

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
RECTORATUL

Către

.....
Vă facem cunoscut că în ziua de **10. 11. 2011**, la ora 9⁰⁰ în **Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică** va avea loc susținere publică a tezei de doctorat intitulată:

„Studiul Influenței Produselor Polifenolice Asupra Proceselor Metabolice și Dezvoltării unor Microorganisme”

elaborată de d-na biochimist tehnolog **Anca Roxana Hainal (Petrovici)** în vederea conferirii titlului științific de doctor în domeniul **INGINERIE CHIMICĂ**.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Prof. dr. ing. Teodor Măluțan,
Univ. Tehnică „Gheorghe Asachi”, Iași, România | -președinte |
| 2. Prof. dr. ing. Valentin I. Popa,
Univ. Tehnică „Gheorghe Asachi”, Iași, România | -conducător științific |
| 3. Prof. Pietro Buzzini,
Universitatea din Perugia, Italia | -referent oficial |
| 4. Prof. dr. Gabriela Bahrin,
Univ. „Dunărea de Jos”, Galați, România | -referent oficial |
| 5. Conf. dr. ing. Irina Volf,
Univ. Tehnică „Gheorghe Asachi”, Iași, România | -referent oficial |

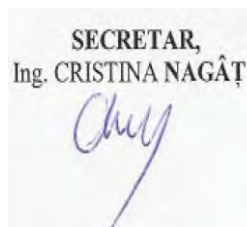
Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,
Prof.univ.dr.ing. ION GIURMA



SECRETAR,
Ing. CRISTINA NAGĂȚ



Mulțumiri

Profundă recunoștință domnului Prof.dr.ing. Valentin I. Popa pentru sprijinul acordat și încurajările oferite care au contribuit foarte mult în procesul formării mele de cercetător și nu numai. Respect profund vis-à-vis de promptitudinea caracteristică și încrederea necondiționată pe care a manifestat-o în cele mai dificile momente derulate pe parcursul celor trei ani de studii doctorale.

Sincere mulțumiri doamnei Conf. dr. ing. Irina Volf pentru sprijinul moral acordat și susținerea în realizarea părții de cercetare, fără de care nu aș fi reușit să abordez tema pe care mereu aș fi vrut să o cercetez.

Multumesc doamnei Prof.dr.Gabriela Bahrim și Platformei Alimentare din cadrul Universității “Dunărea de Jos” din Galați datorită cărora am putut aborda cercetări utilizând un anumit microorganism.

Vreau să mulțumesc din suflet domnului Prof. dr. Pietro Buzzini pentru sprijinul acordat în parcurgerea stagiului de cercetare extern și pentru sfaturile oferite pe parcursul celor trei luni de zile petrecute în laboratoarele Departamentului de Biologie Aplicată din cadrul Universității din Perugia, Italia precum și personalului de la Colecția de Drojdii Industriale DBVPG care m-a îndrumat în accesarea unei noi ramuri în microbiologie. De asemenea, multumesc domnului Prof. dr. Pietro Buzzini pentru acceptul de a mă susține și în ziua cea mai importantă a Programului de studii doctorale.

Mulțumesc tuturor celor care au făcut parte din colectivul Proiectului “Burse Doctorale – O investiție în Inteligență (BRAIN)” ID-6681, datorită căruia am beneficiat de acești trei ani minunați pe parcursul cărora am putut aborda proiectele de cercetare dorite, fără a întâmpina probleme materiale.

Sincere recunoștințe față de Dr.chim. Adina-Mirela Căpraru și domnului Prof. dr. ing. Teodor Maluțan, care au fost alături de mine în realizarea analizelor prezentate în Capitolul VII, pe care îl dedic cu drag lor.

Mulțumiri profunde doamnei Conf. dr. ing. Rodica Diaconescu care mi-a fost aproape pe parcursul a doi ani, alături de care am reușit redactarea Capitolului VI, pe care singură nu aș fi putut să îl realizez.

Multumesc colegilor alături de care am petrecut unii din cei mai frumoși ani din viața mea, ani care regret că s-au terminat, însă am legat prietenii pe care sper că nu l-e voi pierde niciodată.

Și nu în ultimul rând, mulțumesc din suflet soțului meu care m-a îndrumat să urmez acest ultim ciclu de studii și care m-a suportat cu stoicism cei trei ani de zile. De asemenea mulțumesc familiei care a fost alături de mine și m-a încurajat în fiecare moment dificil.

