

Ludmiła Bogacz-Radomska

Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
e-mail: ludmila.bogacz-radomska@ue.wroc.pl

Joanna Harasym

Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
College of Agricultural and Forestry Engineering, University of Valladolid
e-mail: joanna.harasym@ue.wroc.pl

BIOSYNTeza BETA-KAROTENU I KAROTENOIDÓW Z UDZIAŁEM DROŻDŻY *RHODOTORULA SPP.* – PRZEGLĄD BADAŃ

BIOSYNTHESIS OF BETA-CAROTENE AND CAROTENIDS BY YEAST OF *RHODOTORULA SPP.* – A REVIEW

DOI: 10.15611/nit.2017.4.01
JEL Classification: Q10

Summary: Biosynthesis of carotenoids, including β -carotene, is an area of continuous scientific research due to their valuable pro-health properties and high coloring power. This paper presents an overview of the *Rhodotorula spp.* culture, esp. methods and conditions applied in carotenoids' production. In this paper the influence of combined cultures, pH, temperature, carbon sources, the proportion of carbon atoms to nitrogen, concentrations of micro- and macronutrient sources, oxidative stress, UV and VIS radiation as well as culturing methods for carotenogenesis in yeast cells of *Rhodotorula spp.* was characterized. The list of yeast species from the genus *Rhodotorula*, which naturally synthesize carotenoids, was presented.

Keywords: carotenoids, β -carotene, *Rhodotorula spp.*

Streszczenie: Biosynteza karotenoidów, w tym β -karotenu, jest obszarem ciągłych badań naukowych ze względu na ich cenne właściwości prozdrowotne i dużą siłę barwiącą. W niniejszej pracy przedstawiono przegląd metod oraz warunków hodowli drożdży *Rhodotorula spp.*, prowadzonych w celu otrzymywania karotenoidów. Omówiono wpływ hodowli skojarzonych, pH, temperatury, źródeł węgla, proporcji atomów węgla do azotu, stężeń źródeł mikro- i makroelementów, stresu oksydacyjnego, promieniowania UV i VIS oraz metody hodowli na proces karotenogenezy w komórkach drożdży *Rhodotorula spp.* Przedstawiono wykaz gatunków drożdży z rodzaju *Rhodotorula*, które naturalnie syntetyzują karotenoidy.

Słowa kluczowe: karotenoidy, β -karoten, *Rhodotorula spp.*

1. Wstęp

β -karoten należy do nieutlenionych karotenoidów. Wykazuje dużą bioaktywność i jest powszechnie stosowany w medycynie. Przez wzgląd na właściwości prozdrowotne β -karoten jest cennym dodatkiem do żywności. Jego znaczenie przemysłowe wynika również z własności barwiących.

β -karoten jest metabolitem wtórnym, syntetyzowanym zarówno przez rośliny wyższe, jak i przez drobnoustroje. Biosynteza β -karotenu z udziałem bakterii, drożdży i pleśni jest w ostatnim czasie obszarem licznych badań naukowych. Wśród drobnoustrojów wykorzystywanych w pracach badawczych najczęściej wymienia się pleśnię *Blakeslea trispora* oraz drożdże z rodzaju *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* i *Phaffia*, które odznaczają się wysoką szybkością biosyntezy. Badania naukowe są ukierunkowane na zwiększenie szybkości i wydajności biosyntezy produktu. Ze względu na łatwość prowadzenia hodowli i ekstrakcji barwnika na szczególną uwagę zasługują drożdże z rodzaju *Rhodotorula*.

2. Badania nad produktywnością biosyntezy β -karotenu i karotenoidów przez wybrane gatunki drożdży *Rhodotorula* spp.

W pracach badawczych poświęconych studiom nad biosyntezą β -karotenu z udziałem drożdży stosowano dotychczas wiele szczepów. Wykaz gatunków drożdży syntetyzujących β -karoten został przedstawiony w tab. 1. Spośród wymienionych gatunków największą grupę stanowią drożdże z rodzaju *Rhodotorula*.

W hodowlach drożdży z rodzaju *Rhodotorula* wyizolowanych w regionie Patagonii największą szybkością objętościową ($1444 \mu\text{g dm}^{-3} \text{h}^{-1}$) i właściwą ($301 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) produkcji karotenoidów charakteryzowały się hodowle drożdży *Rhodotorula rubra* (*mucilaginoso*) CRUB 0064. W tych hodowlach autorzy uzyskiwali ogólną zawartość karotenoidów w zakresie od $60 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ syntetyzowaną przez szczepy naturalnie występujące w przyrodzie do $301 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ otrzymywanych w hodowlach zmutowanych szczepów. W hodowlach charakteryzujących się wyższym stężeniem biomasy w podłożu hodowlanym badacze uzyskali niższą zawartość karotenoidów [Libkind, van Brook 2006; Aksu, Eren 2005].

W hodowlach z użyciem szczepu *R. mucilaginoso*-137 uzyskano największą zawartość β -karotenu ($P_{\text{KB}} = 16,0 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) i karotenoidów ($P_{\text{KC}} = 69,0 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) przy stężeniu biomasy równym $8,6 \text{ g dm}^{-3}$ [Maldonado i in. 2008]. Zespół Chanchay i in. w hodowlach drożdży *R. rubra* uzyskał zróżnicowaną zawartość karotenoidów (od $12,39$ do $164,54 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) w zależności od źródła węgla [Chanchay i in. 2012]. Natomiast zespół Cutzu i in. przy stężeniu biomasy *R. rubra* równym $11,37 \text{ g dm}^{-3}$ otrzymał ogólną zawartość karotenoidów o wartości $0,26 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ [Cutzu i in. 2013].

