

SINTEZA β -CAROTENULUI LA DROJDIA *RHODOTORULA GRACILIS* CNMN-Y-02 PE DIFERITE MEDII DE CULTIVARE ȘI SUB ACȚIUNEA IRADIERII CU RAZE γ

Oleg CHISELIȚA

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

The results of the various nutritive sources and γ irradiations on action on the biosynthesis of the β -carotene by the yields *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-02 are presented in the article. New strains of the yields with improved capacity of biosynthesis of β -carotene were selected after irradiation.

The cultivating medium which improves the quantity of the carotenoids and β -carotene was selected.

Introducere

Obținerea compușilor biologic activi, sintetizați de microorganisme, rămâne o problemă actuală a biotehnologiei moderne. Aceasta se datorează posibilității obținerii diverselor produse bogate în vitamine, lipide, proteine și pigmenți pe calea sintezei microbiene [1].

Din produsele de sinteză microbială un interes deosebit prezintă carotenoizii, unul dintre cel mai numeros și răspândit grup de pigmenți naturali [2]. Ei se utilizează în calitate de antioxidanți și coloranți în industria alimentară, farmaceutică și ca adaos în hrana peștilor [3,4]. Datorită activității antiradicalice, antimicrobiene și antitumorale, se utilizează în medicină [5]. Necesitățile crescânde în carotenoizi impun căutarea de noi surse pentru obținerea lor. Actualmente, carotenoizii pot fi sintetizați pe cale chimică, microbiologică sau sunt extrași din materie primă vegetală [6]. Din microorganisme cel mai mult cercetate surse sunt drojdiile, care posedă o capacitate înaltă de sinteză a pigmenților carotenoizi. Din rândul tulpinilor hemotrofe, ca producători de carotenoizi sunt menționate drojdiile genurilor *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Rhodosporidium*, *Phaffia*, *Sporobolomyces* [7].

Tulpina *Rhodotorula gracilis*, care sintetizează până la 725 mkg/g B.A.U. pigmenți carotenoizi, a căror componentă calitativă este alcătuită din β -caroten (43%), torulină (35%) și torularodină (22%), este propusă în calitate de adaos proteico-vitaminic în zootehnie [8]. De asemenea, prezintă interes datele despre sinteza carotenoizilor de tulpina de drojdie *Sporobolomyces pararoseus*, care pe medii de cultură cu diferite surse de carbon sintetizează până la 413,8-588,2 mkg/g B.A.U. de carotenoizi [9].

Datorită faptului că drojdiile au capacitatea de a sintetiza un spectru larg de carotenoizi și în timpul fermentației acumulează o cantitate substanțială de biomasă chiar și pe medii relativ ieftine, acest grup de microorganisme eucariote ocupă poziții stabile în biotehnologia modernă, mai ales în aria sintezei microbiologice a carotenoizilor [10].

Dezvoltarea biotehnologiilor moderne pentru obținerea preparatelor carotenoidice noi de calitate înaltă și întrebuințarea lor în calitate de substanțe fiziologic active impune cercetări de testare a producătorilor și a mediilor de cultivare, studiul activității enzimatică și a posibilității obținerii mutațiilor utile în industria biotehnologică.

Scopul cercetărilor a fost studierea sintezei β -carotenuului la drojdia *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-02 pe diferite medii de cultivare și sub acțiunea iradierii cu raze γ .

Material și metode

Ca obiect de studiu a servit tulpina de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-02 păstrată în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene, cultivată la agitator (180-200 rot/min), la temperatura +25-27°C, pH mediului 5,6-6,0 și iluminare 12-13 mii erg/cm².

Extragerea pigmenților din biomasă a fost efectuată conform metodei modificate Peterson cu utilizarea solvenților organici [11,12].

Separarea și identificarea pigmenților a fost efectuată prin metoda cromatografierii după Tereșina [13].

Determinarea lor cantitativă s-a efectuat spectrofotometric după Vecer, Kulikova [14,15].

Pentru iradiere au fost folosite razele γ . Iradierea a fost efectuată la Institutul de Genetică al AȘM, în colaborare cu col. șt. superior I.Romanova. S-au utilizat tehnici de lucru în conformitate cu publicațiile de specialitate [16]. Dozele iradierii γ au constituit 200, 300, 400 Gy.

Rezultate și discuții

Studiul literaturii de specialitate a permis stabilirea necesității drojdiilor în diferite surse de carbon pentru creștere și biosinteza componentelor biochimice. De aceea, a fost inițiată o serie de experimente în scopul stabilirii influenței melasei, glicerinei, extractului de porumb, acetatului de sodiu asupra biosintezei carotenoizilor și a β -carotenului la drojdia *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-02.