Introducere

În ultimile decenii, o dată cu evoluția tehnologică a crescut și cererea pentru coloranți naturali. Acest lucru este determinat de faptul că pe lângă capacitatea de pigmentare a acestora, coloranții naturali prezintă proprietăți antioxidante față de diferite substraturi organice și anorganice. Datorită căilor de metabolizare diferite în organismul uman sau animal, înlocuirea produșilor de sinteză cu cei de proveniență naturală permite obținerea unor beneficii ale produselor în care sunt adăugați sau ale consumatorilor.

Pe lângă proprietățile binecunoscute de agenți antioxidanți și anticancerigeni ale pigmentilor carotenoizi, aceștia prezintă și capacitatea de pigmentare a diferitelor substraturi. Deoarece se găsesc în natură într-o paletă foarte largă de culori, pot acoperii o bună parte din cerințele unor produse industriale din care ar putea face parte.

Până nu demult, acești pigmenți naturali se extrăgeau din materiale vegetale ca, șofranul, tomate, morcovi ș.a. Recent, datorită reducerii suprafețelor cultivate, și timpului lung al unei recolte, acești produși au început să fie sintetizați chimic (Maldonado I. R. și colab., 2008). Dezavantajele produșilor de proveniență sintetică se referă la faptul că aceștia în organismul uman prezintă diferite căi de metabolizare, spre deosebire de compușii naturali care sunt transformați prin căi bine stabilite. Astfel, în urma metabolizării compușilor sintetici în organism rezultă diferiți metaboliți cu caracter mai mult sau mai puțin toxic. Din acest motiv, se dorește înlocuirea acestor coloranți de proveniență chimică cu cei separați din produse naturale.

Utilizarea microorganismelor cu capacitatea de a sintetiza compuși chimici cu importanță tehnologică a devenit de interes major (Shimada H. și colab., 1998). Conform datelor de literatură, există numeroase specii de microorganisme capabile să producă acești pigmenți naturali din clasa carotenoidelor ca și compuși metabolici secundari cu scop principal în supraviețuirea acestora. Printre clasele principale de organisme identificate se remarcă specii de bacterii, alge, drojdii și fungi. Deoarece aceste microorganisme prezintă o viteză ridicată de creștere și de producere a unor cantități semnificative de caroteni, s-au studiat diferite procedee biotehnologice de obținere a pigmentilor carotenoizi utilizând ca materii prime pentru mediile de cultură, produse secundare rezultate din diferite domenii industriale. De asemenea, carotenii produși în urma cultivării microorganismelor în aceste medii de cultură, s-au dovedit a avea proprietăți similare cu cele ale celor extrași din plante, dar într-un timp redus de biosinteză.

Scopul tezei de doctorat intitulată *Studiul influenței produselor polifenolice asupra proceselor metabolice și dezvoltării unor microorganisme*, a fost utilizarea acestora pentru obținerea unor cantități însemnate de pigmenți carotenoizi folosind diferite substraturi pentru cultivare care conțin compuși polifenolici extrași din materiale vegetale reziduale, în lipsa sau în prezența ionilor de cupru, alături de soluții ale unor lignine rezultate din procesele de dezincrustare alcalină a unor plante anuale (paie de grâu și iarbă).

Teza de doctorat se extinde pe parcursul a **230** de pagini fiind structurată în **9** capitole, referințe bibliografice (**240**), și anexe care cuprind **19** tabele și **189** de figuri. Lucrarea conține două părți și anume Studiul de literatură și contribuțiile proprii aduse în domeniul de cercetare abordat.

Prima parte a tezei de doctorat cuprinde un studiu de literatură structurat în trei capitole. **Capitolul I** intitulat *Stadiul actual al cercetărilor privind posibilitatea obținerii pigmentilor carotenoizi folosind drojdiile Rhodotorula sp.* oferă informații cu privire la descrierea, importanța și metabolismul drojdiilor ce aparțin genului *Rhodotorula*. De asemenea, sunt sistematizate informații cu privire la biosinteza pigmentilor carotenoizi și factorii care influențează acest proces. Totodată sunt analizate tipurile de substraturi pentru cultivare în scopul creșterii capacității de biosinteză a pigmentilor carotenoizi. Deoarece, aceste drojdii prezintă capacitatea de degradare enzimatică a produselor polifenolice, s-au prezentat câteva mecanisme de degradare a unor compuși fenolici existenți în materialele vegetale utilizate în partea experimentală.