W hodowlach zmutowanych drożdży *R. glutinis*-32 otrzymano najwyższą końcową zawartość β -karotenu ($3,94 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) i karotenoidów ($4,93 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) przy stężeniu

niu biomasy równym $26,0 \text{ g dm}^{-3}$. W tych hodowlach największa objętościowa szybkość produkcji β -karotenu nastąpiła w późniejszej fazie logarytmicznej wzrostu biomasy drożdży i wynosiła $7,25 \text{ mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ [Bhosale, Gadre 2001a]. Natomiast Buzzini i Martini, prowadząc hodowle z zastosowaniem tego samego gatunku drożdży, otrzymali końcowe stężenie biomasy równe $6,5 \text{ g dm}^{-3}$, w której zawartość β -karotenu wynosiła $84,21 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$, a zawartość wszystkich karotenoidów była równa $915,4 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ [Buzzini, Martini 2000].

Zespół Cutzu i in., prowadząc dobór szczepu spośród rodzaju *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* oraz *Sporobolomyces*, najlepsze wyniki pod względem zawartości karo-

Tabela 1. Wykaz gatunków drożdży *Rhodotorula spp.* syntetyzujących karotenoidy
Table 1. List of yeast species from *Rhodotorula spp.*, which synthesize carotenoids

Gatunki drożdży/Yeast species	Źródło/Source
<i>Rhodotorula acheniorum</i>	[Nasrabadi, Razavi 2011]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	[Bhosale Gadre 2001a] [Bhosale, Gadre 2001b] [Bhosale, Gadre 2002] [Braunwald i in. 2013] [Buzzini 2001] [Buzzini, Martini 2000] [Cutzu i in. 2013] [Frengova i in. 2004] [Latha i in. 2005] [Maldonade i in. 2008] [Malisorn, Suntornsuk 2008] [Saenge i in. 2011] [Sinisa i in. 2013] [Zhang i in. 2014]
<i>Rhodotorula gracilis</i>	[Vijayalakshmi i in. 1999] [Somashekar, Joseph 2000]
<i>Rhodotorula graminis</i>	[Buzzini i in. 2005] [Maldonade i in. 2008]
<i>Rhodotorula minuta</i>	[Maldonade i in. 2008] [Patino-Vera i in. 2005]
<i>Rhodotorula rubra</i> (<i>mucilaginoso</i>)	[Aksu, Eren 2005] [Chanchay i in. 2012] [Cutzu i in. 2013] [Frengova i in. 2004] [Libkind i van Brook 2006] [Maldonade i in. 2008] [Moline i in. 2010] [Simova i in. 2003] [Sinisa i in. 2013]

Źródło: opracowanie własne.

Source: authors' own study.

tenoidów uzyskał w hodowlach drożdży *R. glutinis* ($0,43 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) przy stężeniu biomasy równym $10,5 \text{ g dm}^{-3}$ [Cutzu i in. 2013]. Podobne wyniki badań uzyskał zespół Maldonade i in., który w hodowlach drożdży *R. glutinis* otrzymał największą zawartość β -karotenu ($57,0 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$), a zawartość karotenoidów wynosiła $132,0 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ [Maldonade i in. 2008]. W badaniach prowadzonych przez zespół Latha nad biosyntezą karotenoidów przez szczep *R. glutinis* DFR-PDY w optymalnym wariancie zawartość karotenoidów była równa $1,11 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ przy stężeniu biomasy w wysokości $9,0 \text{ g dm}^{-3}$ [Latha i in. 2005]. Zbliżone wyniki otrzymał Sinisa, prowadząc hodowle *R. glutinis*, w których końcowa zawartość β -karotenu wynosiła $1197,4 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ przy stężeniu biomasy $9,72 \text{ g dm}^{-3}$ [Sinisa i in. 2013]. Natomiast w hodowlach tych drożdży zespół Saenge i in. otrzymał stężenie karotenoidów równe $125,75 \text{ mg dm}^{-3}$ i stężenie biomasy wynoszące $8,17 \text{ g dm}^{-3}$ [Saenge i in. 2011].

Zawartość β -karotenu uzyskana przez Ferrao i Garga w hodowlach drożdży *R. graminis* RC04 zawierała się w przedziale od 29 do $150 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$, co wskazuje na duży potencjał metaboliczny tych drożdży w zakresie biosyntezy β -karotenu [Ferrao, Garg 2011].

W pracach nad biosyntezą karotenoidów przez drożdże *R. acheniorum* uzyskano końcową zawartość β -karotenu wynoszącą $11,28 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ i karotenoidów równą $12,25 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ [Nasrabadi i in. 2011].

Zastosowanie *R. gracilis* CFR-1AU w biosyntezie karotenoidów pozwoliło uzyskać ogólną zawartość karotenoidów równą $26 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ przy niskim stężeniu biomasy w podłożu hodowlanym wynoszącym $2,4 \text{ g dm}^{-3}$ [Somashekar, Joseph 2000].

3. Wpływ hodowli skojarzonych bakterii i drożdży na biosyntezę β -karotenu i karotenoidów

W literaturze można znaleźć przykłady hodowli skojarzonych drożdży z rodzaju *Rhodotorula* oraz innych drobnoustrojów, w tym bakterii i drożdży. W skojarzonych hodowlach drożdży *R. glutinis* i bakterii *Lactobacillus helveticus* końcowa zawartość β -karotenu wynosiła $43,68 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$, przy czym końcowa zawartość karotenoidów wynosiła $268,0 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$, a stężenie biomasy było równe $9,2 \text{ g dm}^{-3}$ [Frengova i in. 1997]. Inny wariant zakładał skojarzoną hodowlę okresową drożdży *R. rubra* i *Kluyveromyces lactis* w serwatce wzbogaconej makroelementami. W warunkach optymalnych całkowita zawartość karotenoidów zwiększyła się do $421,0 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$, jednak zawartość β -karotenu wynosiła tylko $31,0 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ przy stężeniu biomasy równym $17,7 \text{ g dm}^{-3}$ [Frengova i in. 2004].

