiento (generalmente nitrógeno), escasea en el medio de cultivo (Zhang *et al.*, 2016). En estas condiciones, el excedente de fuente de carbono se deriva a la producción de TAG (metabolismo de sobreflujo). Cuando se opera el biorreactor en forma continua a elevada relación carbono/nitrógeno (C/N), parte del carbono que

ingresa a la célula (q_s) se deriva al mantenimiento celular (m_s), parte al crecimiento (μ) y parte a la producción de lípidos (q_L) (Meeuwse *et al.*, 2011a). Esto puede expresarse mediante la ecuación de Pirt (Pirt, 1965), de la siguiente manera:

donde $y'_{Xr/S}$ e $y'_{L/S}$ son los rendimientos máximos de biomasa residual y lípidos, respectivamente, que se obtendrían en ausencia de mantenimiento celular. Por otro lado, el balance de masa para un compuesto i en cultivo sumergido inmerso en la fase líquida puede describirse mediante la ecuación (2).

$$\frac{d(C_i V)}{dt} = F_1 C_{i1} - F_2 C_{i2} \pm V r_i \quad (2)$$

donde, C_i es la concentración en mmol/l, V es el volumen de medio de cultivo en el biorreactor (l), F_1 y F_2 son los caudales de alimentación y salida del medio de cultivo en l/h, respectivamente, y r_i es la velocidad volumétrica de producción o consumo del compuesto i en mmol/l h.

En un biorreactor operado en forma continua, V es constante (3), con lo cual los flujos F_1 y F_2 son iguales e iguales a un F constante.

$$\frac{dV}{dt} = F_1 - F_2 = 0 \quad (3)$$

Teniendo en cuenta lo anterior y expresando las r_i como el producto de la velocidad específica (q_i) por la concentración de biomasa residual (C_{Xr}), la ecuación (2) queda expresada de la siguiente manera:

$$V \frac{dC_i}{dt} = F (C_{i1} - C_{i2}) \pm V q_i C_{Xr} \quad (4)$$

La tasa de dilución (D) en cultivos continuos se define por medio de la ecuación (5) y tiene unidades de h^{-1} .

$$D = \frac{F}{V} \quad (5)$$

En base a las ecuaciones anteriores, se puede determinar los balances de masa para el consumo de fuente de carbono y energía (6), consumo de nitrógeno (7), producción de biomasa residual (8) y producción de lípidos no asociados al crecimiento (9) (Meeuwse *et al.*, 2011a).

$$\frac{dC_s}{dt} = D (C_{s0} - C_s) - q_s C_{Xr} \quad (6)$$

$$\frac{dC_N}{dt} = D (C_{N0} - C_N) - q_N C_{Xr} \quad (7)$$

$$\frac{dC_{Xr}}{dt} = -D C_{Xr} - \mu C_{Xr} \quad (8)$$

$$\frac{dC_L}{dt} = -D C_L - q_L C_{Xr} \quad (9)$$

En estado estacionario ($dC_i/dt = 0$), para una relación de fuente de carbono y nitrógeno en el

$$q_s = \frac{\mu}{y'_{Xr/S}} + \frac{q_L}{y'_{L/S}} + m_s \quad (1)$$

reservorio (C_{S0} y C_{N0}) y operando a una determinada D , las correspondientes expresiones para las diferentes velocidades específicas están dadas por:

$$q_s = \frac{D (C_{s0} - \bar{C}_s)}{\bar{C}_{Xr}} \quad (10)$$

$$q_N = \frac{D (C_{N0} - \bar{C}_N)}{\bar{C}_{Xr}} \quad (11)$$

$$\mu = D \quad (12)$$

$$q_L = \frac{D \bar{C}_L}{\bar{C}_{Xr}} \quad (13)$$

donde, \bar{C}_s , \bar{C}_N , \bar{C}_{Xr} y \bar{C}_L son las concentraciones de fuente de carbono, nitrógeno, biomasa residual y TAG en el medio de cultivo en estado estacionario. Mediante las ecuaciones (10), (11), (12) y (13), puede estimarse las velocidades específicas a partir de variables operacionales como la D , C_{S0} y C_{N0} y midiendo las concentraciones a la salida del biorreactor, asumiendo mezclado perfecto.