Pentru cultivarea drojdiei au fost cercetate variantele de medii nutritive:

a) Lundin (mediu chimic definit) care conține, în g/l: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; FeCl_3 – 0,003; NaCl – 0,5; zaharoză – 50,0; apă de robinet 1 l; pH = 5,5 (folosit ca martor) [17].

b) MZ-30 – săruri minerale + 20 g/l melasă + 60 g/l glicerină + 10 g/l extract de porumb;

c) MZ-30A – săruri minerale + 20 g/l melasă + 10 g/l extract de porumb;

d) MGA – săruri minerale + 30 g/l melasă + 20 g/l glicerină + 10 g/l extract de porumb + 5 g/l acetat de sodiu.

Mediile MZ-30, MZ-30A și MGA au fost stabilite și optimizate în Laboratorul Oleobiotehnologie pentru culturile *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 și *Sporobolomyces pararoseus*.

Complexul sărurilor minerale utilizate pentru mediul MZ-30 și MZ-30A include, în g/l: KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; NaCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,003; CaCl_2 – 1,0.

Complexul sărurilor minerale utilizate pentru mediul MGA include, în g/l: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5.

Rezultatele cercetărilor dedicate posibilității utilizării de către drojdie a surselor nutritive din melasă și extract de porumb în combinație cu alte bioelemente majore pentru creștere și carotenogeneză au demonstrat (Fig.1) că la cultivarea *Rh. gracilis* pe mediul MGA conținutul de carotenoizi este de 235 mkg/g B.A.U. De asemenea, pe acest mediu mai activ se sintetizează β -carotenul, conținutul maxim determinat pe mediul nutritiv MGA constituie 184,5 mkg/g B.A.U. Pe mediul MZ-30 conținutul de carotenoizi este de 177,5 mkg/g B.A.U., iar de β -caroten – de 133,2 mkg/g B.A.U.

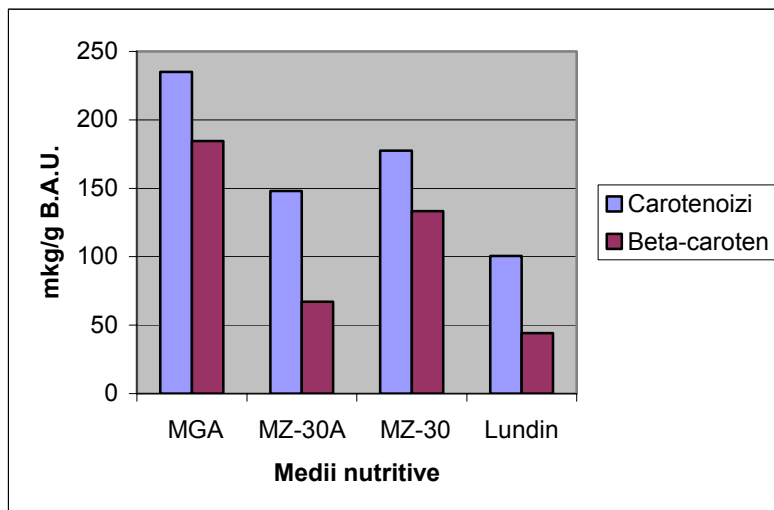


Fig.1. Conținutul de carotenoizi și β -caroten la drojdia *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-02 cultivată pe diferite medii nutritive.

Efectul stimulator al mediilor MZ-30 și MGA poate avea mai multe explicații. Una din ele ar fi că la utilizarea mai multor surse de carbon în procesul de carotenogeneză se implică întregul complex enzimatic al microorganismului. Cel mai eficient este mediul cu adaos de acetat de sodiu care se implică activ în procesul de biosinteză a carotenoizilor la prima etapă de cultivare – formarea predecesorului C_5 , care are ca punct inițial de pornire acetatul. Deci, este evident efectul stimulator al surselor nutritive (melasa, glicerina, extractul de porumb) în asociere cu acetatul de sodiu asupra biosintezei carotenoizilor și β -carotenului.

Unul dintre procedeele cele mai răspândite și efective de obținere a tulpinilor de microorganisme înalt productive cu calități utile pentru ramurile industriale este screeningul formelor mutante, apărute în rezultatul utilizării diferiților factori mutageni [18,19]. În legătură cu aceasta, a fost studiată influența radiației γ asupra

culturii de drojdie în vederea obținerii unor variante cu productivitate carotenogenă sporită. În rezultatul iradierii tulpinii de drojdie *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-02 cu raze γ au fost selectate 9 variante de drojdii, care se deosebesc de cultura parentală prin proprietăți morfoculturale și prin activitatea de biosinteză a carotenoizilor.