W hodowlach skojarzonych drożdży *R. rubra* i bakterii *L. casei* uzyskano największą końcową zawartość β -karotenu równą $0,27 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ przy ogólnej zawartości karotenoidów na poziomie $0,45 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ i stężeniu biomasy równym $27,0 \text{ g dm}^{-3}$ [Simova i in. 2003]. Natomiast skojarzenie hodowli *R. glutinis* i *D. castellii* umożliwiło otrzymanie stężenia karotenoidów równego $9,5 \text{ mg dm}^{-3}$, przy czym 74% stanowiła torularodyna, a torulen i β -karoten pozostawały w mniejszości [Buzzini 2001].

4. Wpływ warunków hodowli na biosyntezę β -karotenu i karotenoidów

4.1. Źródła węgla

W badaniach nad biosyntezą β -karotenu z udziałem drożdży stosowano różne źródła węgla, jednak dominującym i referencyjnym źródłem była glukoza [Maldonado i in. 2008; Libkind, van Brook 2006; Bhosale, Gadre 2001a]. Stężenie glukozy w podłożach hodowlanych sięgało 4%, a zawartość β -karotenu uzyskiwana w tych hodowlach zawierała się w przedziale od $16 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ do $3,94 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$.

Wyniki badań nad wpływem różnych sacharydów na biosyntezę β -karotenu w hodowlach drożdży *R. glutinis* DFR-PDY wykazały, że w podłożach hodowlanych zawierających monosacharydy oraz disacharydy, największą zawartość karotenoidów, wynoszącą średnio $1,10 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$, a także największe stężenie biomasy sięgające ok. $11,0 \text{ g dm}^{-3}$ uzyskano z zastosowaniem fruktozy, glukozy i sacharozy o stężeniu 3% w podłożu hodowlanym [Latha i in. 2005].

Wykazano, że w hodowlach okresowych drożdży *R. rubra* w podłożu zawierającym glukozę w ilości 10 g dm^{-3} drożdże te produkują więcej karotenoidów ($15,63 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) w porównaniu z hodowlami prowadzonymi w podłożach zawierających sacharozę ($12,39 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) o tym samym stężeniu [Chanchay i in. 2012].

Wśród mieszanych źródeł węgla łączono glukozę z glicerolem. Zaobserwowano, że drożdże z rodzaju *Rhodotorula* asymilowały glicerol, zarówno w połączeniu z glukozą, jak i jako samodzielne źródło węgla. W hodowlach drożdży *R. rubra* największą zawartość β -karotenu ($564,8 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) i karotenoidów ($1469,1 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) uzyskano w hodowlach, w których stężenia glukozy i glicerolu wynosiły po 2%, natomiast w hodowlach *R. glutinis* zawartość karotenoidów równą $1944,3 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ otrzymano przy 1-procentowym stężeniu glicerolu technicznego i 3-procentowym stężeniu glukozy w podłożu hodowlanym [Sinisa i in. 2013].

Zastosowanie glicerolu odpadowego (9,5% w podłożu) jako samodzielnego źródła węgla w hodowlach *R. glutinis* pozwoliło otrzymać zawartość karotenoidów na poziomie $21,63 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$. Znacznie niższą zawartość karotenoidów ($1,99 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) uzyskano w przypadku zastosowania glicerolu odpadowego (10% w podłożu) w hodowlach drożdży *R. mucilaginosa* [Cutzu i in. 2013].

W literaturze znajdują się przykłady zastosowań produktów ubocznych z różnych gałęzi przemysłu spożywczego i produkcji biodiesla w procesie biosyntezy β -karotenu [Chanchay i in. 2012; Marova i in. 2012b; Nasrabadi i in. 2011; Aksu, Eren 2005; Frengova i in. 2004; Simova i in. 2004; Buzzini 2001; Buzzini, Martini 2000; Frengova i in. 1997].

Zbadano wpływ moszczu winogron, syropu glukozowego, melasy buraczanej, mąki sojowej i mąki kukurydzianej na produkcję karotenoidów przez drożdże *R. glutinis*. Najwyższą zawartość karotenoidów ($915,4 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) zanotowano z zasto-

sowaniem moszczu winogronowego, natomiast w hodowlach zawierających syrop glukozowy nie stwierdzono obecności β -karotenu [Buzzini, Martini 2000].

W badaniach nad przydatnością soku z trzciny cukrowej, melasy oraz odcieku z produkcji cukru zawierającego 54% (m/m) sacharozy w biosyntezie karotenoidów przez *R. rubra* uzyskano niewielkie stężenie karotenoidów [Banzatto i in. 2013].

W hodowlach drożdży *R. mucilaginosa* prowadzonych w podłożach zawierających laktozę z serwatki o stężeniu $13,2 \text{ g dm}^{-3}$ uzyskano wyższą zawartość karotenoidów ($35 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) niż w przypadku zastosowania melasy buraczanej ($21,19 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) lub glukozy ($13,94 \text{ mg g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) o jednakowym stężeniu w podłożu hodowlanym (2%) [Aksu, Eren 2005].

