

INFLUENȚA FACTORILOR DE CULTIVARE ASUPRA CREȘTERII ȘI MULTIPLICĂRII TULPINII DE LEVURI *RHODOTORULA GRACILIS* CNMN-Y-30

Alina BEȘLIU

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Abstract: Sunt descrise influența factorilor fizici (temperatura, aerația și pH-ul mediului de cultivare) asupra multiplicării populației și stabilirea condițiilor optime de cultivare a levurii pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. Condițiile optime de cultivare a drojdiei *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 sunt importante pentru obținerea unei productivități înalte care oferă posibilitatea de-a valorifica tulpina ca obiect biotehologic cu valoare industrială. Rezultatele sunt importante pentru perfectarea pașaportului tulpinii ca obiect de studiu pentru investigațiile ulterioare.

Cuvinte cheie: *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, factorii fizici, creștere și multiplicare.

Introducere

Factori importanți de cultivare, care influențează creșterea și metabolismul microorganismelor, sunt temperatura, pH-ul mediului de fermentație, volumul de inoculum și aerația. Acești factori pot influența solubilitatea sărurilor, compoziția ionică a substraturilor, morfologia și structura celulelor, ceea ce determină activitatea fiziologică a culturilor și acționează asupra permeabilității pereților celulari, transportului de substanțe nutritive, proceselor și reacțiilor chimice din membrane, vitezei de creștere și multiplicare, structurii populației și capacitatea de a asimila substanțele nutritive [4, 8, 12].

În condiții favorabile, reacțiile metabolice implicate în procesele de creștere și multiplicare se desfășoară normal, în timp ce în cazul depășirii anumitor limite de toleranță apar disfuncții de diferit grad pornind de la stoparea multiplicării pînă la trecerea în stare de viață latentă sau la modificări profunde ale echilibrului protoplasmatic prin denaturări incompatibile cu viața. Activitatea biologică normală atinge un nivel maxim de dezvoltare atunci cînd condițiile de cultivare sînt optime în raport cu dezvoltarea speciei [9].

Reieșind din aceste considerente, scopul cercetărilor a constat în estimarea influenței factorilor fizici (temperatura, aerația și pH-ul mediului de cultivare) asupra multiplicării populației și stabilirea condițiilor optime de cultivare a levurii pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

1. Materiale și metode

Ca obiect de cercetare a servit tulpina de *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, depozitată în Colecția Națională de Micoorganisme Neapatogene ca sursă de proteine și pigmenți carotenoidici.

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 cultivare. 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.), durata de cultivare 120 ore.

Influența temperaturii asupra multiplicării și creșterii populațiilor s-a efectuat prin utilizarea valorilor de 15, 20, 25, 30, 35°C. Influența pH-ului asupra multiplicării populațiilor s-a efectuat la valorile pH-ului initial de 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5. Monitorizarea modificărilor pH-ului s-a efectuat după 6, 24, 48, 72 ore, cu utilizarea pH-metrului portabil R1 02895. Influența gradului de aerare a fost cercetată aplicînd condiții de hipoxie și aerare moderată. Conținutul de oxigen s-a măsurat cu oximetrul Oxi 315i/SET. Determinarea numărului de celule și multiplicarea populației a fost efectuată fotocolorimetric după 6, 24, 48 ore, la lungimea de undă $\lambda=670$ nm [11].

Analiza statistică a rezultatelor s-a efectuat compiuterizat cu calcularea erorilor standard pentru valorile relative și medii, cu ajutorul setului de programe Statistica 7.

2. Rezultate și discuții

Creșterea și multiplicarea microorganismelor este rezultatul unei serii de reacții metabolice coordonate a căror desfășurare normală este asigurată de o temperatură adecvată. Numeroase date experimentale demonstrează rolul fundamental al temperaturii în producerea de biomasă sau evoluția proceselor

metabolice. Efectul temperaturii asupra creșterii microorganismelor poate fi explicată prin acțiunea asupra reacțiilor enzimatică care au loc în celulă, ca urmare, viteza celor două procese crește progresiv pe măsură ce temperatura se ridică pînă atinge nivelul optim [11].