În **Capitolul II** - *Stadiul actual al cercetărilor privind posibilitățile de degradare a ligninei utilizând drojdiile Rhodotorula sp.*, sunt descrise aspecte generale cu privire la structura ligninei, precum și utilizarea acesteia în procesele de cultivare a plantelor sau ca sursă de carbon în cultivarea microorganismelor din clasa basidiomicetelor.

Capitolul III cu titlul *Aspecte privind interacțiunea polifenolilor și drojdiilor cu ionii de cupru* cuprinde informații cu privire la capacitatea și condițiile de complexare a compușilor polifenolici cu ionii de cupru precum și modalitățile de adsorbție a acestora utilizând biomasa celulelor de drojdie.

Cea de-a doua parte a tezei de doctorat este destinată prezentării **Contribuțiilor proprii**, fiind structurată pe parcursul a 6 capitole, ultimul fiind destinat prezentării concluziilor finale rezultate în urma analizei rezultatelor experimentale.

Capitolul IV se referă la *Încadrarea taxonomică a tulpinilor de drojdie utilizate în experimente*, și prezintă metodele fiziologice și moleculare de identificare a tulpinilor de drojdie selectate în laboratoarele Platformei Alimentare din cadrul Universității “Dunărea de Jos” din Galați și utilizate în partea experimentală precum și rezultatele obținute în urma acestor experimente.

În **Capitolul V** intitulat *Influența compușilor polifenolici separați prin extracție apoasă din diferite materiale vegetale asupra dezvoltării a două tulpini de drojdie*, tratează în prima etapă metodele utilizate în obținerea datelor experimentale alături de caracterizarea extractelor apoase utilizate în prepararea mediilor de cultură. Pe parcursul acestui capitol sunt detaliate efectele extractelor apoase separate din cele trei materiale vegetale (planta de *Asclepias syriaca*, coajă de *Picea abies* și semințe de *Vitis vinifera*) asupra randamentului în biosinteza de biomasă umedă și a pigmentilor carotenoizi, metabolizarea sursei de carbon precum și metabolizarea compușilor polifenolici existenți în mediul de cultură. Capitolul se finalizează cu concluziile parțiale rezultate din analiza datelor experimentale.

Capitolul VI prezintă rezultatele din *Modelarea și optimizarea procesului de biosinteză a biomasei și a pigmentilor carotenoizi folosind speciile de drojdie Rhodotorula mucilaginosa cultivate în extracte vegetale*, și tratează optimizarea proceselor de cultivare care au permis stabilirea condițiilor optime de cultivare a celor două tulpini de drojdie folosind rezultatele obținute și prezentate în Capitolul V.

Capitolul VII – *Transformarea unor produse ligninice sub acțiunea drojdiilor Rhodotorula mucilaginosa*, urmărește procesul de creștere a drojdiilor și de biosinteză a pigmentilor carotenoizi de către cele două tulpini utilizate în prezența ligninelor din iarbă și din paie de grâu în diferite concentrații. În paralel, la sfârșitul fiecărui experiment, lignina reziduală din mediul de cultură a fost separată și supusă analizelor FT-IR, urmărindu-se modificările structurale survenite în urma atacului sistemelor enzimactice caracteristice drojdiilor cultivate în astfel de medii.

În **Capitolul VIII** sunt prezentate datele din *Studii privind cultivarea drojdiilor Rhodotorula mucilaginosa sub influența unor factori de stres și în prezența produselor polifenolice*. Astfel, cele două tulpini de drojdie au fost cultivate în medii cu trei nivele de concentrații ale celor trei tipuri de extracte, în prezența ionilor de cupru (concentrații de 0, 10, 25, 50, 100 mg/L Cu^{2+}). Rezultatele obținute au condus la stabilirea unor condiții optime de obținere a pigmentilor carotenoizi precum și a unor condiții în care ionii de cupru se rețin în concentrații ridicate.

Capitolul IX – *Concluzii generale*, sistematizează aspectele rezultate obținute în partea experimentală a tezei de doctorat cu sublinierea contribuțiilor originale.

Este de menționat faptul că tulpinile de drojdie au fost selecționate și puse la dispoziție de laboratoarele Platformei Alimentare din cadrul Universității “Dunărea de Jos” din Galați iar identificarea lor a fost posibilă ca urmare a stagiului de cercetare efectuat în laboratoarele Departamentului de Biologie Aplicată, Secția de Microbiologie și Colecția de Drojdie Industriale DBVPG, din cadrul Universității din Perugia, Italia (University of Perugia – Department of Applied Biology, Section of Microbiology & Industrial Yeasts Collection DBVPG (www.agr.unipg.it/dbvpg), Perugia, Italy).