W okresowych hodowlach skojarzonych *R. glutinis* i bakterii *L. helveticus* zawierających serwatkę o stężeniach od $35,0$ do $70,0 \text{ g dm}^{-3}$ uzyskano najwyższą zawartość β -karotenu ($37,2 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$) w podłożach, w których stężenie laktozy zawartej w serwatce wynosiło $42,0 \text{ g dm}^{-3}$ [Fregova i in. 1997]. Inny wariant zakładał skojarzoną hodowlę okresową drożdży *R. rubra* i *K. lactis* w podłożach zawierających laktozę z serwatki o stężeniu $50,0 \text{ g dm}^{-3}$, w którym uzyskano wyższą zawartość β -karotenu ($133,0 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$), a ogólna zawartość karotenoidów wyniosła $421,0 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$. Obniżenie stężenia laktozy do $35,0 \text{ g dm}^{-3}$ skutkowało obniżeniem stężenia biomasy i karotenoidów. Wyższe stężenie laktozy ($70,0 \text{ g dm}^{-3}$) sprzyjało nagromadzeniu biomasy, jednak stężenie karotenoidów w suchej masie drożdży było od 1,5 do 2 razy niższe niż w wariantcie hodowli zawierającym $50,0 \text{ g dm}^{-3}$ laktozy [Fregova i in. 2004].

Serwatkę stosowano również w hodowlach drożdży *R. acheniorum* oraz skojarzonych hodowlach drożdży *R. rubra* i bakterii *L. casei* [Nasrabadi i in. 2011; Simova i in. 2004].

W badaniach stosowano także dodatek serwatki liofilizowanej lub pozbawionej protein oraz ekstrakt ziemniaczany o jednakowych stężeniach wynoszących $7,0 \text{ g/dm}^{-3}$ [Marova i in. 2012b]. Analiza wyników wykazała, że w hodowlach drożdży *R. glutinis* CCY 20-2-26 największy wpływ na szybkość biosyntezy β -karotenu miała serwatka pozbawiona protein. Zawartość β -karotenu uzyskana w hodowli *R. glutinis* CCY 20-2-26 była równa $1268,5 \text{ } \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$.

4.2. Stosunek liczby atomów węgla do azotu w pożywce

Analizie poddano również wpływ wzajemnych proporcji atomów węgla i azotu na biosyntezę β -karotenu, karotenoidów oraz biomasy w hodowlach drożdży *Rhodotula spp.* [Braunwald i in. 2013; Ferrao, Garg 2011; Saenge i in. 2011; Somashekar, Joseph 2000].

Wyniki badań wskazują na optymalny stosunek atomów węgla do atomów azotu wynoszący 10:1 [El-Banna i in. 2012; Somashekar, Joseph 2000; Ferrao, Garg 2011].

W badaniach prowadzonych przez zespół Braunwald i in. autorzy wykazali wzrost zawartości karotenoidów w hodowlach drożdży *R. glutinis*, w których stosunek atomów węgla do azotu był duży. Zbyt niskie stężenie azotu prowadziło do ob-

nizienia zawartości karotenoidów. Z tego względu optymalny stosunek źródeł węgla do azotu C:N ustalono na 70:1 [Braunwald i in. 2013]. Podobne wyniki uzyskał zespół Saenge i in. w hodowlach drożdży *R. glutinis* TISTR 5159, w których optymalna wzajemna proporcja atomów węgla i azotu wyniosła 85:1 [Saenge i in. 2011].

4.3. Stężenia mikro- i makroelementów oraz źródła azotu

W badaniach nad biosyntezą β -karotenu istotnym zagadnieniem jest dobór stężeń mikro- i makroelementów oraz źródeł azotu. Rodzaje źródeł mikro- i makroelementów oraz źródeł azotu stosowanych w wybranych hodowlach drożdży z rodzaju *Rhodotorula* przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2. Rodzaje źródeł mikro- i makroelementów oraz źródeł azotu stosowanych w wybranych hodowlach drożdży z rodzaju *Rhodotorula* i *Sporobolomyces*

Table 2. Sources of micro- and macroelements and nitrogen used in selected cultures of yeasts from genus *Rhodotorula* and *Sporobolomyces*

Źródło literaturowe	Ca(OH) ₂	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Ekstrakt drożdżowy	Treonina	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Ekstrakt słodowy	MnSO ₄ ·7H ₂ O	Na ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	Pepton
	g dm ⁻³										
[Aksu, Eren 2005]	0,0	1,0	0,25	2,5	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	1,0	0,0
[Bhosale, Gadre 2001a]	0,1	0,2	0,05	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
[Buzzini 2001]	0,0	8,0	0,5	4,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
[Buzzini i in. 2007]	0,0	8,0	0,5	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
[Buzzini, Martini 2000]	0,0	8,0	0,5	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
[Chanchay i in. 2012]	0,0	2,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
[Davoli i in. 2004]	0,0	1,0	0,5	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
[Frengova i in. 2004]	0,0	3,0	0,5	3,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	8,0	0,0
[Frengova i in. 2003]	0,0	5,5	0,5	5,0	0,0	0,0	20,0	0,0	3,0	6,0	0,0
[Martelli i in. 1992]	0,0	5,5	0,5	1,0	0,0	0,0	0,0	0,2	3,7	5,3	0,0
[Libkind, van Brook 2006]	0,0	2,0	0,5	1,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0
[Saenge i in. 2011]	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	5,0
[Simova i in. 2003]	0,0	5,5	0,5	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	6,0	0,0
[Sinisa i in. 2013]	0,0	5,0	0,34	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0

Źródło: opracowanie własne.

Source: authors' own study.

Na podstawie analizy danych przedstawionych w tab. 2 wnioskuje się, że wśród wymienionych związków tylko niektóre są niezbędne do biosyntezy karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula spp.* Należą do nich:

- diwodorofosforan potasu,
- siedmiowodny siarczan magnezu,
- ekstrakt drożdżowy.

Pozostałe związki są rzadziej stosowane w biosyntezie karotenoidów przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* i tym samym nie mają kluczowego znaczenia w tym procesie.

