



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΙΓΑΙΟΥ

ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής

Πτυχιακή Μελέτη

Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας από στελέχη της κόκκινης ζύμης *Rhodotorula*  
καλλιεργούμενα σε παραπροϊόν ζυθοποιίας

Δέσποινα-Νεφέλη Διοδώνη

Σεπτέμβριος 2023

Πτυχιακή Μελέτη της Δέσποινας-Νεφέλης Διοδώνη με θέμα:

Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας από στελέχη της κόκκινης ζύμης *Rhodotorula* καλλιεργούμενα σε παραπροϊόν ζυθοποιίας

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

Σαρρής Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Ιωάννου Ζαχαρίας Επίκουρος Καθηγητής

Έλληνας Κοσμάς Επίκουρος Καθηγητής

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στα πλαίσια του Π.Π.Σ «Επιστήμη Τροφίμων και Διατροφής» του Πανεπιστημίου Αιγαίου και έλαβε χώρα στα εργαστήρια «Εργαστήριο Φυσικοχημικής & Βιοτεχνολογικής Αξιοποίησης Υποπροϊόντων Τροφίμων». Αρχικά, ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Σαρρή Δημήτριο για την ανάθεση αυτού του τόσο ενδιαφέροντος και πρωτότυπου θέματος ως αντικείμενο της προπτυχιακής μου μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία Κοθρή για την πολύτιμη καθοδήγηση σε επιστημονικό επίπεδο και την βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης αυτής. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, Ανδρέα και Ειρήνη, για την υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και στην αδελφή μου Πολίνα και τον αδερφό μου Χρήστο, και σε όσους ήταν δίπλα μου και με στήριξαν κατά τη διάρκεια του της φοίτησης μου.

## Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	6
<b>1 Εισαγωγή</b> .....	7
1.1 Το BSG ως θρεπτικό υπόστρωμα σε ζυμώσεις.....	9
1.2 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....	11
1.3 Η ζύμη <i>Rhodotorula</i> .....	14
1.4 Παραγωγή καροτενοειδών.....	15
1.5 Βιοχημεία βιοσύνθεσης καροτενοειδών.....	16
<b>1.6 Βιοχημεία και φυσιολογία των ελαιογόνων μικροοργανισμών</b> .....	19
1.7 Σκοπός.....	24
<b>2 Υλικά και μέθοδοι</b> .....	25
2.1 Βιολογικό υλικό.....	25
2.2 Θρεπτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας.....	25
2.2.1 Καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες.....	26
2.3 Χημικές αναλύσεις και προσδιορισμοί.....	28
2.3.1 Συλλογή καλλιέργειας.....	28
2.3.2 Προσδιορισμός βιομάζας.....	28
2.3.3 Προσδιορισμός Αναγωγικών Σακχάρων (DNS analysis).....	29
2.3.4 Προσδιορισμός λιπιδίων.....	29
2.3.5 Εκχύλιση των λιπιδίων.....	29
<b>3 Αποτελέσματα</b> .....	30
3.1 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhodotorula Kratochvilovae</i> EXF-3741 σε γλυκόζη και σε BSG ..	30
3.2 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> EXF-8984 σε γλυκόζη και σε BSG .....	32
3.3 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhodotorula musilaginosa</i> EXF-9791 σε γλυκόζη και σε BSG .....	33
3.4 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhodotorula diobovata</i> EXF-6843 σε γλυκόζη και σε BSG.....	35
3.5 Άρωμα εσπεριδοειδών.....	36
3.6 Παρατήρηση εξωγλυκολιπιδίων.....	36
<b>4 Συζήτηση</b> .....	37
<b>5 Βιβλιογραφία</b> .....	40

## Περίληψη

Οι περιβαλλοντικές και κοινωνικές ανησυχίες που συνδέονται με την παραγωγή αποβλήτων, τη μείωση των πρωτογενών πόρων, τη βιωσιμότητα και θέματα ασφάλειας των τροφίμων, έχουν οδηγήσει πολλές βιομηχανίες στην αναζήτηση καινοτόμων και ελκυστικών τρόπων διαχείρισης των αποβλήτων τους. Η κυκλική οικονομία αποτελεί μία από τις πιο ελπιδοφόρες προσπάθειες για την ενσωμάτωση των περιβαλλοντικών και των οικονομικών οφελών.

Γεωργο-βιομηχανικά υποπροϊόντα χαμηλής ή αρνητικής αξίας είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα σε διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η καλλιέργεια 4 στελεχών του γένους *Rhodotorula* σε υπόστρωμα με βάση παραπροϊόντα της ζυθοποιίας για την παραγωγή μικροβιακού ελαίου σε ζύμωση υγρής κατάστασης.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η δυνατότητα συσσώρευσης λιπιδίων αξιοποιώντας ανανεώσιμες πρώτες ύλες προερχόμενες από την βιομηχανία ζυθοποιίας και πιο συγκεκριμένα τα στερεά απόβλητα που προκύπτουν από την σακχαροποίηση των βυνών (Brewers' spent grain – BSG). Το BSG μετατράπηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης μέσω παραλαβής του κλάσματος των ελεύθερων σακχάρων.

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε υποστρώματα BSG και γλυκόζης ήταν τα *Rhodotorula kratochvilovae* EXF-3471, *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-9791, *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-8984 και *Rhodotorula diobovata* EXF-6843 σε θερμοκρασία 28 °C και κάθε 24 ώρες λαμβανόταν δείγμα από τις κωνικές φιάλες. Το πιο αποτελεσματικό στέλεχος σε συσσώρευση λιπιδίων σε υπόστρωμα γλυκόζης ήταν η *R. Musilaginosa* EXF-9791 με ποσοστό 43% σε 144h ενώ σε παραγωγή βιομάζας η *Rhodotorula Diobovata* με 12,65 g/L σε 240h. Το πιο αποτελεσματικό στέλεχος σε συσσώρευση λιπιδίων και παραγωγής βιομάζας σε υπόστρωμα BSG ήταν η *R. Musilaginosa* EXF-9791 με ποσοστό συσσώρευσης 32% σε 240h και παραγωγή βιομάζας 10,9 g/L.

## Abstract

Environmental and societal concerns interlinked with waste generation, the decrease of primary resources, sustainability and food safety issues have gradually led many industries to seek innovative and attractive ways to manage their waste. The circular economy is one of the most promising alternatives to integrate environmental and economic benefits.

Agricultural and industrial by-products of low or even negative value can be employed as carbon source in various biotechnological applications. The aim of this study was the production of single cell oils in solid state fermentation by cultivating 4 strains of the oleaginous fungus *Rhodotorula* on a substrate based on pear cannery by products.

This study evaluated the lipid production valorizing renewable feedstock derived from the brewing industry and more specifically the solid waste stream that is generated from the saccharification of malts (Brewers' spent grain-BSG). BSG was converted into a nutrient rich fermentation media, via the preparation of liquid fractions rich in free sugars.

The strains *Rhodotorula Kratochvilovae* EXF-3471, *Rhodotorula Mucilaginosa* EXF-9791, *Rhodotorula Mucilaginosa* EXF-8384 and *Rhodotorula Diobovata* EXF-6843 were cultivated on a BSG and glyucose substance at 28 °C. Under these conditions the microorganism that produced more lipids in glyucose substance were *R. Musilaginosa* EXF-9791 at rate of 43% in 144h and biomass production by *Rhodotorula Diobovata* EXF-6843 12,65 g/L in 240h. The strain that produced more lipids and biomass on a BSG substance were *R. Musilaginosa* EXF-9791 at rate of 32% in 240h and biomass 10,9 g/L.

# 1 Εισαγωγή

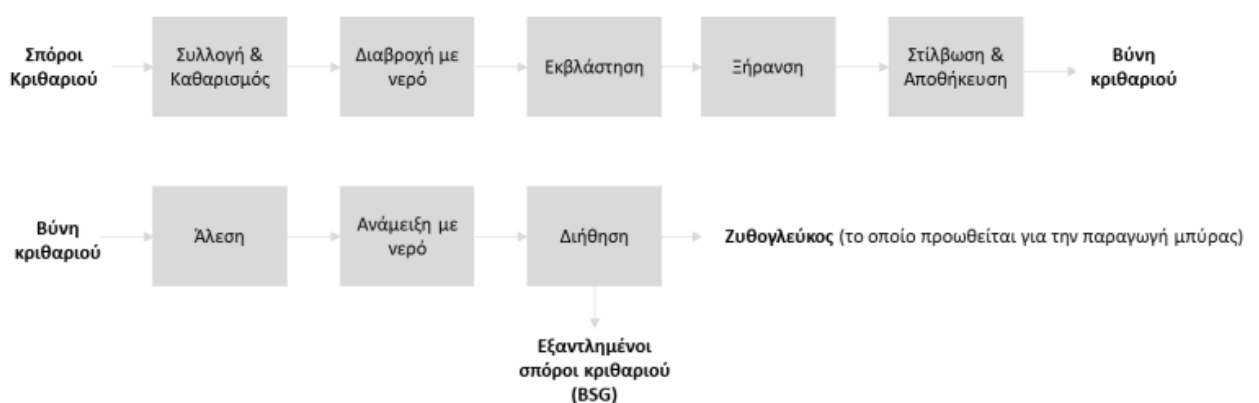
Τα τελευταία χρόνια ο αριθμός των παραγόμενων αποβλήτων από τις αγροβιομηχανίες έχει αυξηθεί παγκοσμίως. Η βιομηχανία ζυθοποιίας αποφέρει υγρά αλλά και στερεά απόβλητα καθώς και υποπροϊόντα και εκπομπές στην ατμόσφαιρα τα οποία αποτελούν σοβαρές περιβαλλοντικές προκλήσεις (Olajire 2020). Λόγω των οργανικών ενώσεων και των διάφορων χημικών που χρησιμοποιούνται στα διάφορα στάδια παραγωγής, επεξεργασίας και ζύμωσης της πρώτης ύλης όπως ο λυκίσκος, η βύνη παράγονται πολλά παραπροϊόντα εκ των οποίων κάποια είναι επαναχρησιμοποιήσιμα και κάποια δεν είναι (Thiago, Pedro, and Eliana 2014).

Ένα από τα σημαντικότερα παραπροϊόντα από τη βιομηχανία της ζυθοποιίας είναι τα υπολείμματα βύνης (Brewer's Spent Grain (BSG)) όπου προκύπτει ύστερα από την σακχαροποίηση των βυνών, αποτελούμενο κυρίως από τον φλοιό των κόκκων του κριθαριού (Färcaş κ.ά. 2017; Bamforth 2017). Σύμφωνα με τον FAO (<http://faostat.fao.org/>) περισσότεροι από 176 εκατομμύρια τόνοι μύρας από κριθάρι παρήχθησαν παγκοσμίως το 2008 και περίπου 168 εκατομμύρια τόνοι το 2009. Η BSG αντιπροσωπεύει περίπου το 85% w/w του συνολικού στερεού -προϊόντα (αναλωθέντα σιτηρά, κορμός, αναλωμένος λυκίσκος, χρησιμοποιημένη μαγιά και ιλύς γαιών διατόμων από διήθηση) που παράγονται κατά τη διαδικασία παρασκευής και αντιστοιχούν σε ετήσια παραγωγή άνω των 34 εκατομμυρίων τόνων υγρού BSG (8,5 εκατομμύρια τόνοι ξηρού BSG). Πιο συγκεκριμένα, σχεδόν 3,4 εκατομμύρια τόνοι παράγονται ετησίως από τη βιομηχανία ζυθοποιίας στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Stojceska και Ainsworth 2008).

Το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο ενέκρινε πρόσφατα μέτρα στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας (Απρίλιος 2018), θέτοντας στόχους για την ανακύκλωση των αποβλήτων και τη μείωση της υγειονομικής ταφής. Τα κράτη μέλη θα πρέπει να διασφαλίσουν ότι, έως το 2030, τα απόβλητα που είναι κατάλληλα για ανακύκλωση ή άλλη ανάκτηση, δεν θα επιτρέπεται να διατίθενται προς απόρριψη. Η οδηγία 2018/851 απαιτεί από τα κράτη μέλη να βελτιώσουν τα συστήματα διαχείρισης αποβλήτων, να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της χρήσης των πόρων και να διασφαλίσουν ότι τα απόβλητα θα εκτιμώνται και θα αντιμετωπίζονται ως πρώτη ύλη.

Η μύρα είναι ένα από τα πιο δημοφιλή αλκοολούχα ποτά παγκοσμίως και είναι το τρίτο ποτό σε κατανάλωση μετά το νερό και το τσάι. Η διαδικασία παραγωγής μύρας είναι μια διαδικασία ζύμωσης που εκτελείται από μικροοργανισμούς, πιο συγκεκριμένα, ζυμομύκητες, και αποτελείται από τέσσερα κύρια στάδια σύμφωνα με τον Mussatto (2009): άλεσμα, πολτοποίηση, βρασμός και ζύμωση. Οι κόκκοι κριθαριού αλέθονται στο στάδιο άλεσης για να εκτεθούν τα ένζυμα και να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής για τα επόμενα βήματα. Ο αλεσμένος κόκκος βύνης κριθαριού αναμειγνύεται με νερό και θερμαίνεται σταδιακά κάτω από προκαθορισμένες συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Ο σκοπός της πολτοποίησης (mashing) είναι η υδρόλυση της βύνης σε ζυμώσιμα σάκχαρα από συγκεκριμένα ένζυμα, όπως η α-αμυλάση και η β-αμυλάση, που περιέχονται στον κόκκο και ενεργοποιούνται μέσω της αύξησης της υγρασίας και της θερμοκρασίας (S. I. Mussatto, Dragone, και Roberto 2006). Μετά από αυτό, η υγρή φάση διαχωρίζεται από τους χρησιμοποιημένους κόκκους βύνης και ζυθογλεύκος, το οποίο στη συνέχεια εισέρχεται στο στάδιο του βρασμού.

Οι κύριοι στόχοι του βρασμού είναι η εξάτμιση πτητικών ουσιών με ανεπιθύμητη γεύση, η αποστείρωση του ζυθογλεύκους, η ενζυματική αδρανοποίηση, ο σχηματισμός χρώματος και γεύσης. Τέλος, στο στάδιο της ζύμωσης είναι αυτό όπου τα σάκχαρα μετατρέπονται από τη μαγιά σε αιθανόλη, CO<sub>2</sub> και σε άλλα υποπροϊόντα. Στη συνέχεια, μετά τη ζύμωση, η μύρα περνάει από τα στάδια ωρίμανσης και καθαρισμού για να είναι έτοιμη για κατανάλωση (Wunderlich και Back 2009; Linko κ.ά. 1998; Solange I. Mussatto 2009). Η συγκεκριμένη διαδικασία παρουσιάζεται σχεδιαγραμματικά στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Διαδικασία παραγωγής BSG από φυσικό κριθάρι (‘ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ - ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ.pdf’ χ.χ.)



Παρόλο που η βύνη θεωρείται απόβλητο για τη βιομηχανία, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον τομέα της βιοτεχνολογίας καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (S. I. Mussatto, Dragone, και Roberto 2006).