Din datele obținute pe parcursul experiențelor se remarcă că temperatura are un rol hotărîtor asupra dezvoltării celulelor levuriene, optimul de dezvoltare a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN –Y-30 este de +25°C. La această temperatură se observă o accelerare a procesului de creștere și multiplicare a celulelor, care ulterior încetinește odată cu majorarea temperaturii de cultivare (figura 1).

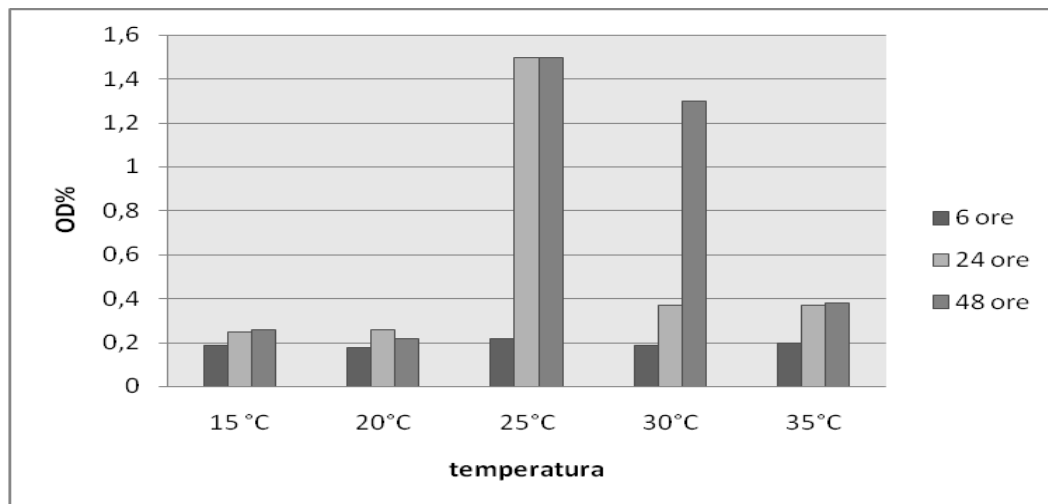


Fig. 1. Influența temperaturii de cultivare asupra procesului de multiplicare a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN- Y-30.

Conform datelor din literatura de specialitate majoritatea drojdiilor cresc și se dezvoltă la valorile pH-ului cuprinse între 3,0-8,5 aici pot fi atribuite și drojdiile genului *Rhodotorula*. Studiul privind efectul pH-ului inițial asupra dezvoltării levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN- Y-30 a demonstrat că tulpina dispune de un mecanism de autoreglare a metabolismului prin modificarea pH-ului mediului. Pe durata cultivării pH-ul optim pentru dezvoltarea și multiplicarea tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN -Y-30 este cuprins între valorile 5,5-8,5 înregistrînd numărul maxim de celule la o unitate de volum (figura 2). În mediul de cultură cu pH-ul acid, cuprins între valorile 2,5 - 4,5, procesul de creștere și multiplicare a celulelor încetinește, de aici concluzionăm că aceste valori nu sunt favorabile pentru dezvoltarea tulpinii de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN -Y-30.

Studiind gradul de pigmentație a celulelor în mediul de cultură YPD după 48 și 120 ore de cultivare în profunzime a tulpinii de levuri am constatat că la valori acide a pH-ului inițial, practic nu se observă prezența pigmentilor carotenoidici. Un grad mai înalt de pigmentație s-a stabilit la celulele din variantele experimentale cu diapazonul pH de 6,5-8,5 (figura 3). Efectul influenței pH-ului asupra celulei de levuri se explică prin posibila modificare a permeabilității peretelui celular, acțiunea pH-ului asupra componentelor mediului, stării de oxido-reducere a mediului, constantei echilibrului chimic în celulă [6].