4.4. Stres oksydacyjny

Najnowsze badania dowodzą, że fizjologiczna regulacja procesu fermentacji wywoływana przez wprowadzanie stresu oksydacyjnego przez nadmierne stężenie metali oraz generatorów wolnych rodników powoduje znaczny wzrost stężenia karotenoidów. Zmiany w środowisku indukują mechanizmy adaptacyjne w komórkach drobnoustrojów, w wyniku czego właściwości fizykochemiczne komórek zmieniają się i wyzwalają się nowe szlaki metaboliczne [Mahmoud i in. 2014; Frengova, Beshkova 2009; Breierova i in. 2008; Malisorn, Suntornsuk 2008; Latha i in. 2005; Davoli i in. 2004; Marova i in. 2004; Simova i in. 2004].

Wprowadzenie do podłoża hodowlanego chlorku sodu w przedziale od 2 do 5% lub wody morskiej spowodowało znaczny wzrost stężenia karotenoidów [Mahmoud i in. 2014; Marova i in. 2012b; Bhosale, Gadre 2001b].

Prowadzono również badania nad wpływem jonów Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} i Se^{2+} oraz różnych stężeń NaCl i H_2O_2 w podłożach hodowlanych na zawartość karotenoidów w komórkach drożdży z rodzaju *Rhodotorula*. Stwierdzono, że stres komórkowy wywołowany obecnością nadmiernego stężenia jonów Zn^{2+} ($1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) oraz H_2O_2 powoduje 5-10-krotny wzrost β -karotenu, natomiast nadmierne stężenie jonów Cu^{2+} stymuluje biosyntezę torularodiny. Ekstrakty drożdży pochodzące z hodowli zawierających metale ciężkie, głównie jonów Zn^{2+} , wykazywały silne właściwości przeciwutleniające [Hanusova 2011; Hanusova i in. 2008].

Podobne rezultaty otrzymał zespół Buzziniego, który określał wpływ stężeń jonów Fe^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} w podłożach hodowlanych na produkcję β -karotenu przez drożdże *R. graminis* DBVPG 7021. Wyniki doświadczeń wykazały największy wpływ jonów Zn^{2+} (50 ppm) na biosyntezę β -karotenu, którego udział wzrósł do 80%, choć całkowita zawartość karotenoidów uległa zmniejszeniu do $192,5 \mu\text{g g}_{\text{s.m.}}^{-1}$ [Buzzini i in. 2005].

Wyniki te potwierdzono w hodowlach *Rhodotorula spp.* podczas wprowadzania do podłoża hodowlanych nadmiernych stężeń cynku ($1,0$ - $4,0 \text{ mM ZnCl}_2$), miedzi ($3,0 \text{ mM CuCl}_2$) i perhydrolu ($5,0$ - $8,0 \text{ mM H}_2\text{O}_2$). W hodowlach drożdży w podłożach zawierających jony Zn^{2+} zaobserwowano największy wzrost udziału β -karotenu [Breierova i in. 2005].

4.5. Promieniowanie widzialne i ultrafioletowe

Karotenogeneza w wielu organizmach indukowana jest przez światło, ponieważ drożdże, chroniąc się przed szkodliwym promieniowaniem ultrafioletowym, wytwarzają karotenoidy. Optymalna długość światła i jego natężenie zależą od gatunku i szczepu drożdży [Tada, Shiroishi 1982]. Wiele prac badawczych poświęconych jest określeniu wpływu promieniowania widzialnego i ultrafioletowego na proces karotenogenezy [Zhang i in. 2014; Moline i in. 2010; Stachowiak, Czarnecki 2007; Garcia-Gonzalez i in. 2005; Bhosale, Gadre 2002; del Campo i in. 2001].

Bhosale i Gadre w 2002 r. prowadzili badania nad wglębną hodowlą drożdży *R. glutinis* prowadzoną przy ciągłym naświetlaniu światłem o natężeniu 1000 luksów. W tych hodowlach stwierdzono hamujące działanie naświetlania na proces karotenogenezy, ponieważ stężenie karotenoidów obniżyło się o 34%, osiągając 83,0 mg dm⁻³. W innym wariantcie ustalono początek naświetlania na późną fazę logarytmiczną wzrostu drożdży, co skutkowało wzrostem karotenoidów i tym samym β-karotenu, którego udział wynosił ok. 91%, a końcowe stężenie w podłożu hodowlanym wzrosło do 198 mg dm⁻³, natomiast w hodowli bez dostępu światła wynosiło 125,0 mg dm⁻³ [Bhosale, Gadre 2002].

Zespół Zhang i in. w badaniach prowadzonych w 2014 r. nad wpływem gęstości strumienia energii promienistej w zakresie od 800 do 2400 μmol m⁻² s⁻¹ emitowanej przez lampę LED na hodowlę drożdży *R. glutinis* uzyskał najwyższe stężenie biomasy w podłożu hodowlanym wynoszące 17,7 g dm⁻³ i karotenoidów (2,6 mg dm⁻³) w hodowlach naświetlanych światłem o 2400 μmol m⁻² s⁻¹, co odpowiadało natężeniu światła 390 luksów [Zhang i in. 2014].

Zespół Moline i in. prowadził badania nad wpływem promieniowania ultrafioletowego UVB na biosyntezę karotenoidów przez drożdże *R. mucilaginosa*. W tym celu badacze wprowadzili zawiesinę drożdży do rurek kwarcowych umiejscowionych 20 cm od lampy Spectroline XX15-B UVB emitującej promieniowanie o długości fal od 280 do 320 nm. W szczepach, które wykazały się przeżywalnością sięgającą 44,5%, autorzy uzyskali zawartość karotenoidów równą 242,9 μg g_{s.m.}⁻¹, natomiast w komórkach drożdży o niskiej przeżywalności, wynoszącej 7,6%, zawartość karotenoidów była równa 95,7 μg g_{s.m.}⁻¹ [Moline i in. 2010].