2.2 Modelo metabólico a baja escala de *R. toruloides*.

Para determinar la capacidad metabólica de *R. toruloides* y lograr predecir correctamente el comportamiento microbiano bajo diferentes condiciones de cultivo, es necesario el análisis de la célula como un sistema biológico. Dentro de este sistema hay metabolitos intracelulares que interaccionan entre sí por medio de rutas metabólicas termodinámicamente favorables. La construcción de modelos estequiométricos son el primer paso para dilucidar el metabolismo microbiano.

Recientemente hemos desarrollado un modelo a baja escala que describe el metabolismo de *R. toruloides* (Figura 2). El modelo consta de 93 metabolitos y 105 reacciones, de las cuales 11 son reacciones de intercambio con el medio extracelular. Dicho modelo es aeróbico y contempla la asimilación de 4 fuentes de carbono y energía (glucosa, glicerol, xilosa y arabinosa). El metabolismo central de carbono está representado por la Glicólisis, la ruta pentosa fosfato (PP), el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), y el ciclo de glioxilato. Por otro lado, el metabolismo central de nitrógeno está representado por las reacciones anabólicas:

$$\frac{dc}{dt} = S v - \mu c \quad (14)$$

donde, $c = (c_1, c_2, \dots, c_m)^T$ es el vector de las concentraciones de los metabolitos intracelulares, $v = (v_1, v_2, \dots, v_n)^T$ es el vector de flujo de las reacciones y μ la tasa específica de crecimiento. Dado que la dinámica intracelular es mucho más rápida que la dinámica extracelular, en modelado metabólico se asume un estado pseudo-estacionario. Además, el término de dilución por crecimiento $\mu \cdot c$ suele ser despreciado ya que es mucho menor a los flujos de dichos metabolitos (Llaneras y Picó, 2008). De esta forma, el balance en (14) queda expresado como:

$$S v = 0 \quad (15)$$

La ecuación (15) define el espacio donde se encuentran todas las distribuciones de flujos posibles.

Dado que los sistemas biológicos normalmente tienen más reacciones que metabolitos (sistemas indeterminado), debe emplearse una técnica para resolverlo de modo de acotar las posibles soluciones.

El Análisis de Balance de flujos (FBA) es una metodología que permite predecir el comportamiento del microorganismo mediante la incorporación de restricciones metabólicas y la optimización de una función objetivo (Llaneras y Picó, 2008). Por un lado, las restricciones metabólicas a las cuales está sujeta el microorganismo limitan el número de soluciones posibles. FBA permite incorporar restricciones no-ajustables o invariantes en el tiempo (ej. irreversibilidad de los flujos) y ajustables (ej. valor máximo o mínimo de un flujo determinado experimentalmente). Por otro lado, la función objetivo pretende asumir que el microorganismo tiene un propósito evolutivo, con lo cual utilizará todos los recursos disponibles para perseguir dicho fin. Por medio de FBA, la optimización lineal de la función objetivo (Z) está dada por:

$$\begin{aligned} \max. \quad & Z = w^T v & (16) \\ \text{sujeto a} \quad & S v = 0 \\ & v_{\min} \leq v \leq v_{\max} \end{aligned}$$

Donde w es el vector de coeficientes que define a Z como una combinación lineal de v .

Con la finalidad de simular lo que ocurre en el cultivo continuo de *R. toruloides* bajo relaciones C/N elevadas, se utilizó la reacción de producción de TAG (C51) como función objetivo. Debido a que la célula evolutivamente prioriza su mantenimiento y crecimiento (Meeuwse *et al.*, 2011a) se debió incorporar restricciones adicionales. En primer lugar, para tener en cuenta el gasto energético por

mantenimiento no asociado al crecimiento (NGAM) se le asignó una cota inferior al flujo de la reacción ATPM (Figura 2). Dicha cota se determinó empleando la siguiente ecuación (Orth *et al.*, 2010):

$$v_{ATPM} = m_s y_{ATP/S} \quad (17)$$

El valor de m_s se calculó a partir de datos experimentales en cultivo continuo con glucosa como fuente de carbono (Shen *et al.*, 2013) por medio de la ecuación (1). El rendimiento $y_{ATP/S}$ se calculó empleando FBA y utilizando la reacción ATPM como función objetivo para -1 mmol/g h de fuente de carbono. En segundo lugar, el gasto energético asociado al crecimiento (GAM), representado por el coeficiente estequiométrico del ATP en la fórmula de biomasa fue ajustado a partir de las determinaciones experimentales de Shen *et al.* (2013). Por otro lado, para priorizar el crecimiento sobre la producción lipídica, se incorporó como restricción un flujo fijo para la ecuación de crecimiento *GrowthEx* (Figura 2) a una determinada D . Con ello nos aseguramos de que se cumpla la ecuación (12).