Rezultatele obținute pe parcursul elaborării tezei de doctorat au fost diseminate prin articole publicate în reviste cotate ISI (1 și 2 în curs de publicare) și BDI (4 și 1 în curs de publicare), articole incluse în Volume ale Conferințelor Internaționale și Naționale (4), participări la Conferințe Internaționale (4) și Naționale (4).

În rezumatul tezei de doctorat sunt prezentate pe scurt capitolele care cuprind doar informațiile principale, concluziile generale, activitatea științifică și bibliografia selectivă. Pentru redactarea capitolelor, subcapitolelor, figurilor, tabelelor, precum și a anexelor s-au păstrat notațiile originale din textul tezei de doctorat

Cuprins

PARTEA I – STUDIUL DE LITERATURĂ

Introducere.....	1
 Capitolul I - Stadiul actual al cercetărilor privind posibilitatea obținerii pigmentilor carotenoizi folosind drojdiile <i>Rhodotorula sp.</i>.....	5
I.1. <i>Rhodotorula sp.</i> – descriere, clasificare, importanță.....	5
I.1.1. Descriere.....	5
I.1.2. Clasificare taxonomică.....	5
I.1.3. Importanță.....	6
I.1.3.1. Capacitatea antimicrobiană.....	6
I.2. Morfologia și metabolismul drojdiilor.....	6
I.2.1. Morfologia membranei celulare a drojdiilor.....	7
I.3. Metabolismul drojdiilor.....	8
I.3.1. Metabolismul energetic.....	8
I.3.1.1. Fermentația.....	8
I.3.1.2. Respirația aerobă.....	13
I.3.1.3. Respirația anaerobă.....	13
I.3.2. Metabolismul de biosinteză.....	13
I.3.3. Transportul substanțelor.....	14
I.3.3.1. Difuzia pasivă.....	14
I.3.3.2. Transportul prin transportor.....	14
I.4. Obținerea pigmentilor carotenoizi folosind drojdiile din genul <i>Rhodotorula</i>	14
I.4.1. Răspândirea pigmentilor carotenoizi în lumea microorganismelor.....	15
I.4.1.1. Conținutul de carotenoizi din drojdii.....	16
I.4.1.2. Condițiile optime de cultivare a drojdiilor pentru obținerea de biomasă și producere de carotenoizi.....	17
I.4.1.2.1. Influența pH-ului inițial.....	17
I.4.1.2.2. Influența temperaturii.....	17
I.4.1.2.3. Influența vitezei de aerare.....	18
I.4.1.2.4. Influența concentrației sulfatului de amoniu.....	18
I.4.1.2.5. Influența concentrației de zaharuri.....	18
I.4.1.3. Influența factorilor de mediu asupra biosintezei carotenoizilor.....	18
I.4.1.3.1. Influența temperaturii.....	18
I.4.1.3.2. Influența luminii.....	19
I.4.1.3.3. Influența oxigenului.....	19
I.4.1.3.4. Influența substanțelor nutritive asupra biosintezei pigmentilor carotenoidici.....	19
I.4.1.3.5. Influența fitohormonilor asupra biosintezei carotenoidelor.....	20
I.5. Degradarea compușilor polifenolici de către sistemele enzimactice ale drojdiilor din genul <i>Rhodotorula</i>	20
I.5.1. Modificarea structurii compușilor polifenolici în procesul de biodegradare.....	21
I.5.2. Degradarea diferiților compuși polifenolici.....	25
I.6. Concluzii.....	28
 Capitolul II - Stadiul actual al cercetărilor privind posibilitățile de degradare a ligninei utilizând drojdiile <i>Rhodotorula sp.</i>	29
II.1. Aspecte generale privind structura ligninei.....	29
II.2. Caracterizarea produselor ligninice.....	31
II.2.1. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR.....	32
II.3. Utilizarea produselor ligninice în cultivarea plantelor.....	32
II.3.1. Influența ligninei asupra creșterii și dezvoltării plantelor.....	32
II.3.2. Rolul ligninelor și complexilor acestora cu metalele în sol.....	32
II.3.3. Utilizarea ligninei în creșterea plantelor.....	34
II.4. Degradarea produselor ligninice de către sistemele enzimactice caracteristice unor microorganisme.....	34

II.4.1. Degradarea ligninei de către sistemele enzimatic proprii basidiomicetelor	35
II.4.2. Degradarea ligninei de către sistemele enzimatic ale drojdiilor.....	37
II.4.3. Mecanisme propuse pentru degradarea produselor ligninice de către sistemele enzimatic ale drojdiilor din genul <i>Rhodotorula</i>	38
II.4.3.1. Degradarea unităților structurale ale diferitelor tipuri de lignină.....	39
II.4.3.1.1. Degradarea acidului ferulic.....	39
II.5. Concluzii.....	42

Capitolul III - Aspecte privind interacțiunea polifenolilor și drojdiilor cu ionii de cupru.....