4.6. pH podłoża

W biosyntezie karotenoidów istotną rolę odgrywa właściwy dobór pH podłoża hodowlanego. Biosynteza karotenoidów przez drożdże *Rhodotorula spp.* prowadzono przy pH równym:

- 4,5 [Nasrabadi i in. 2011; Libkind, van Brook 2006];
- 5,5 [Banzatto i in. 2013; Buzzini, Martini 2000; Chanchay i in. 2012];
- 6,0 [Stachowiak, Czarnecki 2007; Bhosale, Gadre 2001a; Bhosale, Gadre 2001b];
- 6,8 [Maldonade i in. 2008];
- 7,1 [Cutzu i in. 2013].

Niektórzy autorzy zaobserwowali większy przyrost biomasy i karotenoidów w hodowlach z regulacją pH podłoża hodowlanego w czasie jej trwania:

- 5,5 [Fregova i in. 2004; Simova i in. 2003];
- 5,8 [Buzzini 2001];
- 6,0 [Saenge i in. 2011].

Prowadzone są także prace badawcze dotyczące wpływu początkowego pH podłoża hodowlanego na stężenie karotenoidów i biomasy. Stwierdzono, że w hodowlach drożdży *R. mucilaginosa* wraz z wzrostem pH podłoża w zakresie od 3,0 do 7,0 wzrasta stężenie biomasy i zawartość karotenoidów, natomiast w podłożu o odczynie zasadowym następuje zahamowanie wzrostu drożdży [Aksu, Eren 2005]. Natomiast w hodowlach drożdży *R. glutinis* optymalne pH podłoża hodowlanego pod względem biosyntezy karotenoidów wynosiło 5,5, przy czym stężenie biomasy wzrastało nawet w podłożach o silnie alkalicznym odczynie [Latha i in. 2005].

4.7. Temperatura hodowli

Zakres temperatur, w którym możliwy jest wzrost drożdży z rodzaju *Rhodotorula*, zawiera się w przedziale 25-35°C [Saenge i in. 2011; Maldonade i in. 2008; Aksu, Eren 2005; Buzzini i in. 2005; Fregova i in. 2004]. Niektórzy badacze prowadzili hodowle drożdży z rodzaju *Rhodotorula* w temperaturze 28°C [Sinisa i in. 2013; Nasrabadi i in. 2011; Bhosale, Gadre 2001a].

4.8. Metoda hodowli

Duży wpływ na szybkość i wydajność biosyntezy β -karotenu ma zastosowana metoda hodowli. Najczęściej wybierana przez badaczy metoda to wgłębna hodowla okresowa prowadzona w kolbach na wstrząsarce, która odznacza się prostotą i niską wydajnością [Cutzu i in. 2013; Chanchay i in. 2012; Hanusova i in. 2008; Maldonade i in. 2008; Libkind, van Brook 2006; Aksu, Eren 2005; Buzzini i in. 2005; Bhosale, Gadre 2001a]. Ta metoda hodowli służy do wstępnej analizy wpływu wybranych czynników na proces karotenogenezy.

Większą produktywność hodowli można uzyskać, stosując wgłębne hodowle okresowe prowadzone w bioreaktorze [Sinisa i in. 2013; Nasrabadi i in. 2011; Fregova i in. 2004; Simova i in. 2003; Bhosale, Gadre 2001b]. Prowadzono również wgłębne zasilane hodowle okresowe, w których otrzymana zawartość β -karotenu znacznie przewyższała wyniki uzyskane w hodowlach okresowych [Bhosale, Garde 2001c; Buzzini 2001; Saenge i in. 2011].

Buzzini badał biosyntezę karotenoidów w zasilanych wgłębnych hodowlach skojarzonych drożdży *R. glutinis* i *Debaryomyces castellii* w podłożach zawierających syrop kukurydziany. Podłoże zasilające było proporcjonalnie dziesięciokrotnie stężone w stosunku do podłoża hodowlanego w bioreaktorze. Zasilanie powtarzano co 72 godziny. Wzrost biomasy obu gatunków drożdży widoczny był przez pierwsze

96-120 godzin, które pozostały w stosunku 1:1 (10^8 komórek cm^{-3}). Największe stężenie karotenoidów ($9,5 \text{ mg dm}^{-3}$) autor uzyskał po 144 godzinie hodowli, w których torularodyna stanowiła 74%, a torulen i β -karoten pozostawały w mniejszości. W zasilanych hodowlach okresowych zawartość karotenoidów była wyższa niż w hodowlach okresowych [Buzzini 2001].

W celu zwiększenia szybkości produkcji karotenoidów w hodowlach drożdży *R. glutinis* zespół Saenge i in. zastosował wgłębną zasilaną hodowlę okresową. Początek zasilania został ustalony na środek eksponencjalnej fazy wzrostu drożdży i zasilanie powtarzano co 12 godzin. Zastosowanie wgłębną hodowlę zasilaną wpłynęło na podwyższenie końcowego stężenia karotenoidów do $180,20 \text{ mg dm}^{-3}$ oraz biomasy do $13,77 \text{ g dm}^{-3}$ w stosunku do wgłębną hodowli okresowych prowadzonych w bioreaktorze, w których stężenie karotenoidów było niższe o prawie 30% ($125,75 \text{ mg dm}^{-3}$), a stężenie biomasy o 40% ($8,17 \text{ g dm}^{-3}$) [Saenge i in. 2011].