Finalmente, el valor asignado como cota superior del flujo ingreso de glucosa a la célula fue calculado empleando la ecuación (10) a partir de los datos experimentales de Shen *et al.* (2013). A su vez, los resultados obtenidos a partir de las optimizaciones se constataron con los calculados mediante ecuaciones (11) y (13) a partir de dichos datos experimentales. Luego, se determinó la aptitud del modelo para predecir el comportamiento de *R. toruloides* en condiciones propicias para la lipogénesis en cultivo continuo.

Para la resolución del problema de optimización lineal se utilizó el toolbox COBRA para MATLAB (Schellenberger *et al.*, 2011).

3. Resultados y Discusión

El proceso de lipogénesis en *R. toruloides* así como en otros microorganismos oleaginosos se encuentra en continuo estudio, ya que los mecanismos bioquímicos y regulatorios no están completamente elucidados.

En este trabajo se pretendió simular mediante FBA el comportamiento de *R. toruloides* en un sistema de cultivo continuo bajo diferentes diluciones y con relaciones C/N variables. Para ello, se empleó un modelo metabólico y se ajustó las variables de proceso (restricciones ajustables) empleando datos experimentales documentados en la bibliografía (Shen *et al.*, 2013).

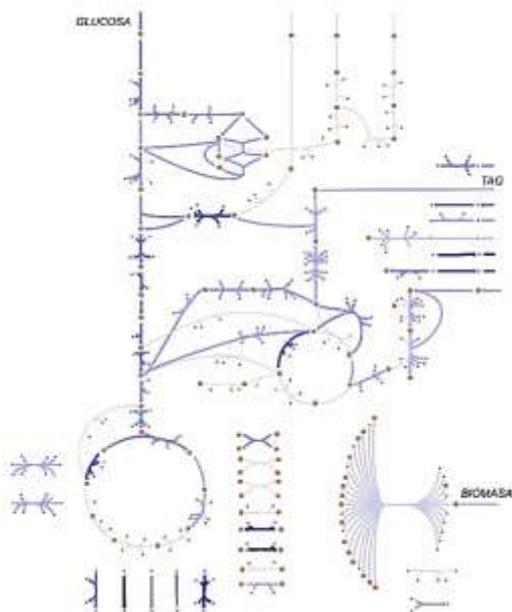
En la Tabla 1 se presentan los parámetros calculados en base a los datos experimentales, utilizados para

Tabla 1. Parámetros calculados a partir de datos experimentales de Shen *et al.* (2013).

establecer restricciones metabólicas.

Parámetro	Unidad	Valor
$y'_{Xr/S}$	Cmol/Cmol	0,456
$y'_{L/S}$	Cmol/Cmol	0,487
m_s	Cmol/Cmol h	0
NGAM	mmol/gh	0
GAM	mmol/g	224
f_L	% p/p	8,6

Para los cálculos se consideró una biomasa con composición elemental igual a: $CH_{1,73}O_{0,60}N_{0,15}$ con



un peso de 26,8 g/Cmol. En cuanto a los TAGs, se

Figura 3. Distribución de flujos metabólicos para una $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$. La intensidad del color azul es proporcional al valor de los flujos. Los flujos nulos aparecen como líneas grises.

consideraron como tripalmitina con una fórmula molecular de $C_{51}H_{98}O_6$ y un peso molecular de 807,34 g/mol. El valor obtenido para el mantenimiento celular y por ende para la cota inferior de NGAM resultó prácticamente nulo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos para microorganismos oleaginosos (Meeuwse *et al.*, 2011b). Si bien parecería que el gasto energético para mantenimiento es nulo, la

energía necesaria para mantener el pH fisiológico de la célula, representado por la reacción ATPS, tiene flujo no nulo (Figura 3).

Utilizando los parámetros anteriores y las velocidades específicas q_s y μ como restricciones adicionales, se determinó la distribución de flujos metabólicos durante la lipogénesis.