III.1. Stadiul actual al cercetărilor privind prezența metalelor grele în mediul înconjurător..	45
III.1.1. Rolul cuprului în organismele vii.....	45
III.1.2. Surse de contaminare cu metale grele.....	46
III.2. Cercetări cu privire la capacitatea de complexare a polifenolilor cu ionii de cupru....	47
III.2.1. Capacitatea vanilinei de a complexa cu metalele grele.....	48
III.2.2. Capacitatea acidului tanic de a forma complecși cu metalele grele.....	49
III.2.3. Capacitatea flavonelor de a forma complecși cu metalele tranziționale.....	50
III.2.4. Capacitatea quercetinei de a lega metalele grele.....	51
III.2.5. Complecși ai catehinei cu ionii metalelor tranziționale.....	52
III.2.6. Acidul galic și complecșii cu metalele grele.....	54
III.2.7. Capacitatea acidului ferulic de a lega cuprul.....	54
III.2.8. Rolul compușilor polifenolici în dezvoltarea plantelor în medii contaminate cu metale grele.....	54
III.3. Capacitatea drojdiilor din genul <i>Rhodotorula</i> de a participa la procese de bioremediere prin absorbția de metalelor grele.....	55
III.4. Concluzii.....	58

PARTEA II – CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul IV - Încadrarea taxonomică a tulpinilor de drojdie utilizate în experimente.....

IV.1. Oportunitatea abordării temei de cercetare.....	59
IV.2. Materiale și metode utilizate.....	59
IV.2.1. Izolarea tulpinilor de drojdie.....	59
IV.2.2. Medii de cultură utilizate.....	59
IV.3. Identificarea tulpinilor de drojdie.....	61
IV.3.1. Teste fiziologice de identificare a drojdiilor.....	61
IV.3.1.1. Aspecte privind morfologia celor două tulpini de drojdie <i>Rhodotorula</i>	61
IV.3.1.2. Metabolizarea surselor de carbon.....	63
IV.3.1.3. Creșterea pe diferite surse de azot.....	65
IV.3.1.4. Influența temperaturii.....	66
IV.3.2. Teste moleculare de identificare a drojdiilor.....	67
IV.3.2.1. Extracția ADN-ului din celulele de drojdie.....	67
IV.3.2.2. Verificarea calității și cantității ADN-ului extras.....	69
IV.3.2.3. Secvențierea domeniului D1/D2 aparținând genei 26S ARNr din macromolecula de ADN	69
IV.3.2.4. Purificarea amplificatului de ADN.....	71
IV.3.2.5. Cuantificarea cantității de ADN amplificat.....	72
IV.3.2.6. Analiza amplificatului la macrogen și identificarea tulpinilor.....	73
IV.4. Concluzii	75

Capitolul V - Influența compușilor polifenolici separați prin extracție apoasă din diferite materiale vegetale asupra dezvoltării a două tulpini de drojdii.....

V.1. Oportunitatea abordării temei de cercetare.....	77
V.2. Materiale și metode.....	78
V.2.1. Microorganisme.....	78