Bhosale i Gadre, prowadząc badania wgłębną zasilaną hodowlę okresową drożdży *Rhodotorula glutinis*-32, zastosowali zasilanie oparte na pomiarze tlenu rozpuszczonego. Poziom tlenu rozpuszczonego był utrzymywany między 10 a 40% za pomocą prędkości obrotowej wału mieszadła oraz dawki podłoża zasilającego. Autorzy stosowali dwa rodzaje podłoży zasilających, które zawierały podwójne lub potrójne stężenie melasy w porównaniu z jej stężeniem w podłożu hodowlanym przebywającym w bioreaktorze. Zasilanie rozpoczynano we wczesnej stacjonarnej fazie wzrostu drożdży. W hodowli zasilanej podłożem o dwukrotnie większym stężeniu melasy zawartość β -karotenu wzrastała do końca trwania hodowli, a końcowe jego stężenie wynosiło ok. $35,0 \text{ mg dm}^{-3}$, przy czym stężenie biomasy wynosiło ok. $34,0 \text{ g dm}^{-3}$. Natomiast w hodowli zasilanej podłożem o trzykrotnie wyższym stężeniu melasy największe stężenie β -karotenu badacze uzyskali w 72 godzinie hodowli (100 mg dm^{-3}), a na koniec hodowli wynosiło ono ok. $70,0 \text{ mg dm}^{-3}$. Stężenie biomasy utrzymywało się na stałym poziomie od 72 godziny hodowli i wynosiło ok. $55,0 \text{ g dm}^{-3}$.

5. Wnioski

Biosynteza karotenoidów, w tym i β -karotenu, przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* jest przedmiotem wielu badań naukowych. Wynika to z bioaktywnych właściwości tych związków, co powoduje ich szerokie zastosowanie. Badania zmierzają do określenia optymalnych warunków hodowli drożdży *Rhodotorula spp.* z uwzględnieniem produkcji karotenoidów. Gatunek drożdży *Rhodotorula glutinis* określany jest jako najbardziej produktywny. Zastosowanie drożdży *Rhodotorula spp.* w otrzymywaniu karotenoidów, w tym β -karotenu, może się stać alternatywną metodą w stosunku do aktualnie stosowanych technologii.

Literatura

- Aksu Z., Eren A.T., 2005, *Carotenoids production by the yeast Rhodotorula mucilaginosa: Use of agricultural wastes as a carbon source*, Process Biochemistry, Vol. 9, No. 40, s. 2985-2991.
- Banzatto D., de Freitas L.A., Mutton M.J.R., 2013, *Carotenoid production by Rhodotorula rubra cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup*, Ciência e Tecnologia de Alimentos., Vol. 33, No. 1, s. 14-18.
- Bhosale P., Gadre R.V., 2001a, *Optimization of carotenoid production from hyper-producing Rhodotorula glutinis mutant 32 by a factorial approach*, Letters in Applied Microbiology, Vol. 33, s. 12-16.
- Bhosale P., Gadre R.V., 2001b, *Production of β -carotene by a Rhodotorula glutinis mutant in sea water medium*, Bioresource Technology, Vol. 76, s. 53-55.
- Bhosale P., Gadre R.V., 2002, *Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced β -carotene production by mutant 32 of Rhodotorula glutinis*, Letters in Applied Microbiology, Vol. 34, s. 349-353.
- Braunwald T., Schwemlein L., Graeff-Hönniger S., French W.T., Hernendey R., Holmes W.E., Claupein W.Ö., 2013, *Effect of different C-N ratios on carotenoid and lipid production by Rhodotorula glutinis*, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 97, s. 6581-6588.
- Breierova E., Gregor T., Marova I., Certik M., Kogan G., 2008, *Enhanced antioxidant formula based on a selenium-supplemented carotenoid-producing yeast biomass*, Chemistry and Biodiversity, Vol. 5, No. 3, s. 440-446.
- Breierova E., Marova I., Certik M., 2005, *The role of the carotenoid pigments in yeast cells under stress conditions*, Chemické Listy, Vol. 99, s. 49-52.
- Buzzini P., 2001, *Batch and fed-batch carotenoids production by Rhodotorula glutinis-Debaryomyces castellii co-cultures in corn syrup*, Journal of Applied Microbiology, Vol. 90, s. 843-847.
- Buzzini P., Martini A., 2000, *Production of carotenoids by strains of Rhodotorula glutinis cultured in raw materials of agro-industrial origin*, Bioresource Technology, Vol. 71, s. 41-44.
- Buzzini P., Martini A., Gaetani M., Turchetti B., Pagnoni U.A., Davoli P., 2005, *Optimization of carotenoid production by Rhodotorula graminis DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis*, Enzyme and Microbial Technology, Vol. 36, s. 687-692.
- Chanchay N., Sirisansaneeyakul S., Chaiyasut C., Poosaran N., 2012, *Optimal conditions for carotenoid production and antioxidant characteristics by Rhodotorula rubra*, World Academy of Science, Engineering and Technology, Vol. 6, s. 1645-1649.
- Cutzu R., Coi A., Rosso F., Bardi L., Ciani M., Budroni M., Zara G., Zara S., Mannazzu I., 2013, *From crude glycerol to carotenoids by using a Rhodotorula glutinis mutant*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 29, s. 1009-1017.
- Davoli P., Mierau V., Weber R.W.S., 2004, *Carotenoids and fatty acids in red yeasts Sporobolomyces roseus and Rhodotorula glutinis*, Applied Biochemistry Microbiology, Vol. 40, s. 392-397.
- del Campo J.A., Rodriguez H., Moreno J., Vargas M.A., Rivas J., Guerrero M.G., 2001, *Lutein production by Muriellopsis sp. in an outdoor tubular photobioreactor*, Journal of Biotechnology, Vol. 85, s. 289-295.
- El-Banna A.A., Abd El-Razek A.M., El-Mahdy A.R., 2012, *Some factors affecting the production of parotenoids by Rhodotorula glutinis var. glutinis*, Food and Nutrition Sciences, Vol. 3, s. 64-71.
- Ferrao M., Garg S., 2011, *Studies on effect of media components on growth and β -carotene production by Rhodotorula graminis RC04*, Journal of Cell and Tissue Research, Vol. 11, No. 1, s. 2551-2556.
- Frengova G., Simova E., Beshkova D., 1997, *Caroteno-protein and exopolysaccharide production by cocultures of Rhodotorula glutinis and Lactobacillus helveticus*, Journal of Industrial Microbiology, Vol. 18, s. 272-275.
- Frengova G., Simova E., Beshkova D., 2003, *Carotenoid production by Lactoso-Negative Yeasts Co-Cultivated with lactic Acid Bacteria in Whey Ultrafiltrate*, Zeitschrift für Naturforschung, Vol. 58, No. 7-8, s. 562-7.