### 1.1 Το BSG ως θρεπτικό υπόστρωμα σε ζυμώσεις

Η περιεκτικότητα του BSG σε νερό είναι 70–90% τυπικά και αποτελείται ουσιαστικά από φλοιούς κόκκων κριθαριού και κάποιο υπολειμματικό αμυλούχο ενδοσπέρμιο, ωστόσο, μπορούν επίσης να υπάρχουν μη βυνοποιημένα δημητριακά. Η βύνη, εξ ορισμού, είναι ο κόκκος κριθαριού που υποβάλλεται σε ελεγχόμενη διαδικασία βλάστησης και ξήρανσης. Αποτελεί ένα ινώδες υπόλειμμα πλούσιο σε κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη και υπολογίζεται ότι η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη αντιπροσωπεύουν περίπου το 50% (w/w) (Jacometti κ.ά. 2015; Reis και Menezes 2017; S. I. Mussatto, Dragone, και Roberto 2006). Η λιγνίνη αποτελείται κυρίως από φαινολικές ενώσεις όπως τα οξέα φερουλικό, π-κουμαρικό, συρίγγιο, βανιλικό και π-υδροξυβενζοϊκό (S. I. Mussatto, Dragone, και Roberto 2007; Ikram κ.ά. 2017). Οι επιστήμονες παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον για τις φαινολικές ενώσεις λόγω της επιρροής τους στην ποιότητα των τροφίμων και του προστατευτικού ρόλου που έχουν στην παθογένεση ορισμένων ασθενειών (Shahidi και Naczki 2003). Λιπίδια, πρωτεΐνες και μέταλλα, ιδιαίτερα το πυρίτιο, ο φώσφορος, το ασβέστιο, το μαγνήσιο και το θείο υπάρχουν επίσης στη σύνθεσή τους. Παρεμπιπτόντως, λόγω των χημικών χαρακτηριστικών του, ιδιαίτερα της πλούσιας περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες, η οποία ποικίλλει (10–30%), ανάλογα με την τεχνολογία παρασκευής, τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται και την πηγή βύνης/μπύρας (Robertson κ.ά. 2010), το BSG προορίζεται γενικά για ζωοτροφές. Το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών είναι ορδεΐνες (προλαμίνες στο κριθάρι), γλουτελίνες, σφαιρίνες και λευκωματίνες με ορδεΐνες (Celus, Brijs, και Delcour 2006). Κατά τη διαδικασία παρασκευής, τα περισσότερα από αυτά παραμένουν στο BSG καθώς βρίσκονται μέσα στα κύτταρα και στα αμυλώδη θραύσματα του ενδοσπερμίου. Η λιγνίνη αντιπροσωπεύει περίπου το 15-25% του συνολικού ξηρού βάρους, ενώ η περιεκτικότητα σε άμυλο παραμένει στις περισσότερες περιπτώσεις κάτω από 5%.

Σύμφωνα με τους Nigam et al (2017), η υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία του BSG (~80%) που σχετίζεται με την παρουσία ζυμώσιμων σακχάρων το καθιστά ευαίσθητο στη μικροβιακή ανάπτυξη, δηλαδή στην αλλοίωση σε σύντομο χρονικό διάστημα αποθήκευσης

7-10 ημερών. Επομένως, συνιστάται η καθιέρωση μιας διαδικασίας διατήρησης του υγρού BSG (π.χ. ψύξη, ξήρανση) όταν δεν είναι δυνατή η άμεση χρήση.

Εκτός από την παραγωγή ζωοτροφών, το BSG αξιοποιείται για την παραγωγή βιοαερίου και βιοαιθανόλης. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια άλλη προσέγγιση για την χρήση του, όπως η προτίμησή του ως θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, ενζύμων, οργανικών οξέων, πολυολών και άλλων βιομεταβολητών (Ikram κ.ά. 2017).

Όσον αφορά την αξιοποίησή του ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια μυκήτων, βακτηρίων και μανιταριών λόγω των φυσικών του ιδιοτήτων όπως το μέγεθος σωματιδίων, το βάρος όγκου, η ειδική πυκνότητα, το πορώδες και η ικανότητα συγκράτησης νερού (το μέγεθος των σωματιδίων ποικίλλει από 2 έως 5  $\mu\text{M}$ ). Επιπλέον, η υψηλή περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες, μέταλλα και πρωτεΐνες καθιστούν το BSG ικανό να υποστηρίξει την καλλιέργεια πολλών μικροοργανισμών ως επαρκή πηγή για τα περισσότερα απαραίτητα συστατικά, υπό διάφορες συνθήκες καλλιέργειας. Οι περισσότερες από αυτές τις προσπάθειες στόχευαν στην παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων όπως αμυλάσες, κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και πρωτεάσες. Το τελευταίο καιρό σε αυτές τις προσπάθειες συγκαταλέγονται και η παραγωγή βακτηριακής κυτταρίνης καθώς και μικροβιακού λίπους.

Μερικά παραδείγματα αξιοποίησης του BSG είναι από τη ζύμη *Rhodospiridium toruloides* για την παραγωγή μικροβιακού λίπους με τα αποτελέσματα να δείχνουν την παραγωγή μικροβιακού λίπους  $10,41 \pm 0.34$  g/L ενώ την παραγωγή βιομάζας  $18.44 \pm 0.96$  g/L (Patel κ.ά. 2018) καθώς και οι Sae-ngae κ.ά. (2019) αξιοποίησαν το συγκεκριμένο απόβλητο με διαφορετικές ζύμες όπως την *Trichosporonoides spathulata* JU4-57, *Rhodotorula mucilaginosa* G43 και την *Yarrowia lipolytica* TISTR 5151 . Τέλος γίναν μελέτες από τους Pathania, Sharma, και Kumari (2018) για την παραγωγή κιτρικού οξέος, από τον *Aspergillus niger*.

## 1.2 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Η ικανότητα σύνθεσης λιπιδίων υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς της φύσης. Τα λιπίδια, όπως τα φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια, γλυκολιπίδια, εξυπηρετούν κυρίως δομικές λειτουργίες, όπως η σύνθεση κυτταροπλασματικών μεμβρανών και η δυνατότητα σύνθεσης πρωτεϊνών που σχετίζονται με βιολογικές μεμβράνες και άλλες κυτταρικές δομές. Επιπλέον, τα λιπίδια λειτουργούν ως αποθεματική μορφή ενέργειας σε πολλούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Επομένως, η βιοσύνθεση των λιπιδίων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ύπαρξη ζωής (Georgiou και Deamer 2014). Υπάρχουν μικροοργανισμοί (μύκητες, ζύμες και μικροφύκη) που όταν αναπτύσσονται υπό συγκεκριμένες συνθήκες, που αφορούν την ποσότητα και το είδος της πηγής άνθρακα και αζώτου στο μέσο ανάπτυξης, τη θερμοκρασία, την ενεργό οξύτητα, τη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου κ.ά., σημειώνουν υψηλές επιδόσεις στη συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων, με τον πιο σημαντικό, να είναι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου (Rakicka κ.ά. 2015).

Οι ελαιογόνοι είναι κατηγορία μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά αποθεματικά λιπίδια σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% επί της ξηρής τους βιομάζας. Στην πραγματικότητα, μπορούν να συσσωρεύσουν περισσότερο από το 20% της ξηρής βιομάζας τους ως λιπίδια, με ορισμένες περιπτώσεις να φτάνουν έως και το 70%. Λόγω αυτού του χαρακτηριστικού αποτελούν κύριο στοιχείο ερευνάς και εφαρμογής στον τομέα της βιοτεχνολογίας (Probst κ.ά. 2016; C. Ratledge 1994; Papanikolaou και Aggelis 2011).

Τα μικροβιακά λιπίδια έχει επικρατήσει να περιγράφονται με τον όρο «έλαια μονοκύτταρων μικροοργανισμών» (Single Cell Oils, SCOs), κατ' αντιστοιχία με τον όρο πρωτεΐνη μονοκύτταρων μικροοργανισμών (Single Cell Protein). Το μικροβιακό έλαιο, συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά υπό μορφή λιπιδιακών σταγονιδίων (Lipid Droplets, LDs), τα οποία περιβάλλονται από μονοστιβάδα φωσφολιπιδίων (Carus κ.ά. 2016) και αποτελούνται σε ποσοστό 80% από τριγλυκερίδια (Triacylglycerols-TAGs) και δευτερευόντως από ελεύθερα λιπαρά οξέα, ουδέτερα λιπίδια όπως μονο-, δι-γλυκερίδια, στερυλεστέρες και στερόλες (Athenstaedt κ.ά. 2006). Η ικανότητα ελαιογένεσης συναντάται σε όλες τις κατηγορίες μικροοργανισμών (ζύμες, μύκητες, μικροφύκη και βακτήρια), με τις ζύμες να θεωρούνται οι

κατεξοχήν ελαιογόνοι μικροοργανισμοί. Μερικοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρευτούν SCOs πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids-PUFAs) (Kavadia κ.ά. 2001; Jahurul κ.ά. 2013; Papanikolaou και Aggelis 2011).

Τα μικροβιακά έλαια (Single-Cell Oils, SCOs) ορισμένες φορές είναι ιδιαίτερα πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs) υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι ζύμες, αν και θεωρούνται οι κατεξοχήν ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, κυρίως συσσωρεύουν C16:0 και C18:1 (παλμιτικό και ελαϊκό οξύ), λιπαρά οξέα χωρίς ιδιαίτερο εμπορικό ενδιαφέρον. Ωστόσο, η σύσταση των τριγλυκεριδίων που παράγουν είναι φυτικού τύπου, ενώ υπό ορισμένες συνθήκες ομοιάζει αυτής των τριγλυκεριδίων του λίπους του κακάο (Papanikolaou κ.ά. 2003). Αντίθετα τα έλαια των μυκήτων, ειδικά των Ζυγομυκήτων (π.χ. *Umbelopsis isabellina*, *Mortierella alpina*), είναι πλούσια σε PUFAs, C18 (α-λινολενικό οξύ, γ-λινολενικό οξύ) και C20 λιπαρά οξέα (αραχιδονικό οξύ, εικοσιπεντενοϊκό οξύ) (Certik και Shimizu 1999; Chatzifragkou κ.ά. 2010). Γενικά, τα λιπίδια που συσσωρεύουν οι ελαιογόνοι μύκητες είναι περισσότερο ακόρεστα από αυτά που συσσωρεύουν οι ζύμες. Παραγωγοί PUFAs θεωρούνται και τα μικροφύκη, που βιοσυνθέτουν λιπαρά οξέα όπως το εικοσιπεντανοϊκό (EPA) και το εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA), παρόλο που συσσωρεύουν αποθεματικά λιπίδια σε μικρότερα ποσοστά. Τα PUFAs που παράγονται από τα μικροφύκη είναι μεγάλου διατροφικού και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος και όχι τα λιπαρά οξέα από τα ψάρια όπως ευρέως πιστεύεται. Αυτά τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται στην κλινική διατροφή και ως πρώτες ύλες για την παρασκευή ειδικών τροφών και καλλυντικών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί μελετώνται για την αξιοποίησή τους για παραγωγή βιοντίζελ και βιολιπαντικών αυξάνοντας το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον που έχουν, προσπαθώντας να μειώσουν το κόστος παραγωγής τους. (Sarris και Papanikolaou 2016; Bellou κ.ά. 2016; Angerbauer κ.ά. 2008; Yousuf κ.ά. 2010).

Οι πιο γνωστές ζύμες οι οποίες μπορούν και συσσωρεύουν λίπος, ανήκουν στα γένη *Candida*, *Rhodotorula*, *Lipomyces* και στο είδος *Yarrowia lipolytica* (C. Ratledge 1994; Papanikolaou κ.ά. 2003). Οι μύκητες που έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον των ερευνητών είναι οι Zygomycetes που ανήκουν στην τάξη των Mucorales (*Mucor circinelloides*,

Cunninghamella echinulate)(Certik & Shimizu 1999; Fakas et al. 2007). Ειδικότερα του γένους *Mortiella* (*M. alpina*, *M. elongata*, *M. hyalhne*, *M. isabellina*) που αποτελούν πηγές παραγωγής C18και C20 λιπαρών οξέων. (Chatzifragkou et al. 2010; Fakas, Papanikolaou, et al. 2009; Fakas, Makri, et al. 2009). Το ενδιαφέρον των ελαιογόνων μικροοργανισμών προέρχεται από το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους να αναπτύσσονται, να αφομοιώνουν και να αξιοποιούν πολλές διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή κυτταρικής μάζας και λιπιδίων. Αυτά τα υποστρώματα, είναι γεωργο-βιομηχανικά παρα- ή υποπροϊόντα όπως η γλυκερόλη, απόβλητα κομποστοποιίας, ζυθοποιίας, ελαιοτριβείου. Τα μετατρέπουν σε βιοπροϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως οργανικά οξέα, ένζυμα, μικροβιακές πρωτεΐνες και λιπίδια (Aggelis κ.ά. 2003; Arous κ.ά. 2016; Fakas, Papanikolaou, κ.ά. 2009)Επίσης, υπάρχουν και μερικά ελαιογόνα μικροφύκη όπως το *Chlorella minutissima*, *Chorella* sp. κ.ά., τα οποία βιοσυνθέτουν λιπαρά οξέα όπως το εικοσιπεντανοϊκό και το εικοσιδυοεξανικό οξύ. Μεταξύ των ελαιογόνων, συγκαταλέγονται και μερικά είδη από μικροφύκη όπως το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis*, *Chlorella minutissima* τα οποία συνθέτουν λιπαρά οξέα όπως το εικοσιπεντανοϊκό και το εικοσιδυοεξανικό οξύ (Bellou, Baeshen, et al. 2014; Bellou, Makri, et al. 2014; Bellou & Aggelis 2013) .

Πάραυτα το κόστος παραγωγής είναι αρκετά υψηλό, συγκριτικά με αυτό των φυτικών ελαίων, καθώς για την καλλιέργεια ελαιογόνων μικροοργανισμών και κυρίως των ετερότροφων, απαιτούνται ασηπτικές συνθήκες (Colin Ratledge και Cohen 2008). Επομένως, η περαιτέρω έρευνα καθίσταται απαραίτητη για τη διαμόρφωση συνθηκών που θα μειώνουν το κόστος, βελτιστοποιώντας παράλληλα τις αποδόσεις στα επιθυμητά προϊόντα.

### 1.3 Η ζύμη *Rhodotorula*

Το γένος *Rhodotorula* περιλαμβάνει την κατηγορία κόκκινων ζυμών, ανήκει στο φύλο Basidiomycota, στην τάξη Sporidiobolales και στη κατηγορία Microbotryomycetes. Μπορεί να αναγνωρισθεί εύκολα αφού όταν αναπτύσσεται σε υπόστρωμα με άγαρ δεξτρόζης (Sabouraud's Dextrose Agar, SDA), οι αποικίες της εμφανίζουν ένα πορτοκαλί/κόκκινο χρώμα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2. Μπορούν να αναπτυχθούν σε αντίξοες συνθήκες και για αυτό μπορούν να απομονωθούν σε νερό, φυτά στον αέρα και στο έδαφος ακόμα και στο ανθρώπινο δέρμα (Wirth και Goldani 2012). Οι αποικίες της συγκεκριμένου είδους ζύμης έχουν αυτό το χρώμα, λόγω των καροτενοειδών που παράγουν όταν αναπτύσσονται και τις προστατεύουν από το UV φως και από το οξειδωτικό στρες (Hernández-Almanza κ.ά. 2014; Dworecka-Kaszak και Kizerwetter-Świda, χ.χ.).



Εικόνα 2 : καλλιέργεια κόκκινης ζύμης σε τρυβλίο με υπόστρωμα PDA (Potato Dextrose Agar)

Η πλειονότητα των ζυμών του γένους δεν εμφανίζει παθογόνες ιδιότητες, αν και ανάμεσά τους βρίσκονται ευκαιριακά παθογόνα, τα οποία προκαλούν δερματοφυτώσεις και αναφέρονται ως ροδοτορούλωση. Οι πιο συνηθισμένοι αιτιολογικοί παράγοντες αυτών των λοιμώξεων είναι τα στελέχη του είδους *Rhodotorula mucilaginosa* (Biswas κ.ά. 2001).

Μέχρι πρόσφατα, οι ζύμες του γένους *Rhodotorula* θεωρούνταν κυρίως σαπρόφυτα που αλλοιώνουν τα τρόφιμα. Πρόσφατα, έχει δημοσιευθεί μεγάλος αριθμός μελετών σχετικά με τις βιοτεχνολογικές χρήσεις αυτών των ζυμομυκήτων, οι οποίες υποδηλώνουν ότι μπορεί να αποτελούν σημαντική ομάδα μικροοργανισμών που μπορεί να έχουν σημασία στις βιομηχανίες στο μέλλον (Kot κ.ά. 2016).