Pentru a determina impactul iradierii asupra sistemului enzimatic, variantele de tulpini obținute au fost testate pe mediul MZ-30A, mediu lipsit de acetat de sodiu, dar care conține nitrat. Pentru a testa stabilitatea schimbărilor biosintetice survenite în rezultatul iradierii, experiențele de sinteză a carotenoizilor au fost repetate peste 3 și, respectiv, 12 luni de păstrare (Fig.2).

Investigațiile efectuate au demonstrat că după trei luni de la iradiere toate variantele cercetate, cultivate pe mediul MZ-30A, posedă activitate carotenogenă sporită și depășește cantitativ cultura parentală de 1,5-3 ori (Fig.2). Cea mai mare cantitate de pigmenți este sintetizată de variantele III/5 și III/20 cultivate pe mediul MZ-30A după 3 luni de păstrare și constituie 304 și 334% față de martor. Mai puțin active sunt variantele I/3 și I/4. Rezultatele studiului activității biosintetice după 12 luni de la momentul iradierii indică faptul păstrării capacității sporite de sinteză a carotenoizilor la variantele III/5 și III/20, însă conținutul lor a diminuat până la 161 și 227%, respectiv, față de martor (Fig.2).

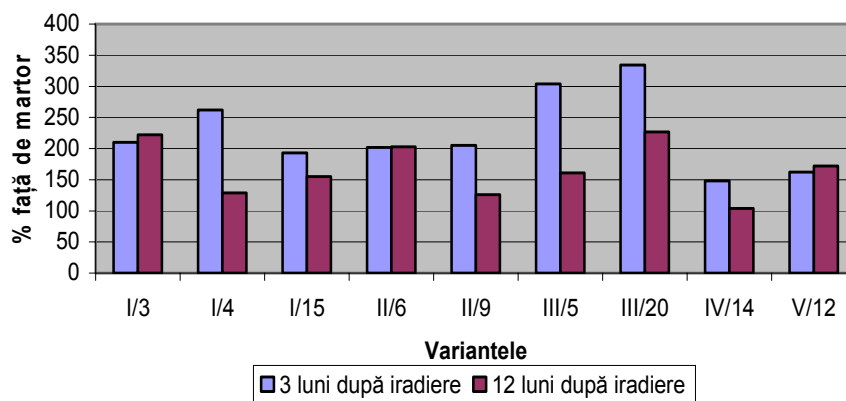


Fig.2. Rezultatele comparative ale biosintezei carotenoizilor la variantele *Rh. gracilis* CNMN-Y-02 apărute după iradierea cu raze γ , cultivate pe mediul MZ-30A.

Un interes deosebit prezintă influența razelor γ asupra biosintezei β -carotenului. După 3 luni de la iradiere, practic toate variantele cercetate cultivate pe mediul nutritiv MZ-30A sintetizează de 2-3 ori mai mult β -caroten (Fig.3). Cea mai activă s-a dovedit a fi varianta III/20 cu un conținut de β -caroten cu până la 301% față de martor. Însă, după 12 luni de la iradiere, pe parcursul cărora au fost efectuate mai mult de 6 pasaje, cantitatea β -carotenului în varianta dată s-a micșorat și a constituit 164% în comparație cu martorul (Fig.3). Variantele II/6 și V/12 sunt mai puțin active în comparație cu varianta III/20, însă cantitatea β -carotenului sintetizat diferă puțin în perioadele după 3 și 12 luni de păstrare, ceea ce denotă o stabilitate a efectului stimulator obținut în urma γ iradierii.

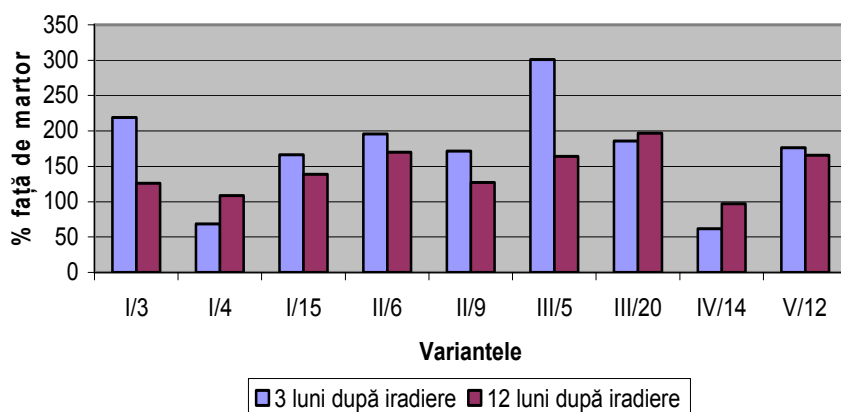


Fig.3. Rezultatele comparative ale biosintezei β -carotenului, la variantele *Rh. gracilis* CNMN-Y-02 apărute după iradierea cu raze γ , cultivate pe mediul MZ-30A.