- Frengova G., Simova E., Beshkova D., 2004, *Use of whey ultrafiltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast Rhodotorula Rubra*, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 112, No. 3, s. 133-141.
- Garcia-Gonzalez M., Moreno J., Manzano J.C., Florencio F.J., Guerrera M.G., 2005, *Production of Dunaliella salina biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor*, Journal of Biotechnology, Vol. 115, No. 1, s. 81-90.
- Hanusova V., 2011, *Regulácia biosyntézy a nadprodukcie mikrobiálnych pigmentov. Zadanie Dizertacnej Prace*, Rozprawa doktorska, Slovenská technická univerzita v Bratislave.
- Hanusova V., Carnecka M., Halienova A., Certik M., Breierova E., Marova I., 2008, *Physiological regulation of biotechnological production of carotenoids pigments*, Chemicke Listy, Vol. 102, s. 547-548.
- Latha B.V., Jeevaratnam K., Murali H.S., Manja K.S., 2005, *Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of Rhodotorula glutinis DER-PDY from natural source*, Indian Journal of Biotechnology, Vol. 4, s. 353-357.
- Libkind D., Brizzio S., van Broock M., 2004, *Rhodotorula mucilaginosa, a Carotenoid Producing Yeast Strain from a Patagonian High-Altitude Lake*, Folia Microbiologica, Vol. 49, No. 1, s. 19-25.
- Libkind D., van Brook M., 2006, *Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 22, s. 687-692.
- Mahmoud A.G.Y., Abo-Shady M.A., El-Sheekh M.M., Hamza W., 2014, *The role of some stress factors including hydrogen peroxide, methylen blue, sodium chloride and ultraviolet on Rhodotorula glutinis DBVPG # 4400 total carotenoids production*, International Journal of Biosciences, Vol. 4, No. 9, s. 10-19.
- Maldonado I.R., Rodriguez-Amaya D.B., Scamparini A.R.P., 2008, *Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem*, Food Chemistry, Vol. 107, s. 145-150.
- Malisorn C., Suntornsuk W., 2008, *Optimization of β -carotene production by Rhodotorula glutinis DM28 in fermented radish brine*, Bioresource Technology, Vol. 99, No. 7, s. 2281-2287.
- Marova I., Carnecka M., Halienova A., Certik M., Dvorakova T., Haronikova A., 2012, *Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production*, Journal of Environmental Management, Vol. 95, s. 338-342.
- Moline M., Flores M.R., Libkind D., Diequez M. del C., Farias M.E., van Broock M., 2010, *Photoprotection by carotenoids pigments in the yeast Rhodotorula mucilaginosa: the role of torularhodin*, Photochemical and Photobiological Sciences, Vol. 8, s. 1145-1151.
- Nasrabadi M.R.N., Razavi S.H., 2011, *Optimization of β -carotene production by a mutant of the lactose-positive yeast Rhodotorula acheniorum from whey ultrafiltrate*, Food Science and Biotechnology, Vol. 20, No. 2, s. 445-454.
- Patino-Vera M., Jimenez B., Balderas K., Ortiz M., Allende R., Carrillo A., Galindo E., 2005, *Pilot-scale production and liquid formulation of Rhodotorula minuta, a potential biocontrol agent of mango anthracnose*, Journal of Applied Microbiology, Vol. 99, No. 3, s. 540-50.
- Saenge C., Cheirsilp B., Suksaroge T.T., Bourtoom T., 2011, *Potential use of oleaginous red yeast Rhodotorula glutinis for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids*, Process Biochemistry, Vol. 46, s. 210-218.
- Simova E.D., Frengova G.I., Beshkova D.M., 2003, *Effect of aeration on the production of carotenoids pigments by Rhodotorula rubra-Lactobacillus casei Subsp.casei co-cultures in whey ultrafiltrate*, Zeitschrift für Naturforschung, Vol. 58c, s. 225-229.
- Sinisa P., Marova I., Haronikova A., Kostovova I., Breierova E., 2013, *Production of biomass, carotenoids and other metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a comparative screening study*, Annual Microbiology, Vol. 63, s. 1537-1551.
- Somashekar D., Joseph R., 2000, *Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in Rhodotorula gracilis according to the C/N ratio of the growth medium*, World Journal of Microbiology Biotechnology, Vol. 16, s. 491-493.

- Stachowiak B., Czarnecki Z., 2007, *Effect of light on carotenoids yield in fed cultures of Phaffia rhodozyma CBS 5626*, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, Vol. 57, No. 3A, s. 129-131.
- Tada M., Shiroishi M., 1982, *Mechanism of photoregulated carotenogenesis in Rhodotorula minuta. V. Photoinduction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*, Plant & Cell Physiology, Vol. 23, s. 615-621.
- Vijayalakshmi G.V., Vasudevan V., Divakar S., 1999, *Optimisation of growth parameters for the production of carotenoids by Rhodotorula gracilis*, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, Vol. 208, No. 2, s. 121-124.
- Zhang Z., Zhang X., Tan T., 2014, *Lipid and carotenoid production by Rhodotorula glutinis under irradiation/high temperature and dark/low-temperature cultivation*, Bioresource Technology, Vol. 157, s. 149-153.