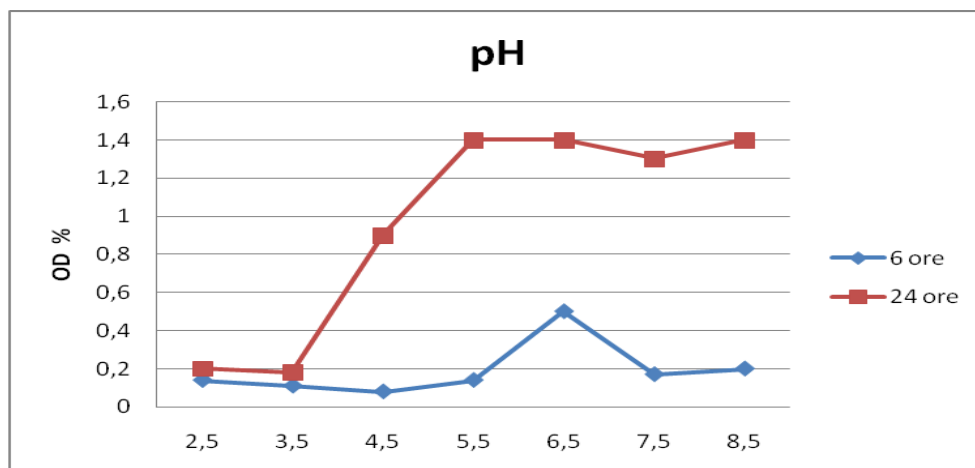
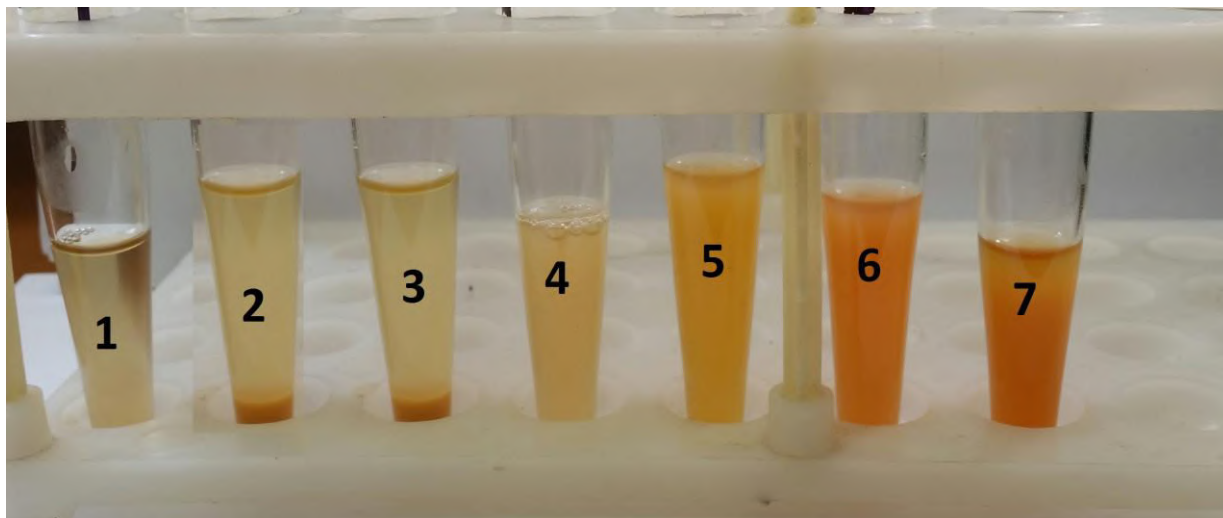


Fig. 2. Influența pH-ului inițial al mediului asupra procesului de multiplicare a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN- Y-30.



Legenda: 1) pH-2,5; 2) pH-3,5; 3) pH-4,5; 4) pH-5,5; 5) pH-6,5; 6) pH-7,5; 7) pH-8,5.

Fig. 3. Influența pH-ului inițial asupra pigmentației celulelor tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 după 48ore.

Conform numeroaselor studii, s-a demonstrat, că oxigenul este constituenul universal al celei vii. El este furnizat microorganismelor, în primul rind de diferiți nutrienți și de apa din constituția mediilor de cultură [5,7, 10]. Levurile necesită oxigen pentru sinteza compușilor organici și pentru desfășurarea proceselor de oxido-reducere biologice. Oxigenul stimulează înmulțirea, iar în cazul dezvoltării aerobe, respectiv al respirației, are rol hotărâtor asupra randamentului obținut de drojdie din aceeași cantitate de materie primă (mediu nutritiv) [3]. În culturile aerate, prin simpla rotație a flacoanelor, crește nivelul de aerare a mediului.

