

CULTIVO DE ALTA DENSIDADE CELULAR DE LEVEDURA OLEAGINOSA PARA A PRODUÇÃO DE LIPÍDIO MICROBIANO A PARTIR DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

HIGH-DENSITY CELL CULTURE OF OLEAGINOUS YEAST FOR THE PRODUCTION OF MICROBIAL LIPIDS FROM BY-PRODUCTS OF THE SUGAR AND ETHANOL INDUSTRY.

CULTIVO CELULAR DE ALTA DENSIDAD DE LEVADURA OLEAGINOSA PARA LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS MICROBIANOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AZUCARERA Y DEL ETANOL.

Marciel Brito de Oliveira Silva

E-mail: marciel.oliveira@mail.uft.edu.br

Gabriela Apolinário Leal

E-mail: gabriela.apolinario@mail.uft.edu.br

Thais Feitosa da Silva

E-mail: thais.feitosa@mail.uft.edu.br

Gabriela Eustáquio Lacerda

E-mail: gabrielaeustaquio@mail.uft.edu.br

Sergio Andres Villalba Morales

E-mail: sergio.morales@mail.uft.edu.br

Michelle da Cunha Abreu Xavier

E-mail: michellecax@mail.uft.edu.br

ABSTRACT:

Sustainable lipid production is essential to meet society's energy and food demands. The yeast *Lipomyces starkeyi* is a promising platform for microbial oil production, as it adapts to a variety of sustainable substrates. Alternative methods are needed to meet the growing demand for lipids. While synthetic substrates can increase the production costs of microbial oils, agro-industrial residues such as vinasse and molasses may offer low-cost alternatives. This study aimed to use vinasse and molasses as carbon sources for microbial lipid production in high-cell-density cultures. Fermentations were carried out using vinasse (V) and molasses (M) at ratios of 95:05 (v/m) and 80:20 (v/m), incubated at 28 °C and 200 rpm for 96 h, with a 30% (v/v) inoculum. The yeast was able to utilize molasses and vinasse as sole carbon sources, reaching maximum growth of 16.26 and 41.21 g/L of microbial biomass in the 95:05 and 80:20 media, respectively; both media exhibited low lipid accumulation. The ability of *L. starkeyi* to grow and accumulate lipids in V:M, even without salt supplementation, underscores the promise of these by-products for producing high value-added compounds, although lipid accumulation in the present work was low.

KEYWORDS: Lipids; *L. starkeyi*; high cell density; vinasse; molasses.

RESUMO:

A produção sustentável de lipídios é essencial para atender às necessidades energéticas e alimentares da sociedade. A levedura *Lipomyces starkeyi* mostra-se promissora na produção de óleos microbianos, adaptando-se a diversos substratos sustentáveis. Métodos alternativos são necessários para atender à crescente demanda por lipídios. A utilização de substratos sintéticos pode aumentar os custos de produção de óleos microbianos, enquanto resíduos agroindustriais como vinhaça e melaço podem ser alternativas de baixo custo. Objetiva-se utilizar a vinhaça e melaço como fontes de carbono para a produção de lipídios microbianos com cultivos de alta densidade celular. As fermentações foram realizadas utilizando vinhaça (V) e melaço (M), na proporção 95:05 (v/m) e 80:20 (v/m), como meio de cultura, incubado a 28 °C e 200 rpm por 96 horas e inóculo de 30 % v/v. A levedura foi capaz de utilizar o melaço e a vinhaça, como fontes únicas de carbono, atingindo crescimento máximo de 16,26 e 41,21 g/L de biomassa microbiana nos meios 95:05 e 80:20 respectivamente, ambos os meios apresentaram baixo acúmulo lipídico. A capacidade de *L. starkeyi* de crescer e acumular lipídios em V:M, mesmo sem suplementação salina, evidencia o caráter promissor desses subprodutos para a produção de compostos de alto valor agregado embora o acúmulo de lipídios do presente trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: Lipídios; *L. starkeyi*; alta densidade; vinhaça; melaço.