Como puede verse en la Figura 3, para una $D = 0,04$, se observa la producción en simultáneo de biomasa y TAG. En principio, se logró verificar que las rutas metabólicas tendiente a la producción de precursores metabólicos de biomasa residual tienen un flujo elevado. En cuanto a la síntesis de TAG, esta requiere de poder reductor (NADPH), el cual se generó principalmente a partir de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (ZWF1) perteneciente a la ruta de PP. Por otro lado, el AcCoA necesario para la síntesis de ácidos grasos fue provisto por la ATP citrato liasa (ACL1) y por la Acetil-CoA sintetasa (ACS2). Finalmente, cuando glucosa es la fuente de carbono y energía, el glicerol 3-fosfato para la reacción de ensamblaje (C51) se obtuvo a partir de la reacción glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPD1). Esta distribución concuerda con los cambios bioquímicos observados durante la etapa de

Figura 4. Producción de lípidos en cultivo continuo. Los q_L obtenidos mediante simulaciones con FBA (●) se comparan con los calculados a partir de datos experimentales (○) de Shen *et al.* (2013), para diferentes C/N consumidos (▲).

lipogénesis en microorganismos oleaginosos (Papanikolaou y Aggelis, 2011).

Por otro lado, se contrastaron los resultados obtenidos por FBA con los datos experimentales anteriormente mencionados. Como puede verse en la Figura 4, se obtuvo una buena correlación entre los resultados predichos por FBA y los datos experimentales obtenidos por Shen *et al.* (2013) en cultivo continuo.

La velocidad específica de producción de lípidos se incrementa hasta una $D \sim 0,08 \text{ h}^{-1}$ y luego disminuye conforme aumenta D . Estos resultados son esperables ya que la dilución establece una velocidad específica de crecimiento (12) y con ello, una relación C/N (17) que disminuye cuando aumenta D .

$$\frac{C}{N} = 6 q_s/q_N \quad (17)$$

Se ha reportado previamente que el proceso de lipogénesis se ve favorecido por $C/N > 20$ Cmol/Nmol (Meeuwse *et al.*, 2011b), lo cual

explicaría lo observado previamente.

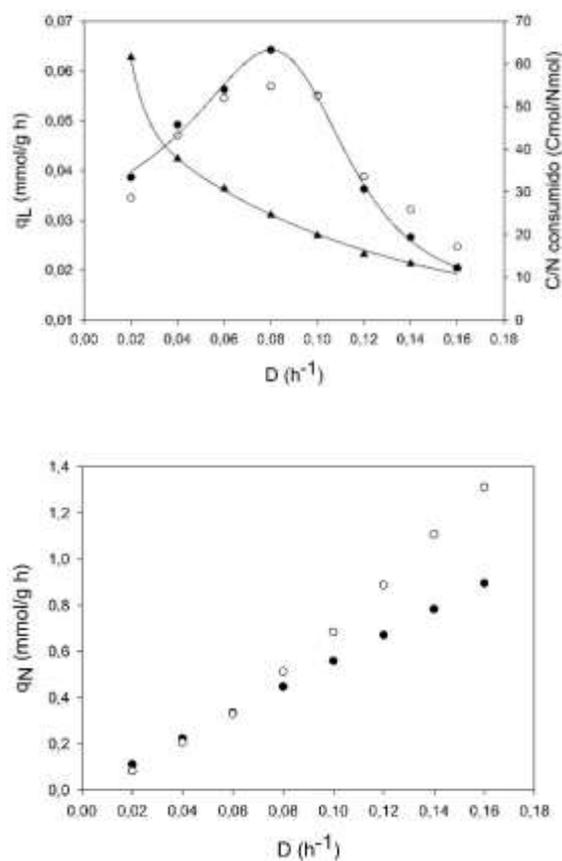


Figura 5. Velocidad específica de consumo de nitrógeno para diferentes D , obtenidas mediante simulaciones con FBA (●) y calculadas a partir de datos experimentales (○) de Shen *et al.* (2013).

Finalmente, en cuanto a la velocidad específica de consumo de nitrógeno q_N , se observa una muy buena correlación con datos experimentales hasta una D de $0,08 \text{ h}^{-1}$ (Figura 5), para luego separarse las curvas conforme aumenta D . Esta discrepancia puede deberse a una inexactitud en cuanto al planteo de la pseudoecuación de la biomasa (Biomass_Eqn), ya que es el único “producto” del metabolismo que requiere nitrógeno. Dicha ecuación es una aproximación basada en algunos precursores metabólicos necesarios para el anabolismo. Debido a ello, dista de ser exacta y, por ende, debe ser corregida y determinada empíricamente para diferentes cepas de estudio.