Η πλειοψηφία των ζυμών που περιλαμβάνονται στο είδος είναι μεσόφιλες, αν και μερικές από αυτές ευδοκιμούν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και αερόβιες συνθήκες. Τα κύτταρα

έχουν σχήμα σφαιρικό, ελλειψοειδές ή επίμηκες. Ορισμένα στελέχη σχηματίζουν υπολειμματικό ψευδομυκήλιο, όπως η *R. mucilaginosa* (Statzell-Tallman και Fell 1998).

Το πιο τυπικό είδος αυτού του γένους είναι η *Rhodototula glutinis*, καθώς και αυτές οι ζύμες είναι ικανές να συνθέσουν πολυάριθμους μεταβολίτες χρήσιμους στις βιομηχανίες, όπως λιπίδια, καροτενοειδή και ένζυμα. Το σαφές πλεονέκτημά τους είναι η ικανότητά τους να αναπτύσσουν και να συνθέτουν μεταβολίτες σε υποστρώματα που περιέχουν διαφορετικά βιομηχανικά απόβλητα πρώτων υλών, γεγονός που αυξάνει σημαντικά την οικονομική κερδοφορία των βιοτεχνολογικών διεργασιών. Ωστόσο, μετά από αρκετές μελέτες εκμετάλλευσης βιομηχανικών αποβλήτων από διάφορα στελέχη για παραγωγή λιπιδίων, σε αυτές τις ζύμες συγκαταλέγονται πλέον και το γένος *Rhodotorula* (*Rhodospiridium*) *toruloides* (Easterling κ.ά. 2009; Liu κ.ά. 2009)

Τα είδη *Rhodotorula* είναι αυστηρές αερόβιες ζυμομύκητες με ιδιαίτερα μεταβολικά χαρακτηριστικά, όπως η ικανότητα παραγωγής γλυκογόνου κατά τη φάση της εκθετικής ανάπτυξης και επίσης, μεγάλες ποσότητες λιπιδίων και καροτενοειδών χρωστικών κατά τη φάση στατικής ανάπτυξης (Hernández-Almanza κ.ά. 2014).

#### 1.4 Παραγωγή καροτενοειδών

Τα καροτενοειδή ανήκουν στην ομάδα των φυσικών χρωστικών που βρίσκονται στα φρούτα, τα λαχανικά, τα ψάρια, τα αυγά και το λάδι (Rao και Rao 2007). Επιπλέον, συντίθενται από ορισμένους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένης τη ζύμη *Rhodotorula* spp. (Perrier, Dubreucq, και Galzy 1995). Χαρακτηρίζονται από κίτρινο, πορτοκαλί ή κόκκινο χρώμα. Μέχρι τώρα, έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 750 ενώσεις αυτού του τύπου (Maoka 2011), από τις οποίες 50 ενώσεις εμφανίζουν δράση προβιταμίνης A (Fraser και Bramley 2004). Οι ανθρώπινος οργανισμός δεν είναι ικανός να βιοσυνθέτει καροτενοειδή, και ως εκ τούτου, πρέπει να τροφοδοτούνται με αυτά μέσω διαίτας (Woodside κ.ά. 2015). Αυτές οι ενώσεις είναι ευδιάλυτες σε λιπαρό περιβάλλον αλλά αδιάλυτες στο νερό. Τα καροτενοειδή παρουσιάζουν δράση προαγωγής της υγείας προς το ανθρώπινο σώμα, χάρη στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, προστατεύουν το δέρμα από την υπεριώδη ακτινοβολία, έχουν αντιοξειδωτική δράση κατά των ελεύθερων ριζών καθώς και των ενεργών ειδών

οξυγόνου. Ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα και επιταχύνουν την επούλωση των πληγών. Ορισμένα καροτενοειδή μπορεί να είναι προστατευτικά σε οφθαλμικές παθήσεις επειδή αποτελούν πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης A (Rao και Rao 2007; Krinsky και Johnson 2005).

Τα καροτενοειδή χρησιμοποιούνται σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς ως συστατικά καλλυντικών (Anunciato και da Rocha Filho 2012) και πρόσθετα σε ζωοτροφές για ζώα (Chatzifragkou κ.ά. 2010) και ψάρια (Gouveia κ.ά. 2003). Χρησιμοποιούνται επίσης και στην βιομηχανία τροφίμων ως χρωστικές ουσίες (Carocho, Morales, και Ferreira 2015). Σύμφωνα με τα στοιχεία που δημοσιεύθηκαν στην έκθεση «The Global Market for Carotenoids» το 2022, η παγκόσμια αγορά καροτενοειδών έχει επιτύχει αξία 2 δισ. USD και προβλέπεται ότι το 2027 θα αυξηθεί σε 2,7 δισ. USD ('Global Carotenoids Market Size, Share & Growth Analysis Report' χ.χ.)

Η αυξανόμενη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σχετικά με την αρνητική επίδραση των συνθετικών χρωστικών στην ανθρώπινη υγεία και στην τάση της υγιεινής διατροφής προκαλεί μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τις φυσικές χρωστικές ('IJFANS International Journal of Food and Nutritional Sciences' χ.χ.). Η χρήση μικροοργανισμών ως βιοαντιδραστήρες για την παραγωγή καροτενοειδών μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική για τη χημική σύνθεση αυτών (Del Campo, García-González, και Guerrero 2007). Η μικροβιολογική σύνθεση είναι μια πιο αποτελεσματική μέθοδος σε σύγκριση με την εκχύλιση από λαχανικά ή τη χημική σύνθεση. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της διαδικασίας περιλαμβάνουν τη δυνατότητα μείωσης του κόστους παραγωγής, με τη χρήση βελτιωμένων στελεχών και φθηνών, συχνά αποβλήτων, πηγών άνθρακα και αζώτου στα μέσα καλλιέργειας (Buzzini 2000).

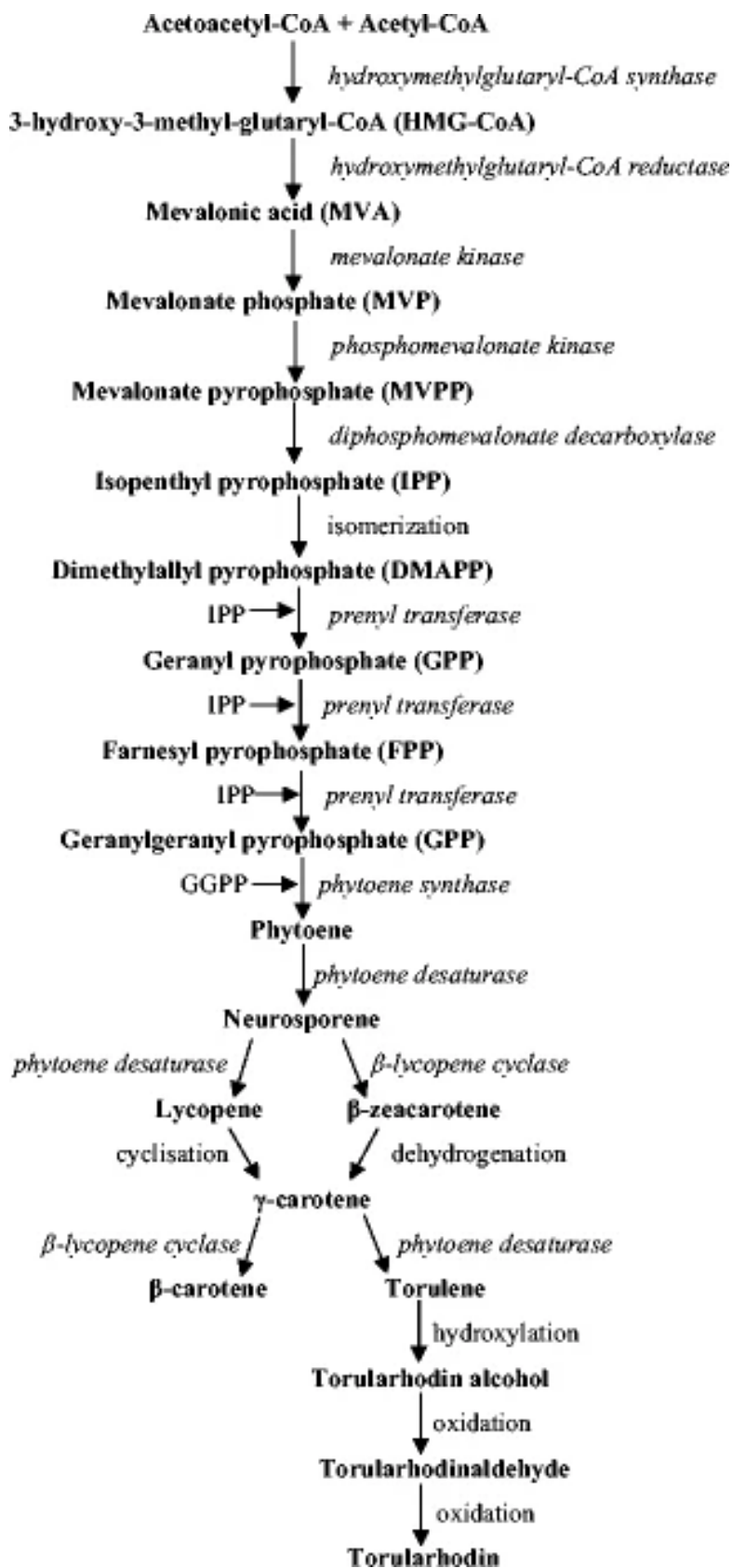
### 1.5 Βιοχημεία βιοσύνθεσης καροτενοειδών

Τα γένη της *Rhodotorula* είναι ικανά να συνθέτουν β-καροτένιο, τορουλένιο και τορουλαροδίνη, το ποσοστό των οποίων εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας (Latha κ.ά. 2005). Το πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης καροτενοειδών περιλαμβάνει του ακέτυλ-ΣυνένζυμοΑ (ακετυλ-CoA) σε 3-υδροξυ-3-μεθυλγλουταρυλ-CoA με τη συμμετοχή της συνθάσης υδροξυμεθυλγλουταρυλ-CoA (HMG-CoA). Στη συνέχεια, το HMG-CoA μετασχηματίζεται σε μεβαλονικό οξύ (MVA) με ειδική αναγωγή. Ως αποτέλεσμα επακόλουθων αλλαγών, η ένωση υποβάλλεται σε φωσφορυλίωση σε μια αντίδραση που



καταλύεται από ειδικές κινάσες και αποκαρβοξυλίωση σε διφωσφορικό ισοπεντενυλεστέρα (IPP). Η αντίδραση ισομερισμού IPP οδηγεί στον σχηματισμό του πυροφωσφορικού διμεθυλαλλυλεστέρα (DMAPP) και στη συνέχεια στο DMAPP ως αποτέλεσμα αντίδρασης προσθήκης τριών μορίων IPP. Αυτές οι αντιδράσεις οδηγούν στον σχηματισμό πυροφωσφορικού γερανυλγερανυλεστέρα (GGPP) που περιέχει 20 άτομα άνθρακα. Η συμπύκνωση δύο μορίων GGPP καταλύεται από τη συνθάση φυτοενίου, οδηγώντας στο σχηματισμό φυτοενίου (το πρώτο προϊόν 40 άνθραστουζτης οδού). Αυτή η ένωση στη συνέχεια μετατρέπεται σε νευροσπορένιο με τη συμμετοχή της δεσατουράσης φυτοενίου. Το μόριο νευροσπορένιο μπορεί να μετασχηματιστεί σε λυκοπένιο ή β-ζεακαροτένιο (Simpson, Nakayama, και Chichester 1964; Hayman κ.ά. 1974; Goodwin 1980). Μια δεύτερη αντίδραση πιθανώς λαμβάνει χώρα λόγω της παρουσίας στουςτολέων, όπως η διφαινυλαμίνη ή στην περίπτωση του περιβαλλοντικού στρες (Johnson και Lewis 1979). Στη συνέχεια σχηματίζεται γ-καροτένιστους αποτέλεσμα της κυκλοποίησης του λυκοπενίου. Αυτή η ένωση μπορεί να παραχθεί σε στουςα ζυμομύκστους επίσης ως αποτέλεσμα της αντίδρασης αφυδρογόνωσης β-ζεακαροτίνης (Hayman κ.ά. 1974). Η αντίδραση κυκλοποίησης της γ-καροτίνης, που καταλύεται από τη β-λυκοπενική κυκστους, οδηγεί στο σχηματισμό ενός μορίου β-καροτίνης. Επιπλέον, το μόριστους-καροτίνης αποτελεί πρόδρομο της σύνθεσης τορουλενίου. Το Torularhodin παράγεται ως αποτέλεσμα περαιτέρω μετασχηματισμών του τορουλενίου, που συνίστανται σε αντιδράσεις υδροξυλίωσης και οξυγόνωσης (Goodwin 1980).

Η παραπάνω διαδικασία αποτυπώνεται στην Εικόνα 3:



Εικόνα 3 Βιοσυνθετική οδός καροτενοειδών στα είδη ζύμης *Rhodotorula* (Κοτ κ.ά. 2016)

## 1.6 Βιοχημεία και φυσιολογία των ελαιογόνων μικροοργανισμών

Όλοι οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συνθέσουν λιπίδια, αν και μόνο οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρεύουν μέσα στα κύτταρά τους σημαντικές ποσότητες λιπιδίων. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί δεν διαθέτουν το υπερδραστήριο σύστημα βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, αλλά έχουν την ικανότητα να παράγουν μεγάλες ποσότητες ακετυλο-CoA, το οποίο είναι η βασική μονάδα παραγωγής λιπαρών οξέων (Papanikolaou και Aggelis 2011 στους, Ratledge 1994). Το καθαρό προϊόν της γλυκόλυσης είναι το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο διέρχεται μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση καταλύει το σχηματισμό ακετυλο-CoA από το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο είτε εισέρχεται στον κύκλο του Krebs είτε μεταφέρεται ξανά στο κυτταρόπλασμα για να ενισχύσει τη βιοσύνθεση των κυτταρικών λιπαρών οξέων (Laskin, Bennett, και Gadd 2002; Gunstone και Harwood 2007).

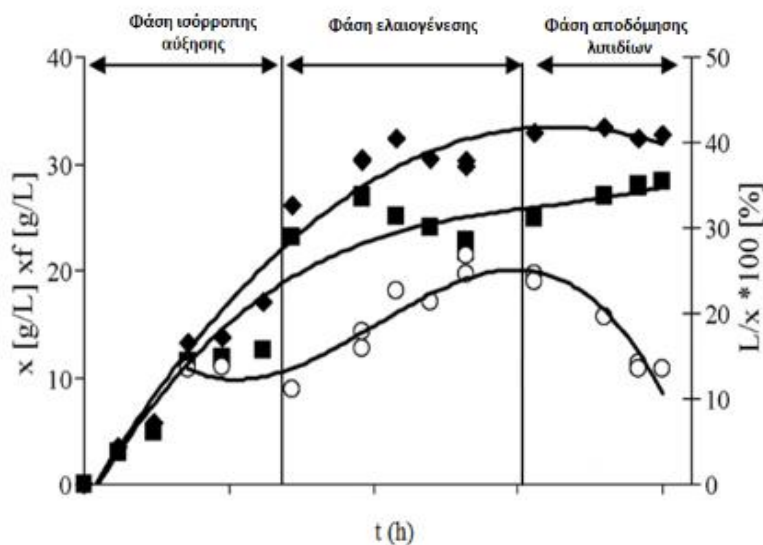
Οι ζυμομυκήτες είναι σε θέση να χρησιμοποιούν πολλές διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή κυτταρικής μάζας και λιπιδίων. Αυτές οι πηγές μπορεί να είναι γλυκόζη, ξυλόζη, γλυκερίνη, άμυλο, υδρολύματα κυτταρίνης, χαμηλού κόστους μηχανικά και αστικά οργανικά απόβλητα. Σε όλες τις περιπτώσεις, η συσσώρευση λιπιδίων λαμβάνει χώρα υπό συνθήκες περιορισμών που προκαλούνται από μια θρεπτική ουσία διαφορετική από τον άνθρακα (Thevenieau και Nicaud 2013).

