

CARACTERE FENOTIPICE SI COMPOZIȚIA BIOCHIMICA A TULPINII DE LEVURI PIGMENTATE *RHODOTORULA GRACILIS* CNMN-Y-30

Agafia USATÎI¹, Alina BEȘLIU¹, Elena CHIRIȚA²

¹Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

²Universitatea Tehnică a Moldovei

Rezumat. Sunt descrise caracterele fenotipice și compoziția biochimică a tulpinii de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. Prezența în componența levurii a conținutului sporit de proteine, complexului de pigmenți carotenoidici cu activitate antioxidantă înaltă, lipidelor bogate în acizi grași esențiali, carbohidraților, permite a recomanda tulpina spre utilizare în biotehnologie. Rezultatele sunt importante în descrierea standard a speciilor propuse ca obiect de valoare industrială.

Cuvinte cheie: *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, caractere fenotipice, compoziția biochimică.

Introducere

De obicei, carotenoidele se disting ca precursori al vitaminei A, din acest motiv, ele sunt cunoscute ca substanțe bioactive de mare valoare. Carotenoidele se prezintă ca o structură ciclică a atomilor de carbon care oferă proprietăți antioxidante înalte. În afară de proprietățile antioxidante, carotenoidele posedă și alte efecte printre care putem menționa îmbunătățirea imunității și diminuarea riscului de boli degenerative, cum ar fi cancerul, bolile de inimă, cataracta [6, 11].

Producția industrială a carotenoidelor naturale poate fi realizată pe două căi: pe calea biotehnologică folosind fungi filamentoși, drojdii, bacterii sau microalge și pe calea extracției din plante. Este cunoscut că producția mondială de β -caroten din surse naturale este foarte redusă [13].

Ținând cont de siguranța sănătății publice, interes comercial prezintă carotenoidele levurilor din genul *Rhodotorula*, acceptate spre utilizare pe larg. Analiza domeniilor de utilizare a carotenoidelor de origine microbiană demonstrează importanța studiilor ce pun în evidență proprietățile tehnologice a tulpinilor selectate pentru ulterioara utilizare la producerea industrială. Oportune în acest context apar investigațiile menite să elucideze biologia și compoziția biochimică a levurilor, cunoștințe ce pot promova idei de îmbunătățire a potențialului biosintetic al tulpinilor producătoare de pigmenți carotenoidici.

Scopul studiului dat constă în descrierea caracterelor fenotipice și elucidarea compoziției biochimice a tulpinii de levuri selectată ca activ producător de proteine și carotenoides, rezultate necesare pentru a completa informațiile disponibile în prezent.

1. Materiale și metode

Obiect de cercetare. A servit tulpina de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 selectată ca sursă valoroasă de proteine și carotenoides. Caracterele morfologice, culturale și fiziologice a tulpinii s-au stabilit conform [3, 9].

Medii de cultură. S-a utilizat mediul pentru însămânțare must de bere [2] și mediul de fermentare YPD (yeast-peptone-dextroze), (w/v), (g/L): glucoză – 20, peptonă -20, extract de drojdie – 10 [1].

Condiții de fermentare. Cultivarea tulpinii de levuri s-a realizat în baloane Erlenmayer cu capacitate de 1 L ce conține 0,2 L mediu de cultură, pe agitator rotativ (200 r.p.m.), la temperatura de +22...25 °C, aeraj în limitele 80 mg/L, timp de 120 ore.

Metodele de investigație. Biomasa levuriană s-a determinat gravimetric [7]. Proteina s-a determinat spectrofotometric conform metodei Lowry [10]. Pigmenții carotenoidici au fost extrași din biomasa levuriană și cuantificați spectrofotometric aplicând metoda [5, 6].

Carbohidrații totali în biomasa microbiană s-au determinat la spectrofotometrul T60 VIS Spectrophotometer, la lungimea de undă 620 nm cu utilizarea reactivului antron și D-glucozei în calitate de standard [4]. Determinarea lipidelor în biomasa de drojdii s-a efectuat prin metoda propusă de Bligh, Dyer și preluată de Kates [8], adaptată la obiectul de studiu [12]. Analiza statistică a rezultatelor s-a efectuat computerizat cu calcularea erorilor standard pentru valorile relative și medii, cu ajutorul setului de programe Statistica 7.