RESUMEN:

La producción sostenible de lípidos es esencial para satisfacer las necesidades energéticas y alimentarias de la sociedad. La levadura *Lipomyces starkeyi* se muestra prometedora en la producción de aceites microbianos, adaptándose a diversos sustratos sostenibles. Se necesitan métodos alternativos para satisfacer la creciente demanda de lípidos. El uso de sustratos sintéticos puede aumentar los costos de producción de aceites microbianos, mientras que los residuos agroindustriales como la vinaza y la melaza pueden ser alternativas de bajo costo. El objetivo es

utilizar vinaza y melaza como fuentes de carbono para la producción de lípidos microbianos con cultivos de alta densidad celular. Las fermentaciones se llevaron a cabo utilizando vinaza (V) y melaza (M), en la proporción 95:05 (v/m) y 80:20 (v/m), como medio de cultivo, incubadas a 28 °C y 200 rpm durante 96 horas y un inóculo del 30 % v/v. La levadura pudo utilizar melaza y vinaza como únicas fuentes de carbono, alcanzando un crecimiento máximo de 16,26 y 41,21 g/L de biomasa microbiana en medios 95:05 y 80:20, respectivamente; ambos medios mostraron una baja acumulación de lípidos. La capacidad de *L. starkeyi* para crecer y acumular lípidos en V:M, incluso sin suplementación salina, resalta el potencial de estos subproductos para la producción de compuestos de alto valor añadido, a pesar de la acumulación de lípidos observada en este estudio.

PALABRAS CLAVE: Lípidos; *L. starkeyi*; alta densidad; vinaza; melaza.

INTRODUÇÃO

Com o esgotamento de recursos naturais, os desafios da mudança climática e a escassez de combustíveis fósseis, as reservas energéticas e o abastecimento de alimentos têm se tornado uma preocupação crescente, impulsionada pelo aumento populacional (PATEL *et al.*, 2020; TAKAKU *et al.*, 2020; MARTINEZ-BURGOS *et al.*, 2023). Os lipídios são amplamente utilizados em alimentos e biocombustíveis. Embora ainda sejam obtidos majoritariamente de sementes oleaginosas, os métodos convencionais de produção mostram-se insuficientes para atender à demanda atual. Os lipídios produzidos a partir de diferentes fontes microbianas, como fungos leveduriformes e filamentosos e bactérias, são considerados uma alternativa sustentável aos lipídios derivados de plantas. O perfil de ácidos graxos dos lipídios microbianos é semelhante ao de óleos de culturas oleaginosas o que os torna excelentes candidatos para substituição em diversos produtos, devido à sua ampla gama de aplicações (JONES *et al.*, 2019; JUANSSILFERO *et al.* 2019).

Os óleos microbianos são utilizados na indústria alimentícia devido à presença de ácidos graxos essenciais para a saúde humana, como o ácido eicosapentaenoico e ácido docosahexaenoico. Podem substituir a manteiga de cacau, ser usados como emulsificantes e na produção de biossurfactantes e outros produtos bioativos e até biodiesel. Sua versatilidade permite sua aplicação em diversos setores, promovendo inovação e sustentabilidade na indústria (GHAZNI; MARANGO, 2022).

Os óleos microbianos (*Single Cell Oils, SCOs*) destacam-se como alternativa versátil e sustentável às fontes lipídicas convencionais. Produzidos por microrganismos cultivados em resíduos agroindustriais, permitem aproveitar substratos de baixo custo e reduzir desperdícios. Além disso, o perfil de ácidos graxos dos SCOs pode ser modulado pela espécie, pelo substrato e pelas condições de cultivo, possibilitando obter óleos com propriedades direcionadas para

aplicações em alimentos, ingredientes funcionais e insumos químicos, com composição semelhante à de óleos vegetais (GHAZNI; MARANGO, 2022; HASSA *et al.*, 2024).

A produção de SCO pode ser otimizada, através de cultivos de altas densidades, quando a concentração no tempo inicial tem um impacto significativo na produtividade lipídica final, tornando uma característica determinante na produtividade de biomassa e lipídios (AZIZ *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2015). O cultivo de alta densidade celular é uma técnica empregada para gerar biomassas de células microbianas em concentrações elevadas. Essa abordagem é comum em diversos bioprocessos para viabilizar a produção econômica de produtos específicos. Habitualmente, uma concentração celular superior à obtida no cultivo tradicional é classificada como alta densidade celular (MALAIRUANG *et al.*, 2020). De forma geral, as leveduras oleaginosas têm vantagens em relação a outros microrganismos, como as algas heterotróficas, atingindo maiores densidades celulares em comparação aos bolores. Além disso, as leveduras apresentam maiores taxas de crescimento e são mais fáceis de manejar em grande escala (ABELN; CHUCK, 2021).

Lipomyces starkeyi é uma levedura oleaginosa que tem a capacidade de produzir altos níveis de lipídios, chegando a atingir até 70 % do seu peso seco (TAKAKU *et al.*, 2020). É um microrganismo que apresenta crescimento celular e conteúdo lipídico em diversos substratos, como xilose, glicose e hidrolisado hemicelulósico (HH) do bagaço da cana-de-açúcar e do melaço da cana-de-açúcar (ANSCHAU *et al.*, 2015; XAVIER *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2014). Além de apresentar certa tolerância à presença de potenciais inibidores do processo fermentativo (OLIVEIRA *et al.*; 2021, ZHANG *et al.*, 2022). Utilizar substratos sintéticos pode elevar o custo de produção dos óleos microbianos, já o uso de resíduos e subprodutos agroindustriais podem ser utilizados como substrato de baixo custo, como a vinhaça e o melaço, subprodutos da usina sucroalcooleira (FERREIRA, 2024).