Deoarece celulele de drojzii sunt facultativ aerobe iar respirația aerobă intensă este o condiție indispensabilă pentru generarea de masă celulară și respectiv de sinteză a principiilor bioactive, cercetările noastre s-au axat pe evidențierea particularităților de multiplicare a levurii în condiții diferite de oxigenare a mediului de cultură.

Gradul de aerare în condiții de hipoxie și aerare moderată este exprimat în figura 4, din care sesizăm că diferența între conținutul de oxigen solvit în variantele experimentale staționare și cele cu aerare pe agitator este substanțială (figura 4).

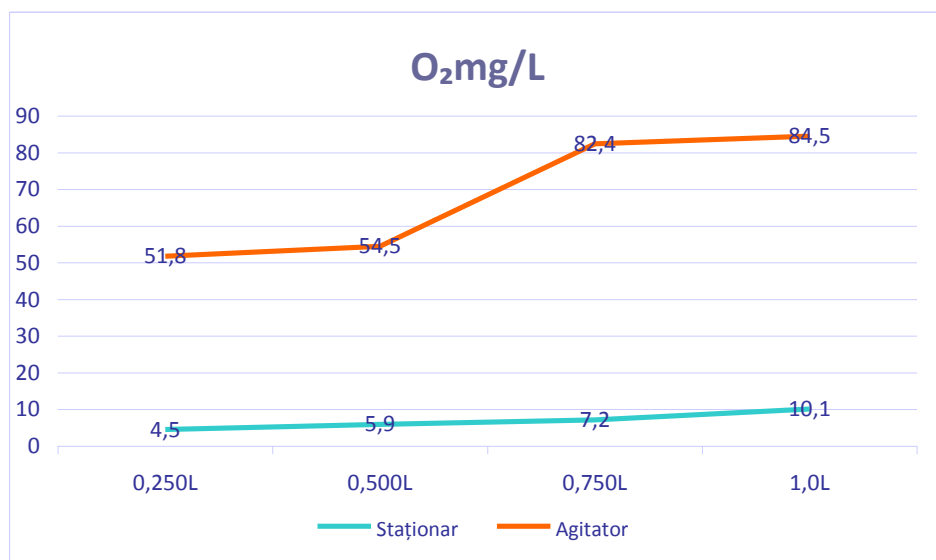


Fig. 4. Gradului de aerare în condiții de hipoxie și aerare moderată la cultivarea tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN- Y-30.

Nivelul optim de multiplicare a celulelor la tulpina de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN- Y-30, conform datelor prezentate în figura 5, poate fi obținut prin cultivarea în baloane Erlenmayer cu capacitate de 1 L ce conține, 0,2 L mediu de cultură, în condiții de aerare intensivă (concentrația de oxigen de 84,5 mg/L).

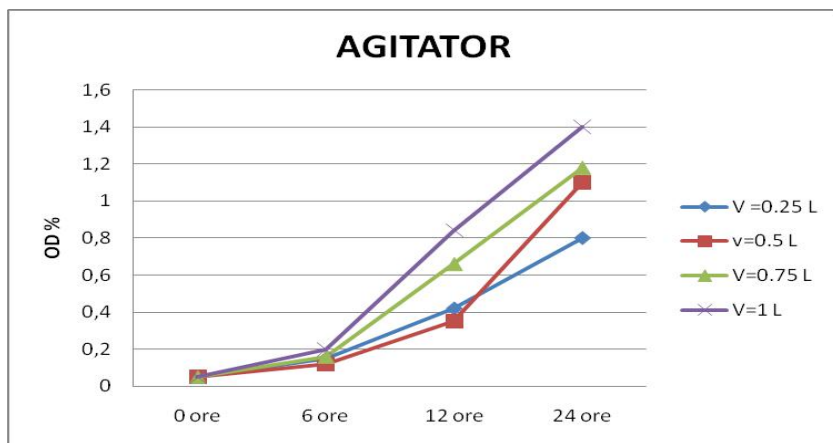


Fig. 5. Gradul de multiplicare a celulelor tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN- Y-30 la aerare pe agitator.