Η συσσώρευση λιπιδίων είναι μια δευτερογενής διαδικασία και συνδέεται με την εξάντληση κάψτουςθρεπτικού συστατικού από το μέσο καλλιέργειας, στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αυτό, συνήθως, είναι το άζωτο με την πηγή άνθρακα σε περίσσεια. Το άζωτο, το οποίο είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο, εφόσον αποτελεί δομικό λίθο της βιοσύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Σε συνθήκες έλλειψης αζώτου, τα κύτταρα αδυνατούν να πολλαπλασιαστούν και συνεπώς σταματάει η αύξηση και η σύνθεση κυτταρικής βιομάζας. Αντιθέτως, η πηγή άνθρακα, η οποία βρίσκεται ακόμη σε περίσσεια στο

θρεπτικό μέσο, συνεχίζει να αφομοιώνεται και με τη δράση κατάλληλων ενζύμων μετατρέπεται σε αποθεματικά λιπίδια (Granger κ.ά. 1993; C. Ratledge 1994; Wynn κ.ά. 2001).

Γενικά, η ανάπτυξη ελαιογόνων μικροοργανισμών σε υπόστρωμα με βάση το σάκχαρο (ή με παρόμοιο μεταβολισμό) με βάση το άζωτο (ή θειικά ή φωσφορικά) μέσα μπορεί να χωριστεί σε δύο διακριτές φάσεις. Στην πρώτη φάση, στην οποία όλα τα θρεπτικά συστατικά είναι διαθέσιμα για τη μικροβιακή ανάπτυξη (balanced growth phase). Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, πραγματοποιείται η κυτταρική ανάπτυξη καθώς το υπόστρωμα καταναλώνεται με σχετικά υψηλούς ρυθμούς αφομοίωσης. Σε αυτή τη φάση, παράγονται κυτταρικά λιπίδια που περιλαμβάνουν ποσότητες TAG, αλλά, γενικά, περιέχουν πολικά κλάσματα (π.χ. σφινγολιπίδια, φωσφολιπίδια κ.λπ.) που αντιστοιχούν στα λιπίδια της μεμβράνης. Σε αυτή τη φάση, ολικό λιπίδιο σε ξηρή ύλη αντιστοιχεί σε τιμή 5–10% w/w. (Fakas κ.ά. 2008; 2006).

Στην δεύτερη φάση που γίνεται η συσσώρευση λιπιδίων. Σε αυτή τη φάση, ουδέτερα λιπίδια (κυρίως TAGs) συσσωρεύονται μέσα στα μικροβιακά κύτταρα ή στα μυκήλια των μυκήτων, ενώ η πρόσληψη του υποστρώματος, σάκχαρα, θα μπορούσε ενδεχομένως να παρουσιάζει κάπως χαμηλότερο ρυθμό πρόσληψης σε σύγκριση με τη φάση ισορροπημένης ανάπτυξης. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι σε αρκετές περιπτώσεις, κατά τη φάση περιορισμού του αζώτου εκτός από λιπίδια, συντίθεται και βιομάζα χωρίς λιπίδια. Αυτή η αύξηση της βιομάζας χωρίς λιπίδια παρά τις συνθήκες περιορισμένου αζώτου στο μέσο υποδηλώνει μερική κυτταρική ανάπτυξη (και κυτταρικό πολλαπλασιασμό) και κυρίως συσσώρευση μη λιπιδικών υλικών αποθήκευσης όπως ο ενδοκυτταρικός πολυσακχαρίτης (Papanikolaou, Komaitis, και Aggelis 2004; Fakas, Papanikolaou, κ.ά. 2009; 2009). Η κινητική συσσώρευσης των μικροβιακών λιπιδίων παρουσιάζεται στην Εικόνα 4:



Εικόνα 4: Κινητική της συσσώρευσης μικροβιακών λιπιδίων (Fakas κ.ά. 2007), τροποποιημένο. Σύμβολα: ξηρή βιομάζα ( $x$ , g/l-  $\blacklozenge$ ), ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας ( $L/x\%$ -  $\circ$ ), βιομάζα

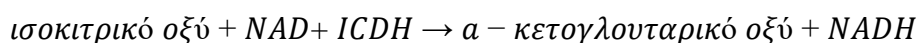
Όταν ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται η γλυκόζη, οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί την καταβολίζουν, είτε μέσω της γλυκολυτικής οδού είτε μέσω του οξειδωτικού κύκλου των φωσφοροπεντοζών. Οι δυο αυτές οδοί δεν συμβαίνουν ταυτόχρονα αλλά μπορεί να αλληλεπιδρούν. Κατά τη γλυκολυτική οδό, από τη γλυκόζη παράγεται πυροσταφυλικό οξύ με σύγχρονη παραγωγή αναγωγικής δύναμης με τη μορφή NADH και ενέργειας με τη μορφή ATP. Εναλλακτικά, οι μικροοργανισμοί μπορεί να χρησιμοποιήσουν την οξειδωτική οδό των φωσφοροπεντοζών κατά την οποία παράγονται δυο μόρια NADPH, μόρια απαραίτητα σε αναβολικές αντιδράσεις όπως η βιοσύνθεση των λιπιδίων. Αν και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τη γλυκολυτική οδό για να καταβολίσουν τη γλυκόζη, το αν θα ενεργοποιήσουν τη μια ή την άλλη οδό ελέγχεται από τη δράση του ενζύμου φωσφοροφρουκτοκινάση (PFK). Μάλιστα, η ενεργότητα της PFK επηρεάζει και τη ροή του άνθρακα εντός του κυττάρου.

Σύμφωνα με πολλούς ερευνητές, στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, σε συνθήκες ισόρροπης αύξησης, τα ένζυμα φωσφοροφρουκτοκινάση και ισομεράση της γλυκόζης, ενζύμων-κλειδιά στη βιοσυνθετική οδό των πολυσακχαριτών, αδυνατούν να καταβολίσουν τον άνθρακα προς πυροσταφυλικό οξύ και έπειτα προς τη βιοσύνθεση αποθεματικών λιπιδίων, λόγω του ότι ο ρυθμός αφομοίωσης της γλυκόζης είναι μικρότερος του ρυθμού εισόδου στο μικροβιακό κύτταρο, με αποτέλεσμα τη βιοσύνθεση και τη συσσώρευση πολυσακχαριτών εντός του κυττάρου (Galiotou-Panayotou, Kalantzi, και Aggelis 1998; Diamantopoulou κ.ά. 2012; 2014). Επιπλέον, οι μη ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι στερούνται του ενζύμου ATP:κιτρικής λυάσης (ATP:CL) (Botham και Ratledge 1979), αδυνατούν να διασπασουν το κιτρικό οξύ προς οξαλοξικό οξύ και ακέτυλο-CoA, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση κιτρικού οξέος στο κυτταρόπλασμα, το οποίο προκαλεί αναστολή της PFK, με άμεσο αποτέλεσμα τη συσσώρευση πολυσακχαριτών εντός του κυττάρου.

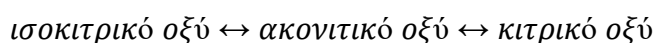
Η συσσώρευση των λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι μια διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιούνται πολλά βιοχημικά γεγονότα, τα οποία επάγονται από την εξάντληση της πηγής αζώτου από το θρεπτικό μέσο. Το πρώτο γεγονός που παρατηρείται, είναι μια απότομη μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης της μονο-φωσφορικής αδενοσίνης (adenosine monophosphate-AMP), η οποία οφείλεται στην αύξηση της ενεργότητας της απαμινάσης της AMP και σχετίζεται με την εξάντληση του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας. Η αντίδραση που καταλύεται από την απαμινάση είναι η εξής (Boulton και Ratledge 1981):



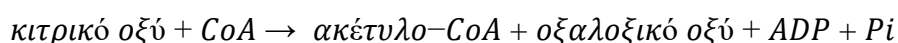
όπου IMP η μονο-φωσφορική ινοσίνη. Η παραπάνω αντίδραση απαμίνωσης του AMP έχει σαν αποτέλεσμα την εξοικονόμηση και ταυτόχρονα την απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων αζώτου, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω αύξηση αλλά και στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Η μείωση του ενδοκυτταρικού AMP επηρεάζει με τη σειρά της την ενεργότητα της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (isocitrate dehydrogenase-ICDH) (Botham και Ratledge 1979), η οποία καταλύει την παρακάτω αντίδραση:



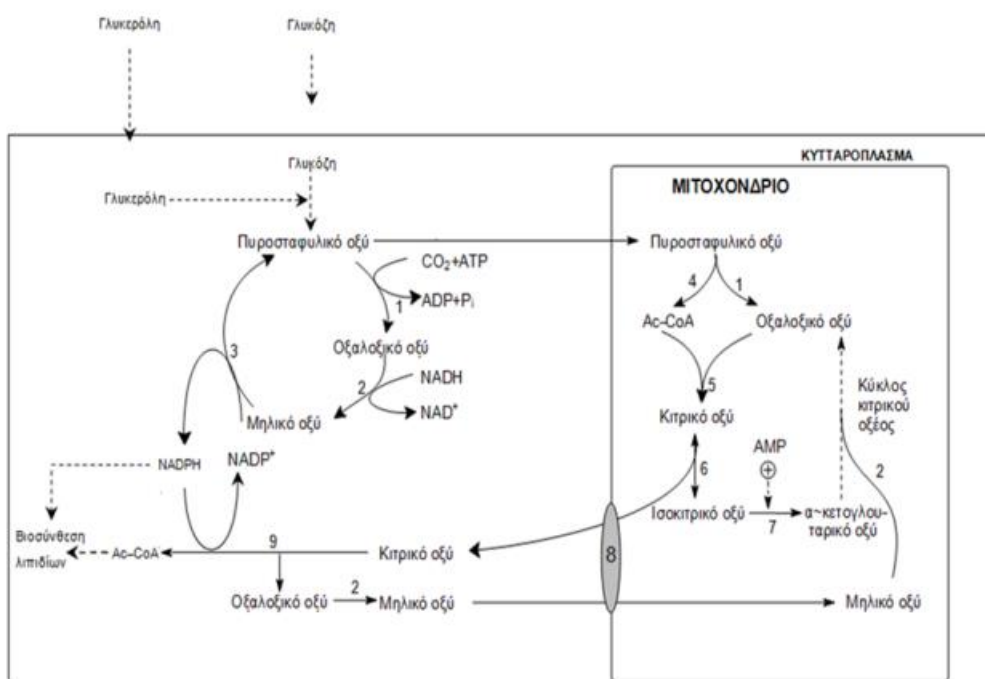
Συγκεκριμένα, η μείωση της συγκέντρωσης του AMP οδηγεί στη μείωση της ενεργότητας της ICDH, με άμεσο αποτέλεσμα τη συσσώρευση ισοκιτρικού οξέος, που μέσω της ισορροπίας της ακονιτάσης καταλήγει στη συσσώρευση κιτρικού οξέος στα μιτοχόνδρια.



Έπειτα, το κιτρικό οξύ εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα, μέσω του ενζύμου τρανσλοκάση του κιτρικού-μηλικού οξέος, το οποίο εδρεύει στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Evans και Ratledge 1985). Η έξοδος αυτή, είναι συζευγμένη με την είσοδο μηλικού οξέος. Η μεταφορά του κιτρικού οξέος συνοδεύεται από μια σειρά αντιδράσεων, που περιλαμβάνει αρχικά την καρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος προς οξαλοξικό οξύ από την πυροσταφυλική καρβοξυλίωση. Το κιτρικό οξύ που βρίσκεται τώρα στο κυτταρόπλασμα, διασπάται προς οξαλοξικό οξύ και ακετυλο-CoA μέσω της δράσης



Το παραγόμενο στο κυτταρόπλασμα οξαλοξικό οξύ εισέρχεται στον κύκλο του μηλικού οξέος για την παραγωγή μηλικού οξέος, το οποίο εισέρχεται στο μιτοχόνδριο μέσω της τρυσλοκάσης κιτρικού-μηλικού οξέος, ενώ το παραγόμενο ακετυλο-CoA διοχετεύεται προς τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων. Η σύνθεση των λιπιδίων, απεικονίζεται στην Εικόνα 5:



Εικόνα 5: Βιοσύνθεση λιπιδίων σε ελαιόγόνους μύκητες από γλυκερόλη και γλυκόζη (Laskin, Bennett, και Gadd 2002, τροποποιημένο)

Ένζυμα: 1: Πυροσταφυλική καρβοξυλάση, 2: Μηλική αφυδρογονάση, 3: Μηλικό ένζυμο, 4: Πυροσταφυλική αφυδρογονάση, 5: Κιτρική συνθάση, 6: Ακονιτάση, 7: Ισοκιτρική αφυδρογονάση, 8: Τρυσλοκάση κιτρικού-μηλικού, 9: ATP: κιτρική λυάση

## 1.7 Σκοπός

Η ζύμη *Rhodotorula* είναι μια ελαιογόνος ζύμη που μπορεί να συσσωρεύσει υψηλές ποσότητες αποθεματικών λιπιδίων, ενώ έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται σε υποστρώματα χαμηλού κόστους.

Αντικείμενο πραγμάτευσης της παρούσας μελέτης, αποτελεί η διερεύνηση αξιοποίησης του παραπροϊόντος της βιομηχανίας της ζυθοποιίας, BSG, ως θρεπτικό υλικό και ως αποκλειστική πηγή άνθρακα. Μελετήθηκε επίσης και η απόδοση παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από τέσσερα στελέχη τους γένους *Rhodotorula*. Επίσης, τα στελέχη καλλιεργήθηκαν και σε υπόστρωμα γλυκόζης, ως μοναδική πηγή άνθρακα ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα, με ένα υπόστρωμα που ο μύκητας μπορεί να καταναλώσει.



## 2 Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Rhodotorula Kratochvilovae*, *Rhodotorula musilaginosa* EXF-9791, *Rhodotorula musilaginosa* EXF-8984 και *Rhodotorula diobovata* EXF-6843 εκ των οποίων το πρώτο απομονώθηκε από απόβλητα νερού το δεύτερο από βρεγμένο ύφασμα και το τελευταίο από τα οποία φυλάσσονται στη συλλογή του Mycosmo και στάλθηκαν στο Εργαστήριο του ΦυΧηΒιο (Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου). Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για ανακαλλιέργειες ήταν PDA (Potato Dextrose Agar). Οι μικροοργανισμοί αποθηκεύτηκαν σε ειδικά φιαλίδια, Eppendorf 2 mL που περιείχαν ισόποσα γλυκερόλη και μικροοργανισμό, τυλίχτηκαν με parafilm και φυλάχτηκαν στους -40°C και ανανεωνόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για τις ανάγκες των πειραμάτων.

### 2.2 Θρεπτικό υλικό και συνθήκες καλλιέργειας

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν περιοριστικό ως προς το άζωτο (yeast extract, y.e.), με συγκέντρωση y.e. 1,2 g/L, με πηγές άνθρακα το BSG (200 g/L) και γλυκόζη 60 g/L.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί ανανεώσιμη πρώτη ύλη και ανήκει στην κατηγορία των βιομηχανικών αποβλήτων, υποπροϊόντων ή παραπροϊόντων διεργασιών. Πιο συγκεκριμένα το BSG που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα χορηγήθηκε από την φοιτητική ομάδα ζυθοποιίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής στο Πανεπιστήμιο Αιγαίου. Αμέσως μετά την παραλαβή του, το BSG ξηράθηκε (85°C) και υπεβλήθη σε άλεση προς παραλαβή ομογενούς υλικού. Έπειτα ακολούθησε παραλαβή του κλάσματος πλούσιου σε ελεύθερα σάκχαρα ως εξής: 200 g ξηρό BSG προστέθηκαν σε 1 λίτρο νερό και ακολούθησε θέρμανση στους 40 °C υπό συνεχόμενη ανάδευση (300 rpm) για

1 ώρα. Τέλος το μείγμα διηθήθηκε και φυγοκεντρήθηκε (9000rpm, 4oC, 15min). Το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20oC για περαιτέρω χρήση.