A vinhaça é um efluente da indústria do bioetanol, onde 13 L de vinhaça é gerado a cada 1 L de etanol, normalmente é utilizado como fertilizante do solo para o replantio da cana-de-açúcar, no entanto a grande quantidade produzida acaba por gerar uma contaminação no solo, o que se faz de um problema ambiental. A vinhaça é composta por 93 % de água, 7 % de sólidos, sal em altos níveis como potássio, fenóis e melanoidinas; cerca de 40 % de matéria orgânica, principalmente ácidos orgânicos e rica em compostos nitrogenados (TORRES *et al.*, 2023; ALAMDARI *et al.*, 2023). O melaço, por sua vez, é um subproduto gerado da indústria sucroalcooleira, originado a partir do processamento de açúcar. O melaço é rico em açúcares como sacarose, glicose e frutose, possui pouca quantidade de nitrogênio e vitaminas, usualmente é utilizado para consumo humano, mas também é utilizado em dietas animais nutritivas e dietéticas (RAHMAN; PASUPATHI; KARUPPIAH, 2022; PALMONARI *et al.*, 2020).

Esses produtos úteis podem ser usados como fonte de carbono de baixo custo para o crescimento e síntese lipídica de *L. starkeyi*, ao mesmo tempo em que promovem um uso alternativo para a vinhaça e gerando um produto de valor agregado. A *L. starkeyi* tem sido reportada na obtenção de lipídios a partir de melaço (VIEIRA *et al.*, 2014) e da mistura de vinhaça e melaço (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Assim, mais estudos são necessários visando melhorar a assimilação destas fontes de carbono e nutrientes pela *L. starkeyi* e a sua produtividade lipídica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi utilizar a vinhaça e melaço como fontes de carbono de baixo custo para a produção de lipídios microbianos avaliando o cultivo com alta densidade visando maior rendimento e produtividade em óleos.

METODOLOGIA

Reativação da Levedura

Para a reativação da levedura, foi necessária uma ampola com a *L. starkeyi* Y-11558 liofilizada, a levedura foi inoculada em um meio de cultura líquido YM, contendo extrato de levedura 3,0 g/L; extrato de malte 3,0 g/L; peptona de soja 5,0 g/L e glicose 10,0 g/L e pH 5,5. O cultivo foi incubado numa incubadora orbital do tipo *shaker* (incubadora com agitação orbital TE-4200) a 28 °C e 200 rpm. Foram realizadas transferências consecutivas para novos meios de cultura para obtenção de maior quantidade de biomassa e, por fim, foram criopreservadas em 10% (v/v) de glicerol e armazenadas em freezer a – 4 °C.

Pré-inóculo e inóculo

Para o preparo do pré-inóculo foi utilizado uma cepa estoque da levedura *L. starkeyi* Y-11558. Para o pré-inóculo, foi preparado um meio líquido YM em um Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 min. Logo em seguida, inoculou-se assepticamente a cepa da levedura, incubada em a 28 °C, 200 rpm por 72 h. O inóculo foi preparado pela transferência de 30% (v/v), para alta densidade celular, do pré-inóculo para o meio líquido de vinhaça (V) e melaço (M) com uma relação v/m igual a 95:05 e outra 80:20 com ambos pH 5,5 com volume final de trabalho de 50 mL, em frasco Erlenmeyer (250 mL), incubados a 28 °C, 200 rpm durante 24 h.

Fermentação

A fermentação foi realizada pela transferência de 30 % (v/v) do inóculo para o meio V:M nas relações de 95:05 (v/m) e 80:20 (v/m), e incubados a 28 °C, 200 rpm, pH 5,5. Aliquotas de amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Determinação da biomassa microbiana

A biomassa microbiana foi determinada pelo método gravimétrico, através da massa seca obtida durante o processo fermentativo. Amostras de 1,5 mL foram centrifugadas a 3600 rpm por 10 minutos (Centrífuga excelsa II - Fanem 206 BL), lavadas com água destilada e os pellets foram secos a 60 °C (Nova Etica - 402/311) por 24 h, até atingir peso constante. A fermentação foi acompanhada pela determinação da absorbância em espectrofotômetro (METASH, UV-5100 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER) a 600 nm, relacionando com a curva padrão de biomassa microbiana. Os meios compostos por vinhaça e melão foram utilizados como branco para as fermentações, utilizando suas respectivas proporções. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação do teor de sólidos solúveis totais

O teor de sólidos solúveis foi determinado utilizando um refratômetro de bancada (Refratômetro Abbe 13000-17000 Nd C/termômetro Digital S/atc BIOBRIX) em temperatura ambiente previamente calibrado com água destilada.