V.2.2. Medii de cultură	78
V.2.3. Materiale vegetale.....	79
V.2.3.1. Extracția apoasă a materialelor vegetale.....	80
V.2.4. Metode.....	80
V.2.4.1. Transferul drojdiilor și prepararea inoculului pentru cultivare.....	80
V.2.4.2. Determinarea biomasei umede, uscate și a cenușei.....	80
V.2.4.3. Determinarea compușilor polifenolici în extracte.....	81
V.2.4.4. Extracția pigmentilor carotenoizi.....	81
V.2.4.5. Determinarea concentrației pigmentilor carotenoizi.....	82
V.2.4.6. Determinarea glucozei reziduale din mediul de cultură prin metoda manganometrică.....	82
V.2.4.7. Metoda de determinare a amoniacului din mediul de cultură.....	82
V.3. Rezultate și discuții.....	82
V.3.1. Caracterizarea extractelor utilizate pentru prepararea mediilor de cultură.....	82
V.3.2. Influența compușilor polifenolici asupra creșterii drojdiilor.....	84
V.3.2.1. Influența extractelor din <i>Asclepia syriaca</i> asupra randamentului în biomasă al microorganismelor.....	84
V.3.2.2. Dezvoltarea tulpinilor de drojdie în prezența extractelor apoase din coajă de <i>Picea abies</i>	86
V.3.2.3. Influența extractelor apoase din semințe de <i>Vitis vinifera</i> asupra dezvoltării celor două tulpini de drojdii	87
V.3.3. Metabolizarea sursei de carbon din mediul de cultură.....	88
V.3.3.1. Utilizarea glucozei ca sursă de carbon în mediile de cultură ce conțin extract apos din <i>Asclepias syriaca</i>	88
V.3.3.2. Consumul glucozei de cele două tulpini de drojdii când acestea au fost cultivate în prezența extractelor apoase din coaja de <i>Picea abies</i>	89
V.3.3.3. Degradarea glucozei în prezența extractelor apoase din semințe de <i>Vitis vinifera</i>	90
V.3.4. Utilizarea compușilor polifenolici ca sursă de carbon.....	91
V.3.4.1. Degradarea compușilor polifenolici din extractele apoase de <i>Asclepias syriaca</i> de către cele două tulpini de drojdii <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	91
V.3.4.2. Utilizarea ca sursă de carbon a compușilor polifenolici extrași din coajă de <i>Picea abies</i>	92
V.3.4.3. Degradarea compușilor polifenolici din semințe de <i>Vitis vinifera</i> de către cele două tulpini de drojdii.....	94
V.3.5. Influența extractelor apoase asupra variației pH-ului mediului de cultură.....	95
V.3.5.1. Variația pH-ului în mediul de cultură ce conține extracte din <i>Asclepias syriaca</i>	95
V.3.5.2. Variația pH-ului în mediul de cultură ce conține extracte din coajă de <i>Picea abies</i>	96
V.3.5.3. Variația pH-ului în mediul de cultură pe bază de extracte din semințe de <i>Vitis vinifera</i>	98
V.3.6. Biosinteza pigmentilor carotenoizi în prezența compușilor polifenolici	98
V.3.6.1. Influența extractelor din <i>Asclepias syriaca</i> asupra biosintezei de pigmenti carotenoizi.....	98
V.3.6.2. Influența extractelor din coajă de <i>Picea abies</i> asupra biosintezei pigmentilor carotenoizi de către cele două tulpini de drojdie <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100
V.3.6.3. Biosinteza pigmentilor carotenoizi în prezența extractelor apoase din semințe de <i>Vitis vinifera</i>	101
V.4. Concluzii.....	102
V.4.1. Cultivarea celor două specii de drojdii <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> în extracte apoase obținute din <i>Asclepias syriaca</i> a condus la următoarele concluzii.....	102
V.4.2. Cultivarea celor două specii de drojdii <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> în extracte apoase obținute din coajă de <i>Picea abies</i> a condus la următoarele concluzii.....	103
V.4.3. Cultivarea celor două specii de drojdii <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> în extracte apoase obținute din semințe de <i>Vitis vinifera</i> a condus la următoarele concluzii.....	104

Capitolul VI – Modelarea și optimizarea procesului de biosinteză a biomasei și a pigmenților carotenoizi folosind speciile de drojdii <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> cultivate în extracte vegetale.....	107
--	------------