2. Rezultate și discuții

Un element important în dirijarea proceselor metabolice este cunoașterea caracterelor morfo-culturale și fiziologo-biochimice ale tulpinii cu statut de producător. Cercetările caracterelor morfologice efectuate asupra tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 au evidențiat că la cultivarea submersă pe mediul YPD, după 120 ore se întâlnesc celule ovale și alungite care înmuguresc, solitare. Dimensiunile celulelor sunt variate și constituie în medie între 8 și 20 μm. Rezultatele acestor cercetări sunt prezentate în figura 1.

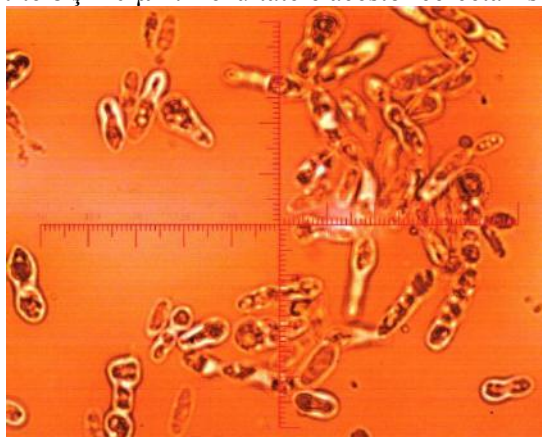


Fig. 1. Aspectul celulelor tulpinii de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 la cultivare pe mediul YPD. (obiectiv 100x/1,25 OIL, 160/0,17)

Analizele testării prin colorarea după Gram relevă că tulpina *Rhodotorula gracilis* II/6 este Gram pozitivă. Aspectul morfologic macroscopic al coloniilor tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 este redat în figura 2. Pe mediul YPD se formează colonii S-formă sau R-formă, cu profil neted sau reticulat, diametrul coloniilor 6 - 9 mm. Pigmentația - oranj sau coral, consistența păstoasă (fig.2)



Colonii S- și R-formă (10 zile)

Colonia gigant (20 zile)

Fig. 2. Aspectul coloniilor *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 pe mediul de cultură YPD

Formarea și aspectul morfologic al coloniilor gigant s-a studiat pe mediul solid YPD la cultivare timp de 20 zile. Aspectul coloniei gigant este prezentată în figura 2. Tulpina formează colonii gigant cu forma alungită, ușor neregulată, marginea puțin festonată, suprafața coloniei pliată, mărimea coloniei 2,5x3,0 cm, culoarea coral, consistența păstoasă.

Din caracterele fiziologice a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 menționăm că tipul respirației este aerob facultativ. La limita de separare dintre suprafața mediului lichid și peretele vasului se formează un inel, pe fundul vasului se formează un depozit de culoare oranj sau coral. Este o cultură mezofilă, regimul termic optim de dezvoltare este cuprins între +25 - 27°C.

Pentru testarea utilizării surselor de carbon, în calitate de mediu de bază pentru cultivarea tulpinii, a servit mediul lichid cu bază de azot YNB $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5 g. (lipsit de orice sursă de carbon). În acest mediu s-a introdus 1% sursa de carbon.

Pentru testarea capacității de utilizare a surselor de azot, în calitate de mediu pentru cultivarea tulpinii, a servit mediul pe bază de carbon (YCB) (10 g D-glucoză). În acest mediu s-au introdus compușii azotați: nitratul de potasiu (KNO_3), nitritul de sodiu (NaNO_2), fosfatul de amoniu, sulfatul de amoniu, în concentrație de 2-5 mM.

Rezultatele testului de asimilare a surselor de carbon sunt reflectate în tabelul 1. Prin analiza testelor la a 14 și 20-a zi de cultivare s-a constatat că tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 este capabilă să

asimileze 7 din 12 surse de carbon cercetate. Mai activ sunt metabolizate glucoza, zaharoza, arabinoza, galactoza, xyloza. Cultura de drojdie nu asimilează inozita, dulcita, maltoza, lactoza, ramnoza. Din gama surselor de azot drojdia asimilează diferite forme de compuși – sulfatul de amoniu, fosfatul de amoniu. Nu asimilează nitrații. Fermentația lipsește.