Determinação de nitrogênio amoniacal

O nitrogênio amoniacal foi determinado pela reação de Berthelot de acordo com o protocolo descrito por SRIENC *et al.*, (1984) a 37 °C durante 30 minutos e a absorbância determinada a 630 nm. A curva de calibração foi construída com uma solução de 20mg/L de N-NH₃ em diferentes diluições utilizando água deionizada

Determinação do consumo de açúcares

Os açúcares foram quantificados através de um cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu (LC-10Series Avp; desgaseificador: DGU-14A, integrador: CLASS LC-10), com eluição isocrática, pelo bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de 75:25 de acetonitrila em água ultrapura (destilada e deionizada). O fluxo do eluente foi de 0,8 mL/min, a 25 °C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 30 minutos. A detecção se deu em detector de índice de refração (Shimadzu, modeloRID-10A). Uma alíquota de 20,0 µl da amostra foi injetada manualmente (injetor Rheodyne - iL malha 20) e permeada por uma coluna Phenomenex Luna Omega Sugar (150 x 4,6 mm) com conexão direta a Cartucho de segurança Phenomenex Luna Omega (4 x 3 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal.

Determinação de Lipídios

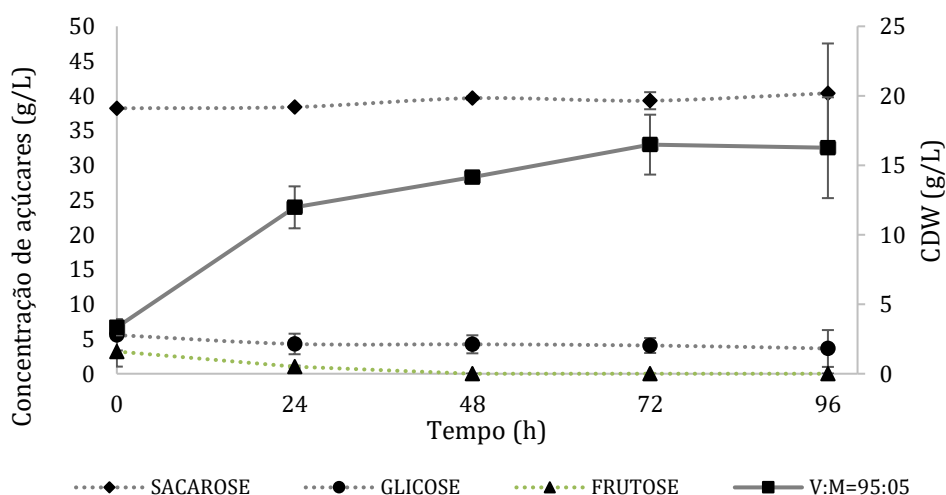
Os lipídios foram extraídos de biomassa seca conforme Hussain *et al.* (2015). Os lipídios foram extraídos e quantificados gravimetricamente pelo método Bligh-Dyer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escala °Brix é utilizada para medir a quantidade de sólidos solúveis em líquidos, tais como caldo de cana-de-açúcar, melão, vinhaça. A maioria dos sólidos solúveis em sua grande parte são utilizados para quantificar açúcares totais, onde se mede um valor estimado (ALMEIDA *et al.*, 2018). O melão apresentou um valor de °Brix superior ao encontrado na vinhaça ($73,93 \pm 0,42$ e $2,95 \pm 0,15$ respectivamente), e isso ocorre devido a grande quantidade de açúcares presentes no melão. Esses dados são similares aos obtidos por Dantas (2020), para o melão de cana-de-açúcar que foi de $82,92$ °Brix.

Nos meios fermentativos avaliados, a relação V:M = 95:05, com inóculo de $3,34 \pm 0,58$ g/L, apresentou menor disponibilidade de açúcares fermentescíveis, em função do baixo teor de sólidos solúveis da vinhaça, o que naturalmente limitou o crescimento celular em relação a V:M = 80:20, com um inóculo de $2,92 \pm 0,35$ g/L (Figura 1). Apesar disso, *L. starkeyi* conseguiu manter crescimento mesmo nesse meio mais restrito de V:M = 95:05, não apresentando dificuldades para se adaptar ao meio V:M, predominantemente formado por vinhaça, que normalmente contém compostos fenólicos. Esses compostos originam-se da reação de Maillard, resultante da interação entre açúcares e grupos amino das proteínas presentes (SEIXAS *et al.*, 2016). Tais compostos podem influenciar ou inibir o processo fermentativo.