VI.1. Oportunitatea abordării temei de cercetare.....	107
VI.2. Metode utilizate.....	107
VI.2.1. Metoda celor mai mici pătrate – Principiul metodei.....	107
VI.2.2. Regresia polinomială – Principiul metodei.....	108
VI.2.3. Metoda gradientului conjugat – Principiul metodei.....	110
VI.2.4. Regresia multiplă – Principiul metodei.....	113
VI.3. Rezultate și discuții.....	115
VI.3.1. Modelarea și optimizarea procesului de biosinteză a biomasei folosind două tulpini de drojdie <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> cultivate în medii ce conțin diferite extracte apoase din materiale vegetale.....	115
VI.3.1.1. Modelarea statistică.....	116
VI.3.1.1.2. Rezultatele modelării procesului de obținere a biomasei folosind două tulpini de drojdie <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> în diferite medii de cultură.....	116
VI.3.1.1.2.1. Modelarea procesului de cultivare celor două tulpini de drojdii în mediul ce conține extracte apoase din <i>Asclepias syriaca</i>	116
VI.3.1.1.2.2. Modelarea procesului de cultivare a celor două tulpini de drojdii condus în mediul de cultură ce conține extracte apoase din <i>Asclepias syriaca</i> cu un adaos de 1 g/L glucoză.....	118
VI.3.1.1.2.3. Modelarea procesului de cultivare a celor două tulpini de drojdii în medii de cultură ce conțin extracte apoase din semințe de <i>Vitis vinifera</i>	120
VI.3.1.1.2.4. Modelarea proceselor de cultivare a drojdiilor în medii de cultură în componența cărora sunt prezente extracte apoase din coajă de <i>Picea abies</i>	121
VI.3.1.1.2.5. Modelarea proceselor de cultivare conduse în medii în componența cărora sunt prezente extracte apoase din coajă de <i>Picea abies</i> cu un conținut de 1 g/L glucoză... ..	122
VI.3.1.2. Optimizarea proceselor fermentative.....	124
VI. 3.1.2.1. Planificarea experimentală în studii de optimizare a proceselor fermentative.....	124
VI. 3.1.2.2. Strategia experimentală.....	124
VI. 3.1.2.3. Rezultate obținute.....	125
VI.3.2. Modelarea și optimizarea procesului de obținere a pigmentilor carotenoizi folosind două tulpini de drojdie <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> cultivate în medii ce conțin extracte apoase din diferite materiale vegetale	128
VI.3.2.1. Modelarea proceselor de obținere a pigmentilor carotenoizi.....	128
VI.3.2.1.1. Modelarea proceselor de obținere a pigmentilor carotenoizi din probele martor.....	128
VI.3.2.1.2. Modelarea proceselor de biosinteză a pigmentilor carotenoizi pentru cultivarea drojdiilor în extracte apoase din <i>Asclepias syriaca</i>	128
VI.3.2.1.3. Modelarea proceselor de biosinteză a pigmentilor carotenoizi pentru cultivarea drojdiilor în extracte apoase din <i>Asclepias syriaca</i> cu un conținut în glucoză de 1 g/L.....	130
VI.3.2.1.4. Modelarea proceselor de biosinteză a pigmentilor carotenoizi pentru culturile în extracte apoase din coajă de <i>Picea abies</i>	131
VI.3.2.1.5. Modelarea proceselor de biosinteză a pigmentilor carotenoizi pentru culturile în extracte apoase din coajă de <i>Picea abies</i> și 1 g/L glucoză în mediul de cultură.....	132
VI.3.2.1.6. Modelarea proceselor de biosinteză a pigmentilor carotenoizi pentru culturile în extracte apoase din semințe de <i>Vitis vinifera</i>	134
VI.3.2.2. Optimizarea procesului de obținere a pigmentilor carotenoizi	136
VI.4. Concluzii.....	143

Capitolul VII - Transformarea unor produse ligninice sub acțiunea drojdiilor

<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	145
VII.1. Oportunitatea abordării temei de cercetare.....	145
VII.2. Materiale și metode utilizate.....	146
VII.2.1. Materiale.....	146
VII.2.1.1. Microorganisme.....	146
VII.2.1.2. Lignine.....	146
VII.2.2. Metode.....	146
VII.2.2.1. Cultivarea celor două tulpini de drojdie.....	146
VII.2.2.1.1. Prepararea suspensiilor de lignină.....	146
VII.2.2.1.2. Obținerea mediului de cultură.....	147
VII.2.2.2. Determinarea biomasei umede și uscate.	147

VII.2.2.3. Extracția pigmentilor carotenoizi.....	147
VII.2.2.4. Determinarea concentrației pigmentilor carotenoizi.....	147
VII.2.2.5. Recuperarea ligninei din mediul de cultură.....	147
VII.2.2.6. Caracterizarea ligninelor prin spectroscopie FT-IR.....	148
VII.3. Rezultate și discuții.....	148
VII.3.1. Influența naturii ligninelor asupra randamentului în biomasă umedă.....	148
VII.3.2. Influența prezenței produselor ligninice în mediul de cultură asupra variației pH-ului.....	150
VII.3.3. Influența prezenței produselor ligninice asupra biosintezei de pigmenți carotenoizi.....	152
VII.3.4. Caracterizarea spectrală a produselor ligninice transformate în procesele fermentative.....	153
VII.4. Concluzii.....	164