Σε όλες τις περιπτώσεις υπήρξε εμπλουτισμός του θρεπτικού υλικού με τα κάτωθι μακροστοιχεία και μικροστοιχεία:

- 7 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 3,15 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 * 2 \text{H}_2\text{O}$
- 0,15 g/L  $\text{CaCl}_2 * 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,02 g/L  $\text{ZnSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,01 g/L  $\text{FeCl}_3 * 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,06 g/L  $\text{MnSO}_4 * \text{H}_2\text{O}$
- 1,5 g/L  $\text{MgSO}_4 * 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,001 g/L  $\text{CuSO}_4 * 5\text{H}_2\text{O}$

Οι καλλιέργειες έγιναν σε φιάλες Erlenmeyer των 250 cc σε όγκο θρεπτικού υλικού 50 ml. Η αποστείρωση των θρεπτικών πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο, στους 121 °C, για 20min, υπό πίεση 1,1 atm. Για την αποφυγή ιζήματος κατά την αποστείρωση τα ιχνοστοιχεία αποστειρώθηκαν ξεχωριστά (Makri, Fakas, και Aggelis 2010), ομοίως και το διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) προς αποφυγή καραμελοποίησης (Meeuwse, Tramper, και Rinzema 2011). Ως εκ τούτου, τα προαναφερθέντα προστέθηκαν σε δεύτερο χρόνο στο θρεπτικό υλικό, υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο γραμμικής ροής (Laminar Row Flow-rbi MINIFLO)

### 2.2.1 Καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες

Για την προετοιμασία του μικροοργανισμού από τους -40 °C, ξεπαγώσαμε τον μικροοργανισμό που φυλάσσεται σε Eppendorf με ποσοστό γλυκερόλης 50% ώστε να μην λύνονται τα κύτταρα λόγω παγοκρυστάλλων. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός των τρυβλίων Petri 9 cm, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε θάλαμο γραμμικής ροής (Laminar row flow, rib MINIFLO), με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου και τη χρήση της μεθόδου streaking. Τέλος, αναποδογυρίσαμε τα τρυβλία, ώστε η υγρασία να μην συγκεντρώνεται στην καλλιέργεια και επώαστηκαν στους 30°C, στον επιτραπέζιο επωαστικό θάλαμο για 2-3 μέρες.

Ως θρεπτικό μέσω προκαλλιέργειας για τον εμβολιασμό των υγρών καλλιιεργειών, χρησιμοποιήθηκε Potato Dextrose Broth (PDB), σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, οι οποίες περιείχαν 50 mL θρεπτικού υλικού. Ως στερεό θρεπτικό υλικό για καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία petri, χρησιμοποιήθηκε Potato Dextrose Agar (PDA, Biolab Zrt, Budapest, Hungary).

Οι προκαλλιέργειες επώζονται για 48h σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 28 °C, υπό ανάδευση 180 rpm (rotation per minute- στροφές ανά λεπτό). Ο εμβολιασμός των κωνικών φιαλών με θρεπτικό υλικό έγινε στο θάλαμο γραμμικής ροής, με τη βοήθεια μικροπιπέτας, έτσι ώστε κάθε κωνική φιάλη να περιέχει από 1 mL της προκαλλιέργειας. Στην περίπτωση την γλυκόζης προστέθηκαν και 50 μl από το Stock του y.e. ενώ και στις δύο περιπτώσεις προστέθηκε 0,5 mL από το Stock με τα ιχνοστοιχεία. Η επώαση των φιαλών για το πείραμα διερεύνησης, έγινε σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 28 °C υπό ανάδευση 180 rpm.

Για τη διατήρηση του pH σταθερό στην επιθυμητή τιμή 6-6,3 χρησιμοποιήθηκαν NaOH και HCl.

## 2.3 Χημικές αναλύσεις και προσδιορισμοί

### 2.3.1 Συλλογή καλλιέργειας

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (24 h) λαμβανόταν δύο κωνικές μια με BSG και μια με Glc από κάθε στέλεχος του μικροοργανισμού. Στο Laminar παρασκευάστηκε ένα μικροσκοπικό παρασκεύασμα, μέσω του οποίου ελέγχθηκε αν οι καλλιέργεια έχει μολυνθεί. Δηλαδή σε αντικειμενοφόρο πλάκα θα τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα δείγματος και θα μελετήθηκε στο οπτικό μικροσκόπιο. Στην συνέχεια, με την βοήθεια του πεχαμέτρου θα μετρήθηκε το pH και αναλόγως την απόκλιση της μέτρησης από το επιθυμητό 6-6,3 διορθώθηκε ασηπτικά στις υπόλοιπες κωνικές με τη χρήση NaOH ή KCl. Έπειτα, ογκομετρήθηκαν και προστέθηκε αποιονισμένο νερό μέχρι τα 50 mL. Για να παραλάβουμε τη βιομάζα από τη κωνική, η καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε Falcon των 50 mL και φυγοκεντρήθηκε για 10min σε 9000rpm. Το υπερκείμενο από τη πρώτη φυγοκέντρηση φυλάσσεται για περαιτέρω αναλύσεις σε Falcon των 15 mL, πιο συγκεκριμένα για τον προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων.

### 2.3.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας πραγματοποιούταν με ποσοτικό προσδιορισμό της ξηρής βιομάζας.

Η συλλογή και ο ποσοτικός προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας γινόταν σύμφωνα με τους (Bellou κ.ά. 2012). 50 ml της καλλιέργειας φυγοκεντρούνταν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (9,000 rpm, 10 min, 4 °C,) και ξεπλένονταν εις τριπλούν με απιονισμένο νερό.

Το υπερκείμενο της πρώτης φυγοκέντρωσης, συλλεγόταν και αποθηκευόταν στους -20 °C προς έλεγχο κατανάλωσης σακχάρων. Μετά την τρίτη έκπλυση, πραγματοποιούταν συλλογή της νωπής βιομάζας με απιονισμένο νερό σε προζυγισμένο φιαλίδιο τύπου McCartney και ξήρανσή της στους 80 °C μέχρι σταθερού βάρους. Μετά την ζύγιση του φιαλιδίου με την ξηρή πλέον βιομάζα, υπολογιζόταν η ξηρή βιομάζα και εκφραζόταν σε g ανά L καλλιέργειας.

### 2.3.3 Προσδιορισμός Αναγωγικών Σακχάρων (DNS analysis)

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων, γλυκόζης και φρουκτόζης, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος (κίτρινο χρώμα) σε 3 αμινο-5 νιτροσαλικυλικό οξύ (πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα) με την παρουσία NaOH και ταυτόχρονη οξειδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 0,5 ml δείγματος (κατάλληλα αραιωμένου ή μη) και 0,5 ml αντιδραστηρίου DNS. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υπό βρασμό υδατόλουτρο (100 oC) για 5 min και αφέθηκαν να κρυώσουν κάτω από τρεχούμενο νερό. Ακολουθούσε προσθήκη 5 ml απιονισμένου νερού και ανάδευση σε Vortex. Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο (UV-1900i Spectrophotometer, SHIMADZU). Το τυφλό δείγμα για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου περιείχε 0,5mL απιονισμένου νερού αντί δείγματος. Για τον υπολογισμό των αναγόντων σακχάρων στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς με εξίσωση  $C=2,3921 \cdot A_{OD} + 0,0324$ ,  $R^2 > 0,95$ . Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα g/l γλυκόζης.

### 2.3.4 Προσδιορισμός λιπιδίων

Για τον προσδιορισμό των λιπιδίων, ακολούθησε ομογενοποίηση της ξηρής βιομάζας σε πορσελάνινο γουδί και μεταφέρθηκε σε καινούριο φιαλίδιο τύπου MacCartney. Στην συνέχεια, γινόταν προσθήκη αντιδραστηρίου Folch (μίγμα χλωροφορμίου:μεθανόλης σε αναλογία 2:1 v/v, Fisher Chemical, Loughborough, England) και φυλάσσονταν για 3 ημέρες.

### 2.3.5 Εκχύλιση των λιπιδίων

Για την εκχύλιση των λιπιδίων, ακολουθούσε η διήθηση του δείγματος μέσω χάρτινου ηθμού Whatman No. 1 και το διήθημα συλλέχθηκε σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη. Η απομάκρυνση του διαλύτη έγινε με την εξάτμισή του σε περιστροφικό θερμαινόμενο εξατμιστήρα (Rotavapor R-210, Buchi, Flawil, Switzerland) σε θερμοκρασία 45 oC υπό κενό

και, αφού αφέθηκε να φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε αφυδατικό θάλαμο, και η σφαιρική φιάλη ζυγίστηκε εκ νέου η σφαιρική φιάλη σε ζυγό ακριβείας.

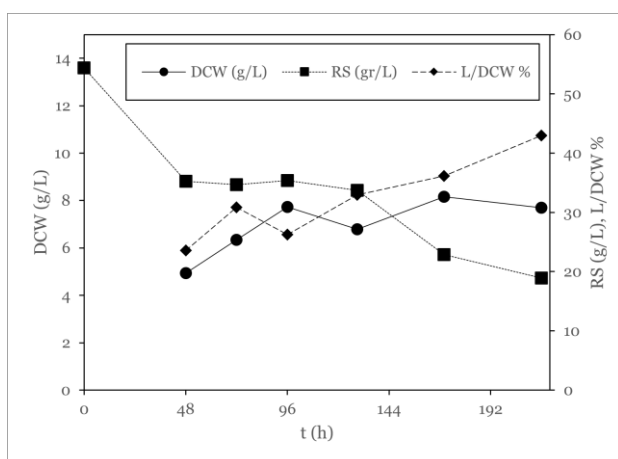
Η διαφορά του βάρους αντιστοιχεί στα λιπίδια τα οποία εκφράστηκαν σε g/100 g ξηρής βιομάζας (L/X, %).

### 3 Αποτελέσματα

Τα στελέχη της ελαιογόνου ζύμης *Rhodotorula* καλλιεργήθηκαν σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer των 250 mL με πηγή άνθρακα και ενέργειας γλυκόζη ή BSG, με εμπλουτισμό y.e 1,29 g/L, προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα συσσώρευσης αποθεματικών υλικών (λιπιδίων).

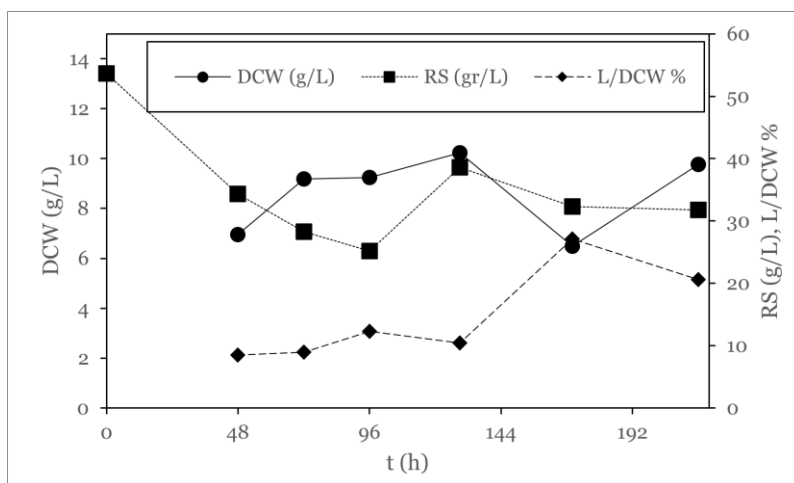
#### 3.1 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula Kratochvilovae* EXF-3741 σε γλυκόζη και σε BSG

Η κινητική αύξηση της ζύμης *Rhodotorula Kratochvilovae* EXF-3741 σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας την γλυκόζη σε συγκέντρωση 60 g/L, παρουσιάζεται στην Εικόνα 6. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στις 170 h φτάνοντας τα 8,1 g/L. Ταυτόχρονα, η μέγιστη συσσώρευση ολικών λιπιδίων ήταν στις 216 h φτάνοντας σε ποσοστό 43 % επί της ξηρής βιομάζας, ύστερα από 48 h εκχύλιση των λιπιδίων με την μέθοδο Folch, ποσοστό που αντιστοιχεί σε ολικών λιπιδίων.



Εικόνα 6: κινητική ανάπτυξη της ζύμης *R. Kratochvilovae* EXF-3741 σε υπόστρωμα γλυκόζης κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων αύξησης. DCW (g/L): μικροβιακή βιομάζα (g/100g ξηρής βιομάζας), RS (g/L): ανάγοντα σάκχαρα, L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w)

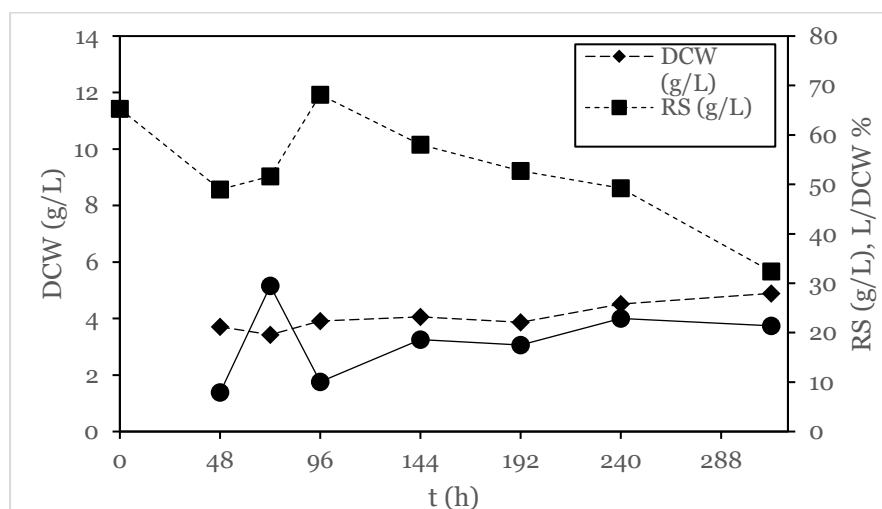
Στην συνέχεια, η ζύμη καλλιεργήθηκε εκ νέου σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας το απόβλητο BSG, ίδιας συγκέντρωσης, Εικόνα 7. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στις 129 h φτάνοντας τα 10,2 g/L. Ταυτόχρονα, η μέγιστη συσσώρευση ολικών λιπιδίων ήταν επί της ξηρής βιομάζας παρατηρήθηκε στις 170h με ποσοστό 27,1%, ύστερα από 48 h εκχύλιση των λιπιδίων με την μέθοδο Folch, ποσοστό που αντιστοιχεί σε ολικών λιπιδίων.