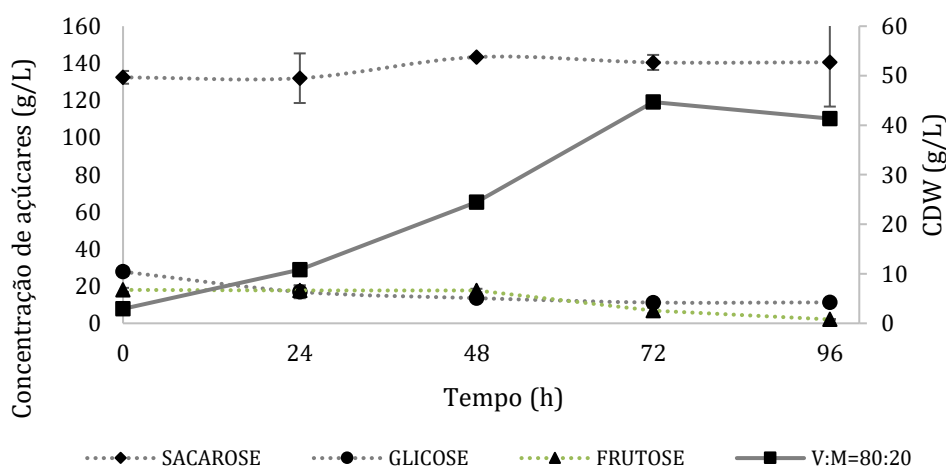
Figura 1 – Perfil cinético de crescimento celular e consumo de açúcares pela levedura *Lipomyces starkeyi* (CDW: Cell Dry Weight) por alta densidade celular em meio V:M=95:05.



Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Já na relação V:M = 80:20 (Figura 2), a maior proporção de melaço disponibilizou maior concentração de açúcares, sugerindo o favorecimento do metabolismo celular e refletindo em concentrações mais elevadas de biomassa. Essa resposta está em conformidade com outros estudos que mostram que concentrações adequadas de melaço aumentam significativamente o crescimento de biomassa.

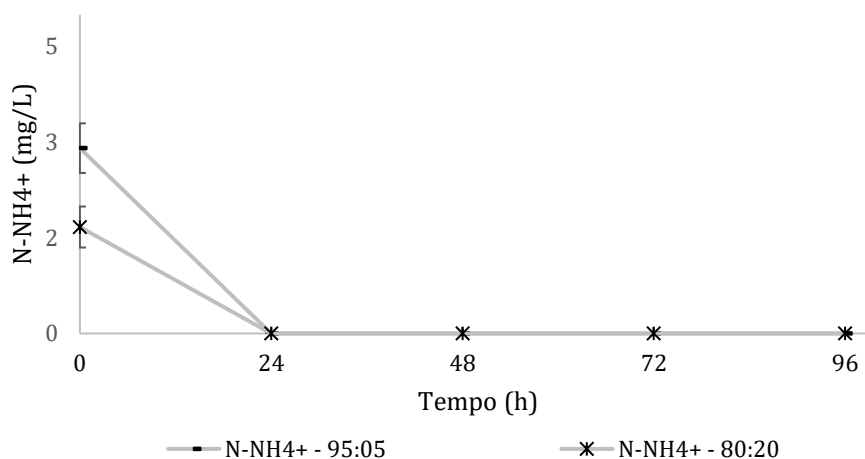
Figura 2 – Perfil cinético de crescimento celular e consumo de açúcares pela levedura *Lipomyces starkeyi* (CDW: Cell Dry Weight) por alta densidade celular em meio V:M=80:20 e consumo de açúcares.



Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Nos experimentos realizados com *L. starkeyi* NRRL Y-11558 em meios nas proporções de V:M igual a 95:05 e 80:20, verificou-se que a sacarose não foi consumida durante todo o processo, enquanto a glicose e frutose foram metabolizadas por sua vez (Figura 1 e 2). Esse resultado contrasta com registros na literatura: o estudo genômico de Dai *et al.* (2019) identificou genes da cepa NRRL Y-11558 associados ao metabolismo de sacarose, sugerindo potencial para seu consumo, e trabalhos com a cepa DSMZ 70296 confirmaram crescimento em substratos ricos nesse açúcar, como o melaço de cana (JACOB; MATHEW, 2023). Assim, embora o aparato genético exista, a Y-11558 não metabolizou a sacarose nas condições avaliadas, possivelmente por fatores de regulação metabólica ou pelas condições específicas dos cultivos. Ainda, é possível que haja a necessidade de hidrolisar o melaço a fim de se obter monômeros de açúcares para que a assimilação destes pela levedura.