Evaluarea gradului de multiplicare a celulelor tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN- Y-30, demonstrează că în lipsa oxigenului are loc încetinirea procesului de creștere și multiplicare a celulelor de levuri (figura 6).

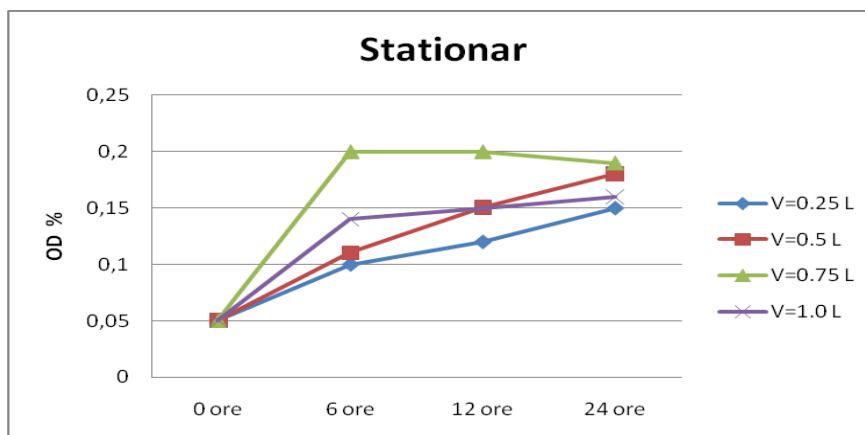


Fig. 6. Gradul de multiplicare a celulelor tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN- Y-30 în condiții staționare.

În așa mod, analizând informația expusă, putem menționa dependența incontestabilă a multiplicării levurii de condițiile de cultivare. Rezultatele prezintă interes pentru perfectarea pașaportului tulpinii ca obiect de studiu pentru investigațiile ulterioare.

Concluzii

1. Factorii de mediu (temperatura, pH-ul, gradul de aerare) exercită efect de reglare asupra proceselor de creștere și multiplicare a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN- Y-30.
2. Nivelul maxim de celule s-a obținut după 48 ore de cultivare în profunzime, la un regim termic de +25°C, pH 5,5-8,5, în condițiile debitului de oxigen de 80,0- 84,5 mg/L.

3. Condițiile optime de cultivare a drojdiei *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 sunt importante pentru obținerea unei productivități înalte care oferă posibilitatea de valorificare a tulpinii ca obiect biotehnic cu valoare industrială.

Bibliografie

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, p 308.
3. Anghel I., Vassu T., Segal B., Berzescu P., Herlea V., Dan V., Cancea I., Kathrein Vamanu. Biologia și tehnologia drojdiilor. București: Editura Tehnică. 1991, vol. 2, p 315.
4. Beuse M., Kopmann A., Diekmann H., Thoma M. O₂, pH value, and carbon source induced changes of the mode of oscillation in synchronous continuous cult. Of cult. Of S.Cer. In: Biotechnol. Bioeng. 1999, vol. 20, 63(4), p.410-417.
5. Bui K., Garly P., Spencer M. Yeast technology.// Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1990, p 277-265.
6. Jones R., Gadd G. Ionic nutrition of yeast-physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. //Enzyme Microb. Tehnol., 1990, vol 12 (6), p.402-418.
7. Kennedy A., Taidi B., Dolan J., Hodgson J. Optimisation of a fully defined medium for yeast fermentation studies.// Food Technol. Biotechnol., 1997, vol. 35, p. 261-265.
8. Tang Y, J., Zhong J, J. Role of O₂ supplied in submerged ferm. Of *G. lucidium* for production of Ganoderma. Polysaccharide and ganoderic acid. IN: Enz. And Microb. Tehnol., 2003, vol 32 (3,4). p. 478-484.
9. Zamea G. Tratat de Microbiologie generală. București: Editura Academiei Romane. 1994, p.169-170.
10. Zamea G. Microbiologie generală. București: Editura Academiei Socialiste Romania. 1984, vol 3, p.37.
11. Бурьян Н. И. Практическая микробиология виноделия. Симферополь: Таврида, 2003. 560 с.
12. Горшина Е. С., Скворцова М. М., Бирюков В. В. Технология получения биоактивной субстанции. В: Биотехнол, 2003, Т. 2, с.45-53.