Εικόνα 7: κινητική ανάπτυξη της ζύμης *R. Kratochvilovae* EXF-3741 σε υπόστρωμα BSG κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων αύξησης. DCW (g/L): μικροβιακή βιομάζα (g/100g ξηρής βιομάζας), RS (gr/L): ανάγοντα σάκχαρα, L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w)

### 3.2 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-8984 σε γλυκόζη και σε BSG

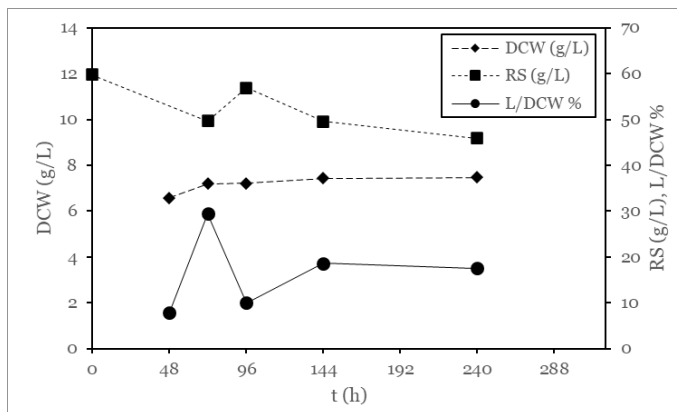
Η κινητική αύξηση της ζύμης *R. musilaginosa* EXF-8984 σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας την γλυκόζη σε συγκέντρωση 60 g/L, παρουσιάζεται στην Εικόνα 8. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στις 312h φτάνοντας 4,9 g/L. Ταυτόχρονα, η μέγιστη συσσώρευση ολικών λιπιδίων παρατηρήθηκε στις 72h με ποσοστό 29,4% επί της ξηρής βιομάζας, ύστερα από 48h εκχύλιση των λιπιδίων με την μέθοδο Folch, ποσοστό που αντιστοιχεί σε ολικών λιπιδίων.



Εικόνα 8 : κινητική ανάπτυξη της ζύμης *R. musilaginosa* EXF-8984 σε υπόστρωμα γλυκόζης κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων αύξησης. DCW (g/L): μικροβιακή βιομάζα (g/100g ξηρής βιομάζας), RS (gr/L): ανάγοντα σάκχαρα, L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w).



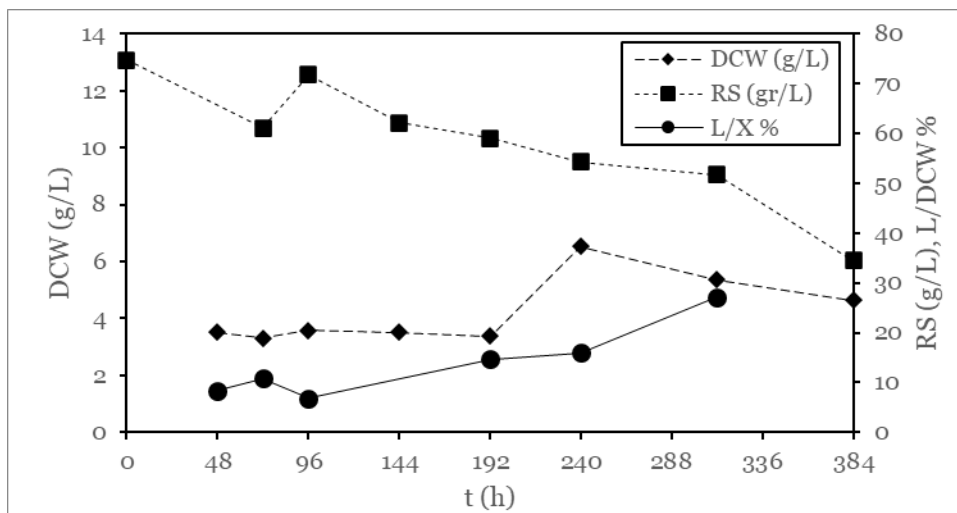
Στην συνέχεια, η ζύμη καλλιεργήθηκε εκ νέου σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας το απόβλητο BSG, ίδιας συγκέντρωσης, εικόνα 9. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στις 240 h και ήταν 7,47 g/L, με μέγιστη συσσώρευση ολικών λιπιδίων στις 72h με ποσοστό 9,3% επί της ξηρής βιομάζας, ύστερα από 48h εκχύλιση των λιπιδίων με την μέθοδο Folch, ποσοστό που αντιστοιχεί σε ολικών λιπιδίων.



Εικόνα 9: κινητική ανάπτυξη της ζύμης *R. musilaginosa* EXF-8984 σε υπόστρωμα BSG κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων αύξησης. DCW (g/L): μικροβιακή βιομάζα (g/100g ξηρής βιομάζας), RS (g/L): ανάγοντα σάκχαρα, L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w).

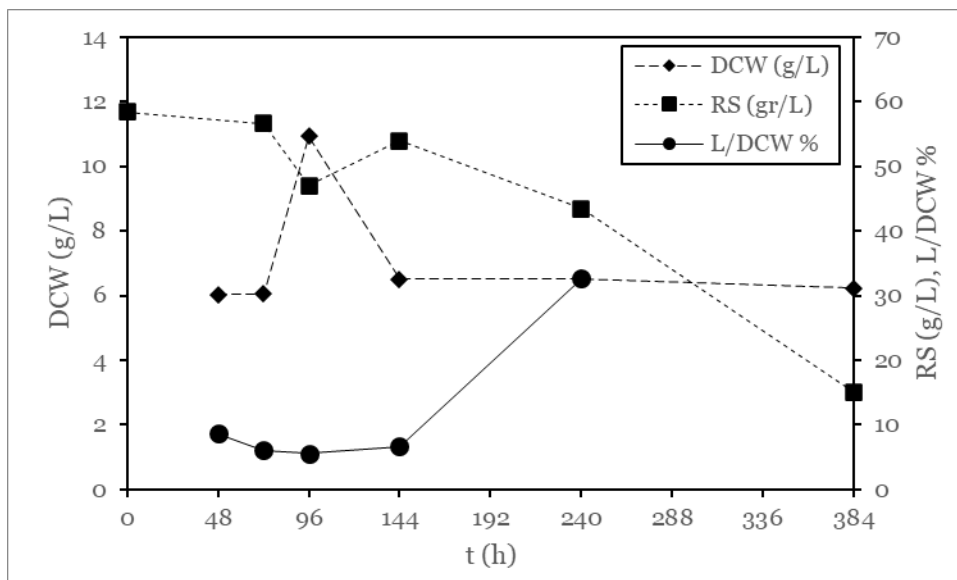
### 3.3 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula musilaginosa* EXF-9791 σε γλυκόζη και σε BSG

Η κινητική αύξηση της ζύμης *Rhodotorula musilaginosa* EXF-9791 σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας την γλυκόζη σε συγκέντρωση 60 g/L, παρουσιάζεται στην Εικόνα 10. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στις 240 h και ήταν 6,53 g/L. Ταυτόχρονα, η μέγιστη συσσώρευση ολικών λιπιδίων παρατηρήθηκε στις 312 h με ποσοστό 27,1% επί της ξηρής βιομάζας, ύστερα από 48 h εκχύλιση των λιπιδίων με την μέθοδο Folch, ποσοστό που αντιστοιχεί σε ολικών λιπιδίων.



Εικόνα 10: κινητική ανάπτυξη της ζύμης *R. musilaginosa* EXF-9791 σε υπόστρωμα γλυκόζης κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων αύξησης. DCW (g/L): μικροβιακή βιομάζα (g/100g ξηρής βιομάζας), RS (gr/L): ανάγοντα σάκχαρα, L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w).

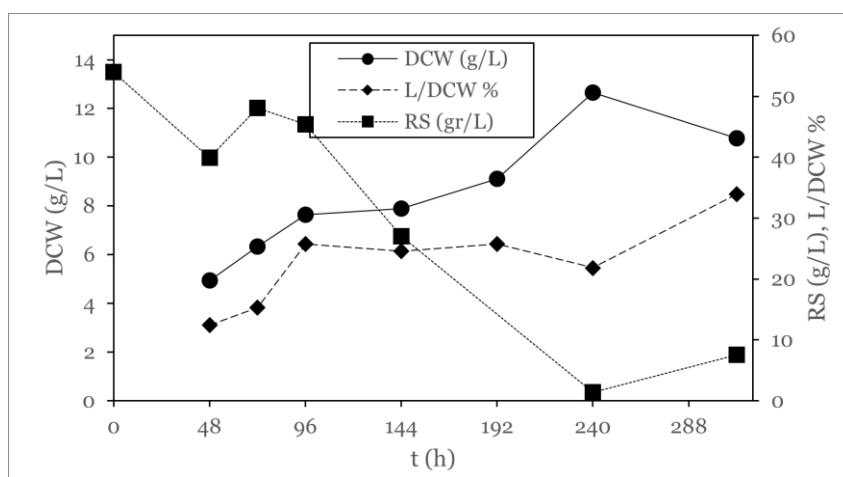
Στην συνέχεια, η ζύμη καλλιεργήθηκε εκ νέου σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας το απόβλητο BSG, ίδιας συγκέντρωσης. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στις 96 h και ήταν 10,9 g/L. Ταυτόχρονα, η μέγιστη συσσώρευση ολικών λιπιδίων παρατηρήθηκε στις 240 h με ποσοστό 32% επί της ξηρής βιομάζας, ύστερα από 48 h εκχύλιση των λιπιδίων με την μέθοδο Folch, ποσοστό που αντιστοιχεί σε ολικών λιπιδίων (Εικόνα 11)



Εικόνα 11: κινητική ανάπτυξη της ζύμης *R. musilaginosa* EXF-9791 σε υπόστρωμα BSG κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων αύξησης. DCW (g/L): μικροβιακή βιομάζα (g/100g ξηρής βιομάζας), RS (gr/L): ανάγοντα σάκχαρα, L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w).

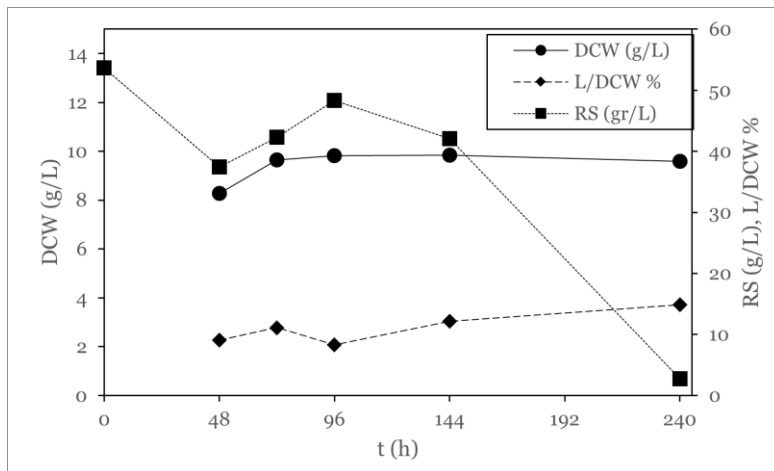
### 3.4 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula diobovata* EXF-6843 σε γλυκόζη και σε BSG

Η κινητική αύξηση της ζύμης *R. diobovata* EXF-6843 σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας την γλυκόζη σε συγκέντρωση 60 g/L, παρουσιάζεται στην Εικόνα 12. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στις 240h και ήταν 12,65 g/L. Η μέγιστη συσσώρευση ολικών λιπιδίων παρατηρήθηκε στις 312h με ποσοστό 33,9% επί της ξηρής βιομάζας, ύστερα από 48h εκχύλιση των λιπιδίων με την μέθοδο Folch, ποσοστό που αντιστοιχεί σε ολικών λιπιδίων.



Εικόνα 125: κινητική ανάπτυξη της ζύμης *R. diobovata* EXF-6843 σε υπόστρωμα γλυκόζης κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων αύξησης. DCW (g/L): μικροβιακή βιομάζα (g/100g ξηρής βιομάζας), RS (gr/L): ανάγοντα σάκχαρα, L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w)

Στην συνέχεια, η ζύμη καλλιεργήθηκε εκ νέου σε θρεπτικό μέσο με μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας το απόβλητο BSG, ίδιας συγκέντρωσης. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στις 144 h και ήταν 9,83 g/L. Η μέγιστη συσσώρευση ολικών λιπιδίων παρατηρήθηκε στις 240 h με ποσοστό 14,83% επί της ξηρής βιομάζας, ύστερα από 48h εκχύλιση των λιπιδίων με την μέθοδο Folch, ποσοστό που αντιστοιχεί σε ολικών λιπιδίων (Εικόνα 13).

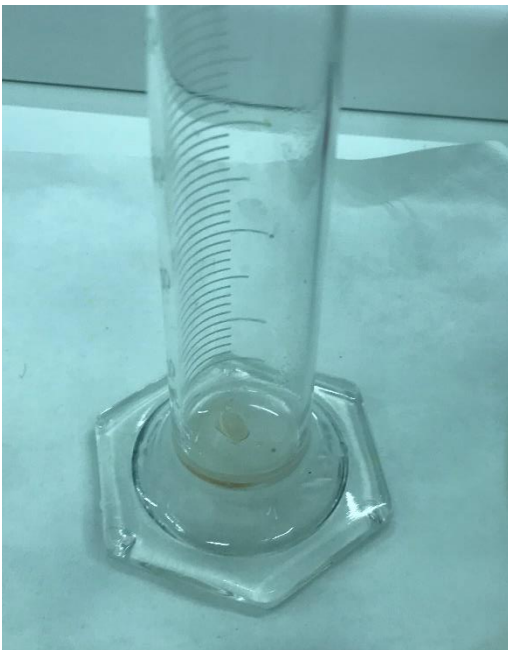


Εικόνα 13:6 κινητική ανάπτυξη της ζύμης *R. diobonata* EXF-6843 σε υπόστρωμα BSG κατά τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων αύξησης. DCW (g/L): μικροβιακή βιομάζα (g/100g ξηρής βιομάζας), RS (gr/L): ανάγοντα σάκχαρα, L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w)

### 3.5 Άρωμα εσπεριδοειδών

Μετά από 24h ανάπτυξης των ζυμών μπορούσε να παρατηρηθεί, στις κωνικές φιάλες με υπόστρωμα το BSG, μια απαλή μυρωδιά φύλλα από εσπεριδοειδή, η οποία με το πέρασμα του χρόνου γινόταν εντονότερη, με πιο έντονη να παρατηρείται στις καλλιέργειες των στελεχών *R. mucilaginoso*.

### 3.6 Παρατήρηση εξωγλυκολιπιδίων



Μετά από 48h ανάπτυξης του μικροοργανισμού *R. kratochvilovae* EXF-3741, με υπόστρωμα την γλυκόζη, παρατηρήθηκε στην επιφάνεια της καλλιέργειας σταγονίδια λίπους (Εικόνα 14).

Εικόνα 7 Σταγονίδιο λίπους στην επιφάνεια του υποστρώματος της καλλιέργειας 48h του στελέχους *R. kratochvilovae* EXF-374, επί γλυκόζης.

#### 4 Συζήτηση

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η αξιοποίηση του αποβλήτου βύνης από εργοστάσιο μπίρας με ζύμωση υγρής κατάστασης από τα γένη του ελαιογόνου μύκητα *Rhodotorula*, προς τη μελέτη της συσσώρευσης ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Δύο συνθήκες ανάπτυξης επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν περαιτέρω, η μία με υπόστρωμα γλυκόζης και η άλλη με το απόβλητο.

Σύμφωνα με το πρότυπο των ελαιογόνων μικροοργανισμών, κατά τη φάση ισόρροπης αύξησης, όταν όλα τα θρεπτικά συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια στο μέσο καλλιέργειας, συντίθεται βιομάζα ελεύθερης λιπιδίων (xf), η οποία αποτελεί την ενεργή μικροβιακή μάζα και περιέχει πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και δομικά συστατικά. Όταν ένα θρεπτικό συστατικό, όπως το άζωτο, ο φώσφορος, ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος ή το μαγνήσιο, εξαντληθεί από το μέσο καλλιέργειας, συνιστά τον περιοριστικό για την αύξηση παράγοντα (Gill, Hall, και Ratledge 1977; Jakobsen κ.ά. 2008) και οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα και να τη μετατρέπουν σε αποθεματικά λιπίδια. Σε όλες τις περιπτώσεις στην παρούσα εργασία, το θρεπτικό υλικό ήταν περιοριστικό ως προς άζωτο και συγκεκριμένα ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης (y.e.), αφού σε προηγούμενες εργασίες χρησιμοποιώντας τη ζύμη *Yarrowia lipolytica* αποδείχθηκε ότι η μεγαλύτερη σύνθεση βιομάζας και συσσώρευση λιπιδίων παρατηρήθηκαν σε καλλιέργειές της σε y.e. αρχικής συγκέντρωσης 3 g/l (Μπέλλου 2015). Έχει επίσης αναφερθεί ότι σε θρεπτικό μέσο περιοριστικό ως προς δύο παράγοντες, όπως σε άζωτο και μαγνήσιο, επάγεται η βιοσύνθεση λιπιδίων (Gill, Hall, και Ratledge 1977; Makri κ.ά. 2011)

Στην διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες ελαιογόνων μυκήτων του γένους *Rhodotorula* σε υπόστρωμα παραπροϊόντος βύνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πιο ικανοποιητική συσσώρευση λιπιδίων 33%, με υπόστρωμα το παραπροϊόν, για το στέλεχος *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-9791 σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Ενώ ταυτόχρονα έχει συσσωρεύσει και το μεγαλύτερο ποσοστό λιπιδίων 43%, με υπόστρωμα την γλυκόζη σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη.