Figura 3 – Perfil de consumo de nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺) em meio V:M=95:05 e V:M=80:20 em função do tempo.



Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

Em ambos os cultivos se observou redução progressiva de N–NH₄⁺ (Figura 3) entre os tempos 0h e 24h, indicativa de assimilação de N–NH₄⁺ e passagem para condição de limitação de nitrogênio. Em leveduras oleaginosas, tal limitação atua como sinal regulatório para indução do acúmulo lipídico quando mantida por tempo suficiente (DIAMANTOPOULOU *et al.*, 2023; LEI *et al.*, 2024). No contexto do uso de vinhaça, a presença de sais e compostos orgânicos/fenólicos pode alterar o perfil de consumo de nitrogênio e a estabilidade dessa fase, conforme relatado em estudos recentes com vinhaça (MAZA *et al.*, 2024).

A baixa produção de lipídios observada na Tabela 1, pode ser condizente com a presença de frações inibitórias da vinhaça (melanoidinas e compostos fenólicos), leituras mostraram que hidroximetilfurfural e furfural não foram detectados em ambas as fermentações, associadas à depressão de rotas anabólicas e a maior custo de manutenção celular; em paralelo, embora tenha ocorrido redução de N–NH₄⁺, parte do nitrogênio assimilado pode ter sido direcionada a respostas de estresse, encurtando a fase efetivamente da limitação de N necessária para indução da produção de lipídios, o que ajuda a explicar a divergência em relação às faixas típicas reportadas para *L. starkeyi* sob limitação de N controlada (DIAMANTOPOULOU *et al.*, 2023; LEI *et al.*, 2024; KITCHEN; GIBSON; LOVEGROVE, 2024; MAZA *et al.*, 2024; ROSAS-PAZ *et al.*, 2024).

Tabela 1 - Efeito das diferentes densidades de inóculos de cultivo na biomassa celular e conteúdo lipídico.

Meio de Cultura	Biomassa microbiana final (g/L)	Lipídios (%)
V:M=95:05	16,26 ± 3,63	4,17 ± 0,0019
V:M=80:20	41,21 ± 3,49	6,48 ± 0,0049

Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baixas concentrações de óleos microbianos foram detectadas nos cultivos de *L. starkeyi* com vinhaça e melaço. O cultivo com a relação V:M = 80:20 apresentou os maiores valores medidos de biomassa, superando V:M = 95:05, resultado coerente com a maior carga de açúcares do melaço em comparação à vinhaça. Ao longo dos ensaios, glicose e frutose foram consumidas enquanto a sacarose permaneceu não metabolizada. Assim, dentro do escopo avaliado, o cultivo com a condição V:M = 80:20 foi a que mais favoreceu o crescimento celular, embora grandes quantidades de biomassa em escala laboratorial tenham sido alcançadas, o teor lipídico entre as proporções testadas resultou em baixos acúmulos de lipídios. Dessa forma, são necessários estudos futuros de métodos da hidrólise do melaço para aumentar a quantidade de monossacarídeos fermentescíveis a partir da sacarose, a fim de utilizar toda a matéria prima disponível, juntamente com a suplementação de fontes de nitrogênio e sais no meio V:M para uma melhor relação C/N para um eficiente acúmulo de lipídios.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Federal do Tocantins e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Financiadora de Estudos e Projetos – Finep: “programa de recuperação e expansão da infraestrutura de pesquisa científica e tecnológica em universidades e icts – pró-infra e mcti/finep/indct/ação transversal infraestrutura para a Amazônia legal 2024 pró-Amazônia. Raizen Piracicaba pela doação do Melaço e BP-Bunge pela doação da vinhaça.

REFERÊNCIAS

ABELN, F.; CHUCK, C.J. The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microbial Cell Factories*, Bath - UK, v. 20, n. 221, novembro de 2021. doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01712-1>.

ALAMDARI, N.G.; ALMASI, H.; MORADI, M.; AKHGARI, M. Characterization of Carbon Quantum Dots Synthesized from Vinasse and Date Seeds as Agro-industrial Wastes. **Waste and Biomass Valorizations**, v. 14, p. 3689-3703, fevereiro de 2023.