A pesar de lo anteriormente planteado, se ha observado en varios estudios para diversos microorganismos oleaginosos que el rendimiento de biomasa a nitrógeno ($y_{X/N}$) varía dependiendo del C/N, definiendo dos zonas a partir de un C/N ~ 20 Cmol/Nmol (Meeuwse *et al.*, 2011b). Esto podría explicar también las diferencias observadas en la Figura 5 entre los datos experimentales y los determinados mediante FBA.

4. Conclusiones

El modelizado metabólico de *R. toruloides* permitió simular lo que ocurre intracelularmente durante el proceso de lipogénesis en un cultivo continuo. Adicionalmente, mediante FBA, se logró predecir la velocidad de producción de TAG a bajas D , donde el C/N consumido es alto (≥ 20 Cmol/Nmol). Esta herramienta permite tener un indicio de las zonas de operación que resultarán más favorables para la producción de TAG, ahorrando tiempo y recursos económicos.

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

- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). *Oily yeasts as oleaginous cell factories*. Applied microbiology and biotechnology, 90(4), 1219-1227.
- Béligon, V., Christophe, G., Fontanille, P., & Larroche, C. (2016). *Microbial lipids as potential source to food supplements*. Current Opinion in Food Science, 7, 35-42.
- Bommareddy, R. R., Sabra, W., Maheshwari, G., & Zeng, A. P. (2015). *Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in Rhodosporidium toruloides grown on single and mixed substrates*. Microbial cell factories, 14(1), 36.
- Castañeda, M. T., Nuñez, S., Garelli, F., Voget, C., De Battista, H. (2017). *Comprehensive Analysis of a Metabolic Model for lipid production in Rhodosporidium toruloides*. Enviado para revisión.
- Economou, C. N., Aggelis, G., Pavlou, S., & Vayenas, D. V. (2011). *Modeling of single- cell oil production under nitrogen- limited and substrate inhibition conditions*. Biotechnology and bioengineering, 108(5), 1049-1055.
- Faife-Pérez, E., Otero-Rambla, M. A., & Alvarez-Delgado, A. (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.
- Koutinas, A. A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., & Kookos, I. K. (2014). *Design and techno-economic evaluation of microbial oil*

production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. Fuel, 116, 566-577.

Llaneras, F., & Picó, J. (2008). *Stoichiometric modelling of cell metabolism.* Journal of Bioscience and Bioengineering, 105(1), 1-11.

Meeuwse, P., Tramper, J., & Rinzema, A. (2011a). *Modeling lipid accumulation in oleaginous fungi in chemostat cultures: I. Development and validation of chemostat model for Umbelopsis isabellina.* Bioprocess and biosystems engineering, 34(8), 939-949.

Meeuwse, P., Tramper, J., & Rinzema, A. (2011b). *Modeling lipid accumulation in oleaginous fungi in chemostat cultures. II: Validation of the chemostat model using yeast culture data from literature.* Bioprocess and biosystems Engineering, 34(8), 951.

Nuñez, S., Castañeda, M. T., Garelli, F., Voget, C., De Battista, H. (2017). *Depuración de un modelo metabólico de pequeña escala para la producción de biolípidos.* XVII Reunión de Trabajo en Procesamiento de la Información y Control - RPIC 2017, Mar del Plata, Argentina, Sept.

Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). *What is flux balance analysis?.* Nature biotechnology, 28(3), 245-248.

Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). *Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production.* European Journal of Lipid Science and Technology, 113(8), 1031-1051.

Pirt, S. J. (1965). *The maintenance energy of bacteria in growing cultures.* Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 163(991), 224-231.

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.

Shen, H., Gong, Z., Yang, X., Jin, G., Bai, F., & Zhao, Z. K. (2013). *Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides.* Journal of biotechnology, 168(1), 85-89.

Xu, J., Du, W., Zhao, X., Zhang, G., & Liu, D. (2013). *Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation.* Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 7(1), 65-77.

Xue, Z., Sharpe, P. L., Hong, S. P., Yadav, N. S., Xie, D., Short, D. R., y otros (2013). *Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of Yarrowia lipolytica.* Nature biotechnology, 31(8), 734-740.

Zhang, S., Skerker, J. M., Rutter, C. D., Maurer, M. J., Arkin, A. P., & Rao, C. V. (2016). *Engineering Rhodosporidium toruloides for increased lipid production.* Biotechnology and Bioengineering, 113(5), 1056-1066.