Οι Sae-ngae κ.ά. (2019) καλλιέργησαν τρία είδη μυκήτων, *Trichosporonoides spathulata* JU457, *Rhodotorula mucilaginosa* G43 και *Yarrowia lipolytica* TISTR 515 σε υπόστρωμα BSG και σε υπόστρωμα με y.e. Τα αποτελέσματα από αυτό το πείραμα έδειξαν ότι και οι τρεις μύκητες όταν αναπτύσσονταν σε υπόστρωμα BSG συσσώρευαν 13% - 24% λίπους επί

της ξηρής βιομάζας κατά την διάρκεια της φάση προσαρμογής (mid log phase) και το ποσοστό αυξανόταν όταν ο μικροοργανισμός έμπαινε στην εκθετική φάση (late log phase). Σε υπόστρωμα με BSG τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ζύμη *Trichosporonoides spathulata* JU4-57 συσσωρεύσε  $62.9 \pm 5.6$  mg-lipid/g-substrate ενώ η βιομάζα που παρατηρήθηκε έφτανε τα  $0.30 \pm 0.01$  g-cell/g-substrate. Η ζύμη *Rhodotorula mucilaginosa* G43 συσσωρεύσε  $38.3 \pm 0.71$  mg-lipid/g-substrate ενώ η βιομάζα που παρατηρήθηκε έφτανε τα  $0.44 \pm 0.002$  g-cell/g-substrate. Τέλος η ζύμη *Yarrowia lipolytica* TISTR 515 G43 συσσωρεύσε  $50.1 \pm 2.83$  mg-lipid/g-substrate ενώ η βιομάζα που παρατηρήθηκε έφτανε τα  $0.36 \pm 0.004$  g-cell/g-substrate. Τα καλύτερα αποτελέσματα παραγωγής βιομάζας και λίπους σε υπόστρωμα με y.e. τα έδωσε η ζύμη *Trichosporonoides spathulata* JU4-57 με τη βιομάζα να φτάνει τα  $0.15 \pm 0.004$  g-cell/g-substrate και το λίπος  $39.9 \pm 0.62$  mg-lipid/g-substrate

Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται ότι η πιο αποτελεσματική ζύμη από αυτές τις τρεις και στα δύο υποστρώματα, για την παραγωγή λιπιδίων ήταν η *Trichosporonoides spathulata* JU4-57 αναπτυσσόμενη και στα δύο υποστρώματα.

Στελέχη της *R. kratochvilovae* έχουν παρατηρηθεί να παράγουν σημαντικές ποσότητες εξωκυτταρικών γλυκολιπιδίων (Byrtusová κ.ά. 2021), κάτι που παρατηρήθηκε και σε αυτή τη μελέτη.

Εκτός από την παραγωγή βιομάζας και μικροβιακού λίπους παρατηρήθηκε και η παραγωγή ενός ιδιαίτερου αρώματος. Οι διάφορες συγκεντρώσεις στα τερπενοειδή, τα νορισοπερνοειδή και σε C6 αλκοόλες στα κρασιά που προέκυψαν από διαφορετικά στελέχη φαίνεται να υπήρχε δραστηριότητα γλυκοσιδάσης. Σε αυτά οφείλεται και το έντονο και φρουτώδες άρωμα που υπάρχει στα περισσότερα κρασιά καθώς και στους καπνούς (Hu κ.ά. 2016). Πάραυτα ο τομέας της βιοτεχνολογίας έχει απομονώσει τη β-δαμασκόνη στα καρροτενοειδή που παράγονται από μικροοργανισμούς (Isoe, Katsumura, και Sakan 1973). Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ζύμες που παράγουν καρροτενοειδή με φυσικό αποτέλεσμα και την ταυτόχρονη παραγωγή αρώματος που θύμιζε φρούτα, λουλούδια καθώς και φύλλα από εσπεριδοειδή.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω προκύπτει ότι η αξιοποίηση του παραπροϊόντος βύνης με ζύμωση υγρής κατάστασης φαίνεται ως μια καλή προοπτική για την παραγωγή μικροβιακού λίπους. Το στέλεχος *Rhodotorula musilaginosa* 9791 ανταποκρίνεται καλύτερα, όταν

καλλιεργείται σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη, αυξάνοντας τη βιομάζα και τη συσσώρευση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Το παραπροϊόν βύνης δείχνει να μειονεκτεί στην συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων σε σχέση με άλλα υποστρώματα, όμως, όντας παραπροϊόν, έχει το πλεονέκτημα ότι δεν προσθέτει κόστος στην διαδικασία της ζύμωσης. Μελλοντικά, ίσως να ήταν αξιόλογο να μελετηθεί η ανάπτυξη του μύκητα *Rhodotorula musilaginosa* 9791 σε υπόστρωμα BSG με περαιτέρω εμπλουτισμό του σε θρεπτικά συστατικά.

## 5 Βιβλιογραφία

- Μπέλλου, Σταματία. 2015. ‘Συγκριτικές μελέτες ελαιογένεσης σε αυτότροφους (*Chlorella* sp., *Nannochloropsis salina*) και ετερότροφους (*Yarrowia lipolytica*) μικροοργανισμούς’, Ιανουάριος. <http://hdl.handle.net/10889/9185>.
- ‘ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ - ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ.pdf’. χ.χ. Ημερομηνία πρόσβασης 4 Σεπτέμβριος 2023. 1.
- Aggelis, G., D. Iconomou, M. Christou, D. Bokas, S. Kotzailias, G. Christou, V. Tsagou, και S. Papanikolaou. 2003. ‘Phenolic Removal in a Model Olive Oil Mill Wastewater Using *Pleurotus ostreatus* in Bioreactor Cultures and Biological Evaluation of the Process’. *Water Research* 37 (16): 3897–3904. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00313-0).
- Angerbauer, C., M. Siebenhofer, M. Mittelbach, και G. M. Guebitz. 2008. ‘Conversion of Sewage Sludge into Lipids by *Lipomyces starkeyi* for Biodiesel Production’. *Bioresource Technology* 99 (8): 3051–56. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.045>.
- Anunciato, Talita Pizza, και Pedro Alves da Rocha Filho. 2012. ‘Carotenoids and Polyphenols in Nutricosmetics, Nutraceuticals, and Cosmeceuticals’. *Journal of Cosmetic Dermatology* 11 (1): 51–54. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2011.00600.x>.
- Arous, Fatma, Samia Azabou, Atef Jaouani, Hela Zouari-Mechichi, Moncef Nasri, και Tahar Mechichi. 2016. ‘Biosynthesis of Single-Cell Biomass from Olive Mill Wastewater by Newly Isolated Yeasts’. *Environmental Science and Pollution Research* 23 (7): 6783–92. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5924-2>.
- Athenstaedt, Karin, Pascale Jolivet, Céline Boulard, Michel Zivy, Luc Negroni, Jean-Marc Nicaud, και Thierry Chardot. 2006. ‘Lipid Particle Composition of the Yeast *Yarrowia lipolytica* Depends on the Carbon Source’. *PROTEOMICS* 6 (5): 1450–59. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500339>.
- Bamforth, C.W. 2017. ‘Progress in Brewing Science and Beer Production’. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 8 (1): 161–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060816-101450>.
- Bellou, Stamatia, και George Aggelis. 2013. ‘Biochemical Activities in *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis salina* during Lipid and Sugar Synthesis in a Lab-Scale Open Pond



- Simulating Reactor'. *Journal of Biotechnology* 164 (2): 318–29. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.01.010>.
- Bellou, Stamatia, Mohammed N. Baeshen, Ahmed M. Elazzazy, Dimitra Aggeli, Fotoon Sayegh, και George Aggelis. 2014. 'Microalgal Lipids Biochemistry and Biotechnological Perspectives'. *Biotechnology Advances* 32 (8): 1476–93. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>.
- Bellou, Stamatia, Anna Makri, Dimitrios Sarris, Konstantinos Michos, Penelope Rentoumi, Ayhan Celik, Seraphim Papanikolaou, και George Aggelis. 2014. 'The Olive Mill Wastewater as Substrate for Single Cell Oil Production by *Zygomycetes*'. *Journal of Biotechnology* 170 (Ιανουάριος): 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.11.015>.
- Bellou, Stamatia, Anna Moustogianni, Anna Makri, και George Aggelis. 2012. 'Lipids Containing Polyunsaturated Fatty Acids Synthesized by *Zygomycetes* Grown on Glycerol'. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166 (1): 146–58. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9411-z>.
- Bellou, Stamatia, Irene-Eva Triantaphyllidou, Dimitra Aggeli, Ahmed Mohammed Elazzazy, Mohammed Nabih Baeshen, και George Aggelis. 2016. 'Microbial Oils as Food Additives: Recent Approaches for Improving Microbial Oil Production and Its Polyunsaturated Fatty Acid Content'. *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology • Plant biotechnology*, 37 (Φεβρουάριος): 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.005>.
- Biswas, S K, K Yokoyama, K Nishimura, και M Miyaji. 2001. 'Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene.' *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51 (3): 1191–99. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1191>.
- Botham, Philip A., και Colin Ratledge. 1979. 'A Biochemical Explanation for Lipid Accumulation in *Candida* 107 and Other Oleaginous Micro-organisms'. *Microbiology* 114 (2): 361–75. <https://doi.org/10.1099/00221287-114-2-361>.
- Boulton, Christopher A., και Colin Ratledge. 1981. 'Correlation of Lipid Accumulation in Yeasts with Possession of ATP: Citrate Lyase'. *Microbiology* 127 (1): 169–76. <https://doi.org/10.1099/00221287-127-1-169>.

- Byrtusová, D.; Szotkowski, M.; Kurowska, K.; Shapaval, V.; Márová, I. 2021. *Rhodotorula kratochvilovae* Ccy 20-2-26—the Source of Multifunctional Metabolites. *Microorganisms*, 9, 1–18, doi:10.3390/microorganisms9061280.
- Buzzini, P. 2000. ‘An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source’. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24 (1): 41–45. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900765>.
- Capus, Aurélie, Marianne Monnerat, Luiz Carlos Ribeiro, Wanderley de Souza, Juliana Lopes Martins, και Celso Sant’Anna. 2016. ‘Application of High-Content Image Analysis for Quantitatively Estimating Lipid Accumulation in Oleaginous Yeasts with Potential for Use in Biodiesel Production’. *Bioresource Technology* 203 (Μάρτιος): 309–17. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.067>.
- Carocho, Márcio, Patricia Morales, και Isabel C. F. R. Ferreira. 2015. ‘Natural Food Additives: Quo Vadis?’ *Trends in Food Science & Technology* 45 (2): 284–95. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>.
- Celus, Inge, Kristof Brijs, και Jan A. Delcour. 2006. ‘The Effects of Malting and Mashing on Barley Protein Extractability’. *Journal of Cereal Science* 44 (2): 203–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.003>.
- Certik, Milan, και Sakayu Shimizu. 1999. ‘Biosynthesis and Regulation of Microbial Polyunsaturated Fatty Acid Production’. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87 (1): 1–14. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80001-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80001-2).
- Chatzifragkou, Afroditi, Stylianos Fakas, Maria Galiotou-Panayotou, Michael Komaitis, George Aggelis, και Seraphim Papanikolaou. 2010. ‘Commercial Sugars as Substrates for Lipid Accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* Fungi’. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112 (9): 1048–57. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000027>.
- Del Campo, José A., Mercedes García-González, και Miguel G. Guerrero. 2007. ‘Outdoor Cultivation of Microalgae for Carotenoid Production: Current State and Perspectives’. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (6): 1163–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>.
- Diamantopoulou, Panagiota, Seraphim Papanikolaou, Maria Kapoti, Michael Komaitis, George Aggelis, και Antonios Philippoussis. 2012. ‘Mushroom Polysaccharides and Lipids Synthesized in Liquid Agitated and Static Cultures. Part I: Screening Various

- Mushroom Species'. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167 (3): 536–51. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9713-9>.
- Diamantopoulou, Panagiota, Seraphim Papanikolaou, Michael Komaitis, George Aggelis, και Antonios Philippoussis. 2014. 'Patterns of Major Metabolites Biosynthesis by Different Mushroom Fungi Grown on Glucose-Based Submerged Cultures'. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37 (7): 1385–1400. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1112-2>.
- Dworecka-Kaszak, Bożena, και Magdalena Kizerwetter-Świda. γ.γ. 'Pseudomycelium Forming *Rhodotorula* – Unusual Picture of Biofilm'.
- Easterling, Emily R., W. Todd French, Rafael Hernandez, και Margarita Licha. 2009. 'The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*'. *Bioresource Technology* 100 (1): 356–61. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.030>.
- Evans, Christopher Thomas, και Colin Ratledge. 1985. 'Possible regulatory roles of ATP:citrate lyase, malic enzyme, and AMP deaminase in lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14'. *Canadian Journal of Microbiology* 31 (11): 1000–1005. <https://doi.org/10.1139/m85-189>.
- Fakas, Stylianos, Milan Čertík, Seraphim Papanikolaou, George Aggelis, Michael Komaitis, και Maria Galiotou-Panayotou. 2008. 'γ-Linolenic Acid Production by *Cunninghamella echinulata* Growing on Complex Organic Nitrogen Sources'. *Bioresource Technology* 99 (13): 5986–90. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.016>.
- Fakas, Stylianos, Maria Galiotou-Panayotou, Seraphim Papanikolaou, Michael Komaitis, και George Aggelis. 2007. 'Compositional Shifts in Lipid Fractions during Lipid Turnover in *Cunninghamella echinulata*'. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (5): 1321–27. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.005>.
- Fakas, Stylianos, Anna Makri, Maria Mavromati, Maria Tselepi, και George Aggelis. 2009. 'Fatty Acid Composition in Lipid Fractions Lengthwise the Mycelium of *Mortierella isabellina* and Lipid Production by Solid State Fermentation'. *Bioresource Technology* 100 (23): 6118–20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.015>.
- Fakas, Stylianos, Seraphim Papanikolaou, Athanasios Batsos, Maria Galiotou-Panayotou, Athanasios Mallouchos, και George Aggelis. 2009. 'Evaluating Renewable Carbon Sources as Substrates for Single Cell Oil Production by *Cunninghamella echinulata*

- and *Mortierella isabellina*'. *Biomass and Bioenergy* 33 (4): 573–80. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.09.006>.
- Fakas, Stylianos, Seraphim Papanikolaou, Maria Galiotou-Panayotou, Michael Komaitis, και George Aggelis. 2006. 'Lipids of *Cunninghamella echinulata* with Emphasis to  $\gamma$ -Linolenic Acid Distribution among Lipid Classes'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73 (3): 676–83. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0506-3>.
- Fărcaș, Anca Corina, Sonia Ancuța Socaci, Elena Mudura, Francisc Vasile Dulf, Dan C. Vodnar, Maria Tofană, Liana Claudia Salanță, κ.ά. 2017. *Exploitation of Brewing Industry Wastes to Produce Functional Ingredients*. *Brewing Technology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69231>.
- Fraser, Paul D, και Peter M Bramley. 2004. 'The Biosynthesis and Nutritional Uses of Carotenoids'. *Progress in Lipid Research* 43 (3): 228–65. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002>.
- Galiotou-Panayotou, Maria, Ourania Kalantzi, και George Aggelis. 1998. 'Modelling of Simultaneous Production of Polygalacturonase and Exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915'. *Antonie van Leeuwenhoek* 73 (2): 155–62. <https://doi.org/10.1023/A:1000657403593>.
- Georgiou, Christos D., και David W. Deamer. 2014. 'Lipids as Universal Biomarkers of Extraterrestrial Life'. *Astrobiology* 14 (6): 541–49. <https://doi.org/10.1089/ast.2013.1134>.
- Gill, C O, M J Hall, και C Ratledge. 1977. 'Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture'. *Applied and Environmental Microbiology* 33 (2): 231–39. <https://doi.org/10.1128/aem.33.2.231-239.1977>.
- 'Global Carotenoids Market Size, Share & Growth Analysis Report'. χ.χ. Ημερομηνία πρόσβασης 22 Ιούνιος 2023. <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html>.
- Goodwin, T. W. 1980. 'Biosynthesis of Carotenoids'. Στο *The Biochemistry of the Carotenoids: Volume I Plants*, επιμέλεια T. W. Goodwin, 33–76. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-5860-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-009-5860-9_2).
- Gouveia, L., P. Rema, O. Pereira, και J. Empis. 2003. 'Colouring Ornamental Fish (*Cyprinus Carpio* and *Carassius Auratus*) with Microalgal Biomass'. *Aquaculture Nutrition* 9 (2): 123–29. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00233.x>.