ANSCHAU, A.; XAVIER, M. C. A.; HERNALSTEENS, S.; FRANCO, T. T. Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. **Bioresource Technology**, v.157, p. 214-222, fev. 2014. BÉLIGON, V.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P.; LARROCHE, C. Microbial lipids as potential source to food supplements. *Current Opinion in Food Science* 2015, 7:35-42. doi: 10.1016/j.cofs.2015.10.002

AZIZ, M.M.A.; KASSIM, K.A.; SHOKRAVI, Z.; JAKARNI, F.M; LIU, H.Y.; ZAINI, N.; TAN, L.S.; ISLAM, A.B.M.S.; SHOKRAVI, H. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: **A review. Renewable and Sustainable**

Energy Reviews, v. 119, n. 109621, p. 1-15, março de 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109621>.

DAI, Z.; POMRANING, K.R.; DENG, S.; HOFSTAD, B.A.; PANISKO, E.A.; RODRIGUEZ, D.; BUTCHER, M.G.; CULLEY, D.E.; MAGNUSON, J.K. Deletion of the KU70 homologue facilitates gene targeting in *Lipomyces starkeyi* strain NRRL Y-11558. **Current Genetics**, v. 65, p. 269-282, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0875-z>.

DIAMANTOPOULOU, P.; SARRIS, D.; TCHAKOUTEU, S.S.; XENOPOULOS, E.; PAPANIKOLAOU, A. Growth response of non-conventional yeasts on sugar-rich media: Part 1: High production of lipid by *Lipomyces starkeyi* and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, art. 1863, 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11071863.

FERREIRA, Maria Elízia Pacheco. **Efeito da vinhaça, melão, xarope de milho e macadâmia sobre a proliferação de bactérias edáficas utilizadas na agricultura**. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2024.

GHAZANI, S.M.; MARANGONI, A.G. Microbial lipids for foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 593-607, janeiro de 2022.

HASSA, W.; FIALA, K.; APIRAKSAKORN, J.; LEESEING, R. Sugarcane bagasse valorization through integrated process for single oil, sulfonated carbon-based catalyst and biodiesel co-production. **Carbon Resources Conversion**. p. 1-14, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2024.100245>.

HUSSAIN, J.; LIU, Y.; LOPES, W.A.; DRUZIANA, J.I.; SOUZA, C.O.; CARVALHO, G.C.; NASCIMENTO, I.A.; LIAO, W. Effects of different biomass drying and lipid extraction methods on algal lipid yield, fatty acid profile, and biodiesel quality. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 175, n. 6, p. 3048-3057, março de 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1486-5>

JACOB, A.; MATHEW, J. Recent Advances in using *Lipomyces starkeyi* for the Production of Single-Cell Oil. **J Pure Appl Microbiol**, v. 17, n. 2, p. 693-704, 2023. Doi: 10.22207/JPAM.17.2.06

JONES, A.D.; BOUNDY-MILLS, K.L.; BARLA, G.F.; KUMAR, S.; UBANWA, B.; BALAN, V. Microbial Lipid Alternatives to Plant Lipids. **Microbial Lipid Production**. v. 1995, p. 1-32, maio de 2019.

JUANSSILFERO, A.B.; KAHAR, J.; AMZA, R.L.; YOPI; SUDESH, K.; OGINO, C.; PRASETYA, B.; KONDO, A. Lipid production by *L. starkeyi* using sap squeezes from felled old oil palm trunks. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 6, p. 276-731, junho de 2019.

KITCHEN, B.; GIBSON, G. R.; LOVEGROVE, J. A. Melanoidins and (poly)phenols: an analytical paradox. **Current Opinion in Food Science**, v. 60, n. 101062, p. 1-8, dezembro de 2024. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2024.101217>.

LEI, Y.; WANG, X.; SUN, S.; HE, B.; SUN, W.; WANG, K.; CHEN, Z.; GUO, Z.; LI, Z. A review of lipid accumulation by oleaginous yeasts: culture modes and nutrient ratio effects. **Science of the Total Environment**, v. 919, n. 170385, abril de 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170385>.

LIU, Y.; WANG, Y.; LIU, H.; ZHANG, J. Enhanced lipid production with undetoxified corncob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. **Bioresource**

Technology, Pequim - China, v. 180, p. 32-39, março de 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.093>.

MALAIRUANG, K; KRAJANG, M; SUKNA, J. RATTANAPRADIT, K; CHAMSART, S. High Cell Density Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* with Intensive Multiple Sequential Batches Together with a Novel Technique of Fed-Batch at Cell Level (FBC). **Processes**, v. 8, n. 1321, outubro de 2020, doi: <https://doi.org/10.3390/pr8101321>.