Cultivate pe mediul MZ-30, variantele menționate au demonstrat o sporire a capacității de sinteză a β -carotenului și după 12 luni de la iradiere, dar rezultatele sunt inferioare celor obținute la cultivarea variantelor drojdiei *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-02 pe mediul MZ-30A.

Deci, din punctul de vedere al sintezei β -carotenului, varianta III/20 este cea mai activă. Iar mediul testat MZ-30A a demonstrat activarea structurilor enzimatică în rezultatul iradierii cu raze γ a drojdiei.

Concluzii

Utilizarea diferitelor medii de cultură cu diferite surse nutritive ne permite dirijarea procesului de carotenoeneză în direcția solicitată și sporirea cantității de carotenoizi sintetizați până la 235 mkg/g B.A.U.

Iradierea cu raze γ a culturii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-02 a făcut posibilă obținerea noilor variante ale acestei culturi, care se deosebesc printr-o capacitate sporită de carotenoeneză de până la 301 și 334% în comparație cu cultura maternă.

Referințe:

1. Лещенская И.Б. Микробная биотехнология. - Казань: УНИПРЕСС: ДАС, 2000, с.268.
2. Young Andrew J., Lowe Gordon M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids // Arch. Biochem. and Biophys. - 2001. - No1. - P.20-27.
3. Buzzini P., Martini A. Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 cultured in raw materials of agroindustrial origin. Bioresource Tehnology. - 1999. - No71. - P.41-44.
4. Dufosse L., Gaulaup P., Yaron A., Arad S.M., Blanc P., Murthy K.N.C., et. al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific addity or an industrial reality // Trends in Food Science & Technology. - 2005. - No16. - P.389-406.
5. Black H. Radical interception by carotenoids and effects on UV cancerogenesis // Nutr. Cancer. - 1998. - Vol.31. - P.212-217.
6. Rudic V., Bulimaga V., Chiriac T., Ghelbet V. Productivitatea și activitatea biosintetică a tulpinii cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-YS-03 la cultivare în prezența unor compuși coordinați noi ai Fe (II) // Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova. Seria „Științe chimico-biologice”. - 2003. - P.183-186.
7. Fang T.J., Chiou T.-Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yields *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS 501 // J. Ind. Microbiol. - 1996. - 16. - No3. - P.175-181.
8. Атаманюк Д.И. Динамика образования отдельных каротиноидных пигментов в зависимости от действия биологически активных веществ // Известия АН МССР. - 1971. - No1. - С.25-27.
9. Usafii A. Biotechnological potential of *Sporobolomyces parvoseus* CNMN-YS-01 // Roumanian biotechnological letters. - 1999. - Vol.4. - No1. - P.83-87.
10. Sandman G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application // Arch. Biochem. and Biophys. - 2001. - Vol.385. - No1. - P.4-12.
11. Peterson W.I., Evans W.R., Lecce E., et. al. Quantitative determination of the carotenoids in yeast of the genus *Rhodotorula* // J. Bacteriol. - 1958. - 75. - No5. - P.586-591.
12. Квасников Е.И., Васкивнюк В.Т., Суденко В.И., Гринберг Т.А. Каротинсинтезирующие дрожжи. - Киев: Наукова думка, 1980. - 171 с.
13. Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. Экспресс-метод определения содержания β -каротина и ликопина // Микробиология. - 1994. - Т.63. - Вып.6. - С.1111-1116.
14. Вечер А, Куликова А.Н. Спектрофотометрическое определение содержания каротиноидов в биомассе микроорганизма // Физиолого-биохимические исследования растений. - Минск, 1967, с.46-54.
15. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. - Москва, 1986.
16. Oncescu M., Panaitescu I. Dozimetria și ecranarea radiațiilor roentgen și gamma. - București: Editura Academiei, 1993.
17. Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. - Киев: Наукова думка, 1991. - 332 с.
18. Заринь Ф.П., Краузе И. Влияние комбинированного воздействия физических и химических мутантов на биологические свойства штамма *Rh. gracilis*-320. - Ленинград: ЛГУ, 1985, с.125-127.
19. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Биотехнология. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. - Москва: Высшая школа, 1988. - 208 с.

Prezentat la 14.02.2008