- Granger, L.-M., P. Perlot, G. Goma, και A. Pareilleux. 1993. 'Effect of Various Nutrient Limitations on Fatty Acid Production by *Rhodotorula glutinis*'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (6): 784–89. <https://doi.org/10.1007/BF00167145>.
- Gunstone, Frank D., και John L. Harwood. 2007. *The Lipid Handbook with CD-ROM*. CRC Press.
- Hayman, Ernest P., Henry Yokoyama, Clinton O. Chichester, και Kenneth L. Simpson. 1974. 'Carotenoid Biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*'. *Journal of Bacteriology* 120 (3): 1339–43. <https://doi.org/10.1128/jb.120.3.1339-1343.1974>.
- Hernández-Almanza, Ayerim, Julio Cesar Montanez, Miguel A. Aguilar-González, Cristian Martínez-Ávila, Raúl Rodríguez-Herrera, και Cristóbal N. Aguilar. 2014. '*Rhodotorula glutinis* as Source of Pigments and Metabolites for Food Industry'. *Food Bioscience* 5 (Μάρτιος): 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007>.
- Hu, K., X.L. Zhu, H. Mu, Y. Ma, N. Ullah, και Y.S. Tao. 2016. 'A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: its application potential in wine aroma enhancement'. *Letters in Applied Microbiology* 62 (2): 169–76. <https://doi.org/10.1111/lam.12527>.
- 'IJFANS International Journal of Food and Nutritional Sciences'. χ.χ. Ημερομηνία πρόσβασης 22 Ιούνιος 2023. <https://www.ijfans.org/issue-content/bioutilization-of-kinnow-waste-for-the-production-of-biopigments-using-submerged-fermentation-91>.
- Ikram, Sana, LianYan Huang, Huijuan Zhang, Jing Wang, και Meng Yin. 2017. 'Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain'. *Journal of Food Science* 82 (10): 2232–42. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13794>.
- Isoe, Sachihiko, Shigeo Katsumura, και Takeo Sakan. 1973. 'The Synthesis of Damascenone and  $\beta$ -Damascone and the Possible Mechanism of Their Formation from Carotenoids'. *Helvetica Chimica Acta* 56 (5): 1514–16. <https://doi.org/10.1002/hlca.19730560508>.
- Jacometti, Giselle A., Léa R. P. F. Mello, Pedro H. A. Nascimento, Ana Claudia Sueiro, Fabio Yamashita, και Suzana Mali. 2015. 'The Physicochemical Properties of Fibrous Residues from the Agro Industry'. *LWT - Food Science and Technology* 62 (1, Part 1): 138–43. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.044>.
- Jahurul, M. H. A., I. S. M. Zaidul, N. A. N. Norulaini, F. Sahena, S. Jinap, J. Azmir, K. M. Sharif, και A. K. Mohd Omar. 2013. 'Cocoa Butter Fats and Possibilities of Substitution in Food Products Concerning Cocoa Varieties, Alternative Sources,

- Extraction Methods, Composition, and Characteristics'. *Journal of Food Engineering*, SI: Extraction and Encapsulation, 117 (4): 467–76. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.024>.
- Jakobsen, Anita N., Inga M. Aasen, Kjell D. Josefsen, και Arne R. Strøm. 2008. 'Accumulation of Docosaehexaenoic Acid-Rich Lipid in *Thraustochytrid aurantiochytrium* sp. Strain T66: Effects of N and P Starvation and O<sub>2</sub> Limitation'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (2): 297–306. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1537-8>.
- Johnson, Eric A., και Michael J. Lewis. 1979. 'Astaxanthin Formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma*'. *Microbiology* 115 (1): 173–83. <https://doi.org/10.1099/00221287-115-1-173>.
- Kavadia, A., M. Komaitis, I. Chevalot, F. Blanchard, I. Marc, και G. Aggelis. 2001. 'Lipid and  $\gamma$ -Linolenic Acid Accumulation in Strains of *Zygomycetes* Growing on Glucose'. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78 (4): 341–46. <https://doi.org/10.1007/s11746-001-0266-3>.
- Kot, Anna M., Stanisław Błażej, Agnieszka Kurcz, Iwona Gientka, και Marek Kieliszek. 2016. '*Rhodotorula glutinis*—Potential Source of Lipids, Carotenoids, and Enzymes for Use in Industries'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (14): 6103–17. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>.
- Krinsky, Norman I., και Elizabeth J. Johnson. 2005. 'Carotenoid Actions and Their Relation to Health and Disease'. *Molecular Aspects of Medicine* 26 (6): 459–516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>.
- Laskin, Allen I., Joan W. Bennett, και Geoffrey M. Gadd. 2002. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press.
- Latha, B. V., K. Jeevaratnam, H. S. Murali, και K. S. Manja. 2005. 'Influence of Growth Factors on Carotenoid Pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from Natural Source'. *IJBT Vol.4(3) July 2005*. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/5743>.
- Lie, S. 1973. 'The Ebc-Ninhydrin Method for Determination of Free Alpha Amino Nitrogen'. *Journal of the Institute of Brewing* 79 (1): 37–41. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x>.
- Linko, Matti, Auli Haikara, Anneli Ritala, και Merja Penttilä. 1998. 'Recent Advances in the Malting and Brewing Industry' Based on a Lecture Held at the Symposium 'Biotechnology in Advanced Food and Feed Processing', at the 8th European

- Congress on Biotechnology (ECB8) in Budapest, Hungary, August 1997.1'. *Journal of Biotechnology* 65 (2): 85–98. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00135-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00135-7).
- Liu, Hongwei, Xin Zhao, Fangjun Wang, Yonghong Li, Xining Jiang, Mingliang Ye, Zongbao K. Zhao, και Hanfa Zou. 2009. 'Comparative Proteomic Analysis of *Rhodosporidium toruloides* during Lipid Accumulation'. *Yeast* 26 (10): 553–66. <https://doi.org/10.1002/yea.1706>.
- Makri, Anna, Stamatia Bellou, Maria Birkou, Konstantinos Papatrehas, Nikolas P. Dolapsakis, Dimitrios Bokas, Seraphim Papanikolaou, και George Aggelis. 2011. 'Lipid Synthesized by Micro-Algae Grown in Laboratory- and Industrial-Scale Bioreactors'. *Engineering in Life Sciences* 11 (1): 52–58. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000086>.
- Makri, Anna, Stylianos Fakas, και George Aggelis. 2010. 'Metabolic Activities of Biotechnological Interest in *Yarrowia lipolytica* Grown on Glycerol in Repeated Batch Cultures'. *Bioresource Technology* 101 (7): 2351–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.024>.
- Maoka, Takashi. 2011. 'Carotenoids in Marine Animals'. *Marine Drugs* 9 (2): 278–93. <https://doi.org/10.3390/md9020278>.
- Meeuwse, Petra, Johannes Tramper, και Arjen Rinzema. 2011. 'Modeling Lipid Accumulation in Oleaginous Fungi in Chemostat Cultures: I. Development and Validation of a Chemostat Model for *Umbelopsis isabellina*'. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34 (8): 939–49. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0545-8>.
- Miller, G. L. 1959. 'Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar'. *Analytical Chemistry* 31 (3): 426–28. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Mussatto, S. I., G. Dragone, και I. C. Roberto. 2006. 'Brewers' Spent Grain: Generation, Characteristics and Potential Applications'. *Journal of Cereal Science* 43 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>.
- . 2007. 'Ferulic and P-Coumaric Acids Extraction by Alkaline Hydrolysis of Brewer's Spent Grain'. *Industrial Crops and Products* 25 (2): 231–37. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.11.001>.
- Mussatto, Solange I. 2009. 'Biotechnological Potential of Brewing Industry By-Products'. Στο *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*, επιμέλεια Poonam Singh nee' Nigam και Ashok Pandey, 313–26. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_16).

- Olajire, Abass A. 2020. ‘The Brewing Industry and Environmental Challenges’. *Journal of Cleaner Production* 256 (Μάιος): 102817. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.03.003>.
- Papanikolaou, Seraphim, και George Aggelis. 2011. ‘Lipids of Oleaginous Yeasts. Part I: Biochemistry of Single Cell Oil Production’. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113 (8): 1031–51. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100014>.
- Papanikolaou, Seraphim, Michael Komaitis, και George Aggelis. 2004. ‘Single Cell Oil (SCO) Production by *Mortierella isabellina* Grown on High-Sugar Content Media’. *Bioresource Technology* 95 (3): 287–91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.016>.
- Papanikolaou, Seraphim, Lionel Muniglia, Isabelle Chevalot, George Aggelis, και Ivan Marc. 2003. ‘Accumulation of a Cocoa-Butter-Like Lipid by *Yarrowia lipolytica* Cultivated on Agro-Industrial Residues’. *Current Microbiology* 46 (2): 0124–30. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3833-3>.
- Patel, Alok, Fabio Mikes, Saskja Bühler, και Leonidas Matsakas. 2018. ‘Valorization of Brewers’ Spent Grain for the Production of Lipids by Oleaginous Yeast’. *Molecules* 23 (12): 3052. <https://doi.org/10.3390/molecules23123052>.
- Pathania, Shivali, Somesh Sharma, και Kajal Kumari. 2018. ‘Solid State Fermentation of BSG for Citric Acid Production’.
- Perrier, V., E. Dubreucq, και P. Galzy. 1995. ‘Fatty Acid and Carotenoid Composition of *Rhodotorula* Strains’. *Archives of Microbiology* 164 (3): 173–79. <https://doi.org/10.1007/BF02529968>.
- Probst, Kyle V., Leslie R. Schulte, Timothy P. Durrett, Mary E. Rezac, και Praveen V. Vadlani. 2016. ‘Oleaginous Yeast: A Value-Added Platform for Renewable Oils’. *Critical Reviews in Biotechnology* 36 (5): 942–55. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1064855>.
- Rakicka, Magdalena, Zbigniew Lazar, Thierry Dulermo, Patrick Fickers, και Jean Marc Nicaud. 2015. ‘Lipid Production by the Oleaginous Yeast *Yarrowia lipolytica* Using Industrial By-Products under Different Culture Conditions’. *Biotechnology for Biofuels* 8 (1): 104. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0286-z>.
- Rao, A. V., και L. G. Rao. 2007. ‘Carotenoids and Human Health’. *Pharmacological Research, Nutritional Pharmacology*, 55 (3): 207–16. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012>.



- Ratledge, C. 1994. ‘Yeasts, Moulds, Algae and Bacteria as Sources of Lipids’. Στο *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*, επιμέλεια B. S. Kamel και Y. Kakuda, 235–91. Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2109-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2109-9_9).
- Ratledge, Colin, και Zvi Cohen. 2008. ‘Microbial and Algal Oils: Do They Have a Future for Biodiesel or as Commodity Oils?’ *Lipid Technology* 20 (7): 155–60. <https://doi.org/10.1002/lite.200800044>.
- Reis, J. M. L., και E. M. Menezes. 2017. ‘Barley Residue Reinforced Polymer Mortars: Fracture Mechanics Approach’. *Composite Structures* 173 (Αύγουστος): 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2017.04.005>.
- Robertson, James A., Kerry J. A. I’Anson, Janneke Treimo, Craig B. Faulds, Tim F. Brocklehurst, Vincent G. H. Eijsink, και Keith W. Waldron. 2010. ‘Profiling Brewers’ Spent Grain for Composition and Microbial Ecology at the Site of Production’. *LWT - Food Science and Technology* 43 (6): 890–96. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.019>.
- Sae-ngae, Saithip, Benjamas Cheirsilp, Thanwadee Tachapattaweawrakul Suksaroj, και Punyanich Intharapat. 2019. ‘Acid Hydrolysis of Brewers’ Industrial Wastes and Their Use for Lipid Production by Oleaginous Yeasts’. *Journal of Water and Environment Technology* 17 (5): 336–44. <https://doi.org/10.2965/jwet.18-055>.
- Sarris, Dimitris, και Seraphim Papanikolaou. 2016. ‘Biotechnological Production of Ethanol: Biochemistry, Processes and Technologies’. *Engineering in Life Sciences* 16 (4): 307–29. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400199>.
- Shahidi, Fereidoon, και Marian Naczki. 2003. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press.
- Simpson, Kenneth L., T. O. M. Nakayama, και C. O. Chichester. 1964. ‘Biosynthesis of yeast carotenoids’. *Journal of Bacteriology* 88 (6): 1688–94. <https://doi.org/10.1128/jb.88.6.1688-1694.1964>.
- Statzell-Tallman, A., και J. W. Fell. 1998. ‘105 - *Rhodotorula* F.C. Harrison’. Στο *The Yeasts (Fourth Edition)*, επιμέλεια Cletus P. Kurtzman και Jack W. Fell, 800–827. Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044481312-1/50110-6>.
- Stojceska, Valentina, και Paul Ainsworth. 2008. ‘The Effect of Different Enzymes on the Quality of High-Fibre Enriched Brewer’s Spent Grain Breads’. *Food Chemistry* 110 (4): 865–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.074>.

- Thevenieau, France, και Jean-Marc Nicaud. 2013. 'Microorganisms as Sources of Oils'. *OCL* 20 (6): D603. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013034>.
- Thiago, Rocha dos Santos Mathias, Paulo Moretzsohn de Mello Pedro, και Flavia Camporese Srvulo Eliana. 2014. 'Solid Wastes in Brewing Process: A Review'. *Journal of Brewing and Distilling* 5 (1): 1–9. <https://doi.org/10.5897/JBD2014.0043>.
- Wirth, Fernanda, και Luciano Z. Goldani. 2012. 'Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen'. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2012 (Οκτώβριος): e465717. <https://doi.org/10.1155/2012/465717>.
- Woodside, Jayne V., Alanna J. McGrath, Natalie Lyner, και Michelle C. McKinley. 2015. 'Carotenoids and Health in Older People'. *Maturitas* 80 (1): 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.10.012>.
- Wunderlich, Sascha, και Werner Back. 2009. '1 - Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria'. Στο *Beer in Health and Disease Prevention*, επιμέλεια Victor R. Preedy, 3–16. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00001-8>.
- Wynn, James P, Adil A Hamid, Yonghua Li, και Colin Ratledge. 2001. 'Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*'. *Microbiology* 147 (10): 2857–64. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2857>.
- Yousuf, Abu, Filomena Sannino, Veria Addorisio, και Domenico Pirozzi. 2010. 'Microbial Conversion of Olive Oil Mill Wastewaters into Lipids Suitable for Biodiesel Production'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (15): 8630–35. <https://doi.org/10.1021/jf101282t>.