MALIRSON, A.; CHEIRSILP, B.; BILLATEH, A.; LOUHASAKUL, Y.; UPAICHIT, A. Bioconversion of agro-industrial carbon wastes into biodiesel feedstocks with superior fuel properties by promising oleaginous yeasts and cultivation strategies. **Carbon Resources Conversion**, n. 100354, p.1-13, junho de 2025, doi: <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2025.100354>

MARTINEZ-BURGOS, W.J.; VANDENBERGHE, L.P.S.; KARP, S.G.; MELLO, A.F.M.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R. Microbial lipid production from soybean hulls using *L. starkeyi* LPB53 in a circular economy. **Bioresource Technology**, v. 372, n. 128650, março de 2023.

MAZA, D. D.; BARROS, J.M.; GUILLAMÓN, J.M.; AYBAR, M.J.; VIÑARTA, S.C. . Valorization of sugarcane vinasse and crude glycerol for single-cell oils production by *Rhodotorula glutinis* R4. **Fermentation**, v. 10, n. 4, art. 178, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation10040178>.

OLIVEIRA, M.C.C.; XAVIER, M.C.A.; MORALES, S.A.V.; DOMINICES, K.M.C. Produção de lipídio microbiano pela *Lipomyces starkeyi* a partir de subprodutos da indústria sucroalcooleira. XVI - Seminário de Iniciação Científica (SIC) - (UFT), 16, 2021, Palmas -TO. **Anais** (Anais do XVI Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal do Tocantins). Meio Digital: Even3, 23 de março de 2021. p. 1-10.

PALMONARI, A.; CAVALLINI, D.; SNIFFEN, C.J.; FERNANDES, L.; HOLDER, P.; FAGIOLI, L.; FUSARO, I.; BIAGI, G.; FORMIGONI, A.; MAMMI, L. Short communication: Characterization of molasses chemical composition. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 7, p. 6244-6249, julho de 2020.

PATEL. A.; GARAGEORGOU, D.; ROVA, E.; KATAPODIS, P.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P.; MATSAKAS, L. An overview of potential oleaginous microorganismos and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. **Microorganisms**, v. 8, n. 434, p. 1-40, março de 2020.

RAHMAN, S.S.A.; PASUPATHI, S.; KARUPPIAH, S. Conventional optimization and characterization of microbial dextran using treated sugarcane molasses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 775-787, novembro de 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.094>.

ROSAS-PAZ, M.; ZAMORA-BELLO, A.; TORRES-RAMÍREZ, N.; VILLARREAL-HUERTA, D.; ROMERO-AQUILAR, L.; PARDO, J.P.; HAFIDI, M.E.; SANDOVAL, G.; SEGAL-KISCHINEVZKY, C.; GONZÁLEZ, J.. Nitrogen limitation-induced adaptive response and lipogenesis in the Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* M94C9. **Frontiers in Microbiology**, p. 1-19, agosto de 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1416155>.

SEIXAS, F. L.; GIMENES, M. L.; NÁDIA R. C. FERNANDES-MACHADO. Treatment of vinasse by adsorption on carbon from sugar cane bagasse. *Química Nova*, Apucarana – PR, Vol. 39, No. 2, p. 172-179, 2016.

TAKAKU, H.; MATSUZAWA, T.; YAOI, K.; YAMAZIKI, H. Lipid metabolism of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 6141-6148, maio de 2020.

TAKAKU, H.; MIYAJIMA, A.; KAZAMA, H.; SATO, R.; ARA, S.; MATSUZAWA, T.; YAOI, K.; ARAKI, H.; SHILDA, Y.; OGASAWARA, W.; YAMAZAKI, H. A novel electroporation procedure for highly efficient transformations of *L. starkeyi*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 169, n. 10586, fevereiro de 2020.

TORRES, M.A.; VALDEZ, A.L.; ANGELICOLA, M.V.; RAIMONDO, E.E.; PAJOT, H.F.; NIETO-PENALVER. Vinasse as a substrate for inoculant culture and soil fertigation: Advancing the circular and green economy. **Science of The Total Environment**, v. 887, n. 164014, agosto de 2023.

VIEIRA, J. P. F.; IENCZAK, J. L.; ROSSELL, C. E. V; PRADELLA, J. G. C; FRANCO, T. T. Microbial lipid production: screening with yeasts grown on Brazilian molasses. **Biotechnology Letters**, v.36, p. 2433-2442, ago. 2014.

XAVIER, M. C. A.; CORADINI, A. L. V.; DECKMANN, A. C.; FRANCO, T. T. Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. **Biochemical Engineering Journal**, v.118, p. 11-19, nov. 2017.

ZHANG, L.; LEE, J.T.E.L.; OK, Y.S.; DAI, Y.; TONG, Y.W. Enhancing microbial lipids yield for biodiesel production by oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* fermentation: A review. **Bioresource Technology**, v. 344/B, n. 126294, janeiro de 2022.