Tabelul 1. Testul de asimilare a surselor de carbon și azot de tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30

Sursa de carbon	Asimilare	Sursa de azot	Asimilare
D-glucoză	+	Nitratul de potasiu (KNO ₃),	-
Zaharoză	+	Nitritul de sodiu (NaNO ₂)	-
Fructoză	+	Fosfat de amoniu	+
D - lactoză	-	Sulfat de amoniu	+
L-arabinoză	+		
L-ramnoză	-		
D-xiloză	+		
Inozită	-		
D-manită	+		
Dulcită	-		
Galactoză	+		
Maltoza	-		

Legenda: „+” – asimilează; „-” – nu asimilează

Parametrii productivi ai tulpinii la cultivare pe mediul YPD, temperatura de +25⁰ C, durata de cultivare 120 ore, se încadrează în limitele 7,0±0,38 g L⁻¹ biomasă uscată ce conține pigmenți carotenoidici în medie 307,3±64,2 mkg/g b.u. Cercetările asupra compoziției chimice a tulpinii de levuri au evidențiat un conținut înalt de proteină 48,3±9,5 % din biomasă uscată. Verificarea conținutului de lipide a arătat că în biomasă tulpini se conțin în medie 13,4±0,9 %, iar carbohidrații totali determinați variază în limitele a 24,1±1,7 % (tab. 2).

Tabelul 2. Productivitatea și compoziția chimică a biomasei la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30

Nr/o	Indicii	Conținutul cantitativ
1	Productivitatea, g/L B.A.U.	7,0±0,38
2.	Pigmenți carotenoidici, mkg/g B.A.U.	307,3±64,2
3.	Proteine, % S.A.U.	48,3±9,5
4.	Lipide, % din S.A.U.	13,4±0,9
5.	Carbohidrați totali, % din S.A.U.	24,1±1,7

Proprietățile biotehnologice ale tulpinii de levuri au fost studiate și din punct de vedere al componenței pigmenților carotenoidici. Cele mai mari valori cantitative s-au remarcat pentru β-caroten care constituie 51,5% din suma carotenoidelor. Torulina se situează pe următoarea treaptă cu media de 34,0%, iar torularhodina cu 14,5% (figura 3). Conținutul altor pigmenți este neglijabil.

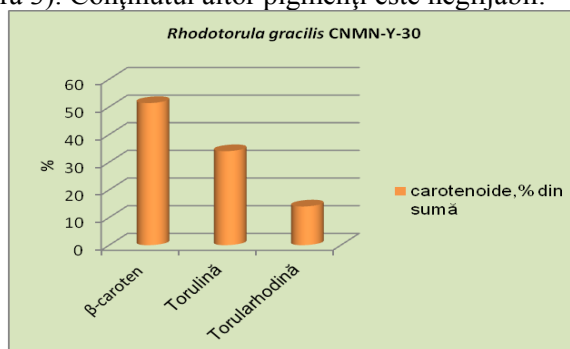


Fig. 3. Compoziția carotenoidelor la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30

În vederea caracterizării calității proteinelor levurii a fost analizată componența acizilor aminici. În rezultatul cercetărilor s-a constatat că o parte semnificativă a proteinelor o constituie aminoacizii esențiali. Menționăm conținutul înalt de valină, leucină, lizină, care constituie respectiv 10,49%, 7,07% și 6,66 % din suma aminoacizilor totali (tabelul 3).

Tabelul 3. Conținutul de aminoacizi esențiali al proteinei din *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30

Nr/o	Aminoacizi esențiali	% din suma aminoacizilor totali
1	Fenilalanină	3,71
2	Izoleucină	2,0
3	Leucină	7,07
4	Lizină	6,66
5	Metionină	0,16
6	Treonină	5,1
7	Triptofan	0,0
8	Valină	10,49
9	Arginină	4,68
10	Histidină	1,72

O altă componentă majoră a compoziției chimice a biomasei de levuri o constituie lipidele în componența cărora predomină acizii grași nesaturați oleic C_{18:1} cu o pondere de 47 % și linoleic C_{18:2} cu un conținut de 37 % din suma acizilor grași identificați. Este importantă prezența în lipidele levurii a 49,8% de acizi grași esențiali (linolic C_{18:2}, neidentificat C_{20:x}, neidentificat C_{22:x}), ceea ce permite valorificarea lipidelor în diferite domenii – alimentație, cosmetologie, farmaceutică, etc. (tab. 4).

Tabelul 4. Componența acizilor grași identificați în lipidele tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30

Nr/o	Acizi grași	% din sumă
1	Palmitinic C _{16:0}	0,5
2	Stearinic C _{18:0}	3,3
3	Oleic C _{18:1}	47,0
4	Linoleic C _{18:2}	37,0
5	Neidentificat C _{20:x}	0,3
6	Neidentificat C _{20:x}	11,0
7	Neidentificat C _{20:x}	1,2
8	Neidentificat C _{22:x}	0,3
	Suma acizilor esențiali	49,8

Prin urmare, investigațiile efectuate asupra caracterelor fenotipice a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 precizează trăsăturile fiziologice și oferă date semnificative taxonomice. Acumularea datelor privind biologia tulpinii de drojdie permite asigurarea proceselor fermentative, astfel îmbunătățind eficiența tehnologiilor de producere a compușilor bioactivi, cum ar fi în cazul nostru, producția de proteine și carotenoide.

Realizarea studiilor comparative ale compoziției biochimice a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 confirmă rezultatele trecute în revistă de alți autori. Prezența la tulpina în studiu a cantităților importante de proteine, carotenoide atestă perspectiva utilizării acesteia în calitate de obiect biotehnologic. Datele prezintă valoare teoretică și practică pentru dirijarea activității biosintetice a tulpinii și ne conduc spre concluzia necesității continuării cercetărilor privind elucidarea căilor de stimulare a biosintezei proteinelor și carotenoidelor.

Concluzii

1. Caracterelor fenotipice specifice tulpinii de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 sunt importante în descrierea standard a speciei propuse ca obiect biotehnologic de valoare industrială.
2. Compoziția biochimică a *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 variază în limite largi și se evidențiază printr-un conținut echilibrat de proteine bogate în aminoacizi esențiali, de carotenoide, carbohidrați, lipide bogate în acizi grași esențiali.
3. Cultura *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 se propune a fi inclusă în lista microorganismelor cu potențial biotehnologic pentru producerea proteinelor și complexului de pigmenți carotenoidici β-caroten, torulină, torularhodină cu activitate antioxidantă înaltă.

Bibliografia

1. Aguilar-Uscanga B., Francois J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth cond. and mode of cultiv. // În: Lett. in Appl. Microbiol. 2003, vol. 37, p. 268-274.
2. Anghel I., Vamanu A., Mitrache L. et. al. Biologia și tehnologia drojdiilor. București: Editura Tehnică. 1993, vol. 3, 308 p.
3. Barnett J. A., Payne R. W., Varrow D. Yeasts: Characteristics and Identification. 3-rd edition, Cambridge Univ. Press, 2000. 1150 p.
4. Dey P. M. & Harborne J. B. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 2. *Carbohydrates*, Academic Press, 1993, 529 p.
5. El-Banna Amr A., Amal M. A. El-Razek, Ahmed R. El-Mahdy. Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. //Food and Nutrition Sciences, 2012, 3, 64-71.
6. Frengova G., Simova E., Grigorova D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultra filtrate. //Biotechnology and Bioeng., 1994, 44, 8, 288-294
7. Hong-Zhi Liu, Qiang Wang, Xiao-Yong Liu, Sze-Sze Tan. Effects of spaceflight on polysaccharides of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall.// În: Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008, 81, 543-550.
8. Kates M. Separation of lipid mixtures. *Techniques of Lipidology*. Elsevier, 1988. p. 186-278.
9. Kreger-Van Rij N.J.W. General classification of the yeasts. *The yeast: A taxonomic study*, 3rd ed. Ed. N.J.W. Kreger-Van Rij-Amsterdam Elsevier Biomed. Preis, 1984. 1082 p.
10. Lowry O., Rosebough N., Farr A. et. al. Protein measurement with the folin phenol reagent.// În: J. Biol. Chem. 1951, vol. 193, 265-275.
11. Luis Carlos Mata-Gómez¹, Julio César Montañez^{2*}, Alejandro Méndez-Zavala² and Cristóbal Noé Aguilar³ Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories* 2014, **13**:12 doi:10.1186/1475-2859-13-12
12. Usafii A., Calcatiniuc A., Grosu L., Șirșov T. Procedeu de extragere a lipidelor din drojdii.// Brevet de invenție MD 1930 G2, C 11 B 1/10, C 12 N 1/16. BOPI nr. 5/2002, 26-27.
13. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH: *Amer J Clin Nut* 2006, **83**:1265-127.