Capitolul VIII - Studii privind cultivarea drojdiilor *Rhodotorula mucilaginosa* sub influența unor factori de stres și în prezența produselor polifenolice

.....	165
VIII.1. Oportunitatea abordării temei de cercetare.....	165
VIII.2. Materiale și metode.....	166
VIII.2.1. Materiale	166
VIII.2.1.1. Microorganisme.....	166
VIII.2.1.2. Extracte vegetale utilizate în realizarea experimentelor	166
VIII.2.2. Metode.....	166
VIII.2.2.1. Cultivarea celor două tulpini de drojdie	167
VIII.2.2.1.1. Extracția cu apă caldă a materialelor utilizate.....	167
VIII.2.2.1.2. Obținerea mediului de cultură.....	167
VIII.2.2.1.3. Determinarea biomasei umede și uscate.....	167
VIII.2.2.1.4. Extracția pigmentilor carotenoizi.....	167
VIII.2.2.1.5. Determinarea concentrației pigmentilor carotenoizi.....	167
VIII.2.2.1.6. Determinarea concentrației ionilor metalici liberi	167
VIII.2.2.1.7. Determinarea compușilor polifenolici în extracte.....	168
VIII.3. Rezultate și discuții.....	168
VIII.3.1. Caracterizarea extractelor utilizate în cultivarea microorganismelor.....	168
VIII.3.2. Cultivarea celor două tulpini de drojdie în extracte din <i>Asclepias syriaca</i> care conțin ioni de cupru în diferite concentrații.....	169
VIII.3.2.1. Randamentul în biomasă umedă.....	169
VIII.3.2.2. Variația pH-ului pe parcursul proceselor.....	171
VIII.3.2.3. Variația concentrației compușilor polifenolici în mediul de cultură.....	173
VIII.3.2.4. Variația concentrației ionilor de cupru.....	175
VIII.3.2.5. Influența condițiilor de cultură asupra biosintezei pigmentilor carotenoizi.....	177
VIII.3.3. Cultivarea drojdiilor în extracte din coajă de <i>Picea abies</i> în prezența diferitelor concentrații de cupru.....	179
VIII.3.3.1. Influența condițiilor de cultură asupra randamentului în biomasă.....	179
VIII.3.3.2. Variația pH-ului pe parcursul proceselor fermentative.....	181
VIII.3.3.3. Variația concentrației compușilor polifenolici în mediul de cultură.....	183
VIII.3.3.4. Variația concentrației ionilor de cupru.....	184
VIII.3.3.5. Influența condițiilor de cultură asupra biosintezei pigmentilor carotenoizi.....	186
VIII.3.4. Cultivarea drojdiilor în extracte din semințe de <i>Vitis vinifera</i> în prezența diferitelor concentrații ale ionilor de cupru.....	188
VIII.3.4.1. Influența condițiilor de cultură asupra randamentului în biomasă.....	188
VIII.3.4.2. Variația pH-ului pe parcursul proceselor fermentative.....	189
VIII.3.4.3. Variația concentrației compușilor polifenolici în mediul de cultură.....	191
VIII.3.4.4. Variația concentrației ionilor de cupru.....	193
VIII.3.4.5. Influența condițiilor de cultură asupra biosintezei pigmentilor carotenoizi.....	194
VIII.4. Concluzii	197
VIII.4.1. Cultivarea celor două tulpini de drojdie în prezența compușilor polifenolici din <i>Asclepias syriaca</i> și a ionilor de cupru a condus la următoarele concluzii.....	197
VIII.4.2. Cultivarea celor două tulpini de drojdie în prezența compușilor polifenolici din coajă de <i>Picea abies</i> și a ionilor de cupru a condus la următoarele concluzii.....	198

VIII.4.3. Cultivarea celor două tulpini de drojdii în prezența compușilor polifenolici din semințe de <i>Vitis vinifera</i> și a ionilor de cupru a condus la următoarele concluzii.....	199
Capitolul IX Concluzii finale.....	201
Bibliografie.....	207
Activitate științifică.....	222
Anexe	

PARTEA I – STUDIUL DE LITERATURĂ

Capitolul I - Stadiul actual al cercetărilor privind posibilitatea obținerii pigmentilor carotenoizi folosind drojdiile *Rhodotorula sp.*

Primul capitol al studiului de literatură cuprinde informații cu privire la descrierea, importanța și metabolismul drojdiilor ce aparțin genului *Rhodotorula*. De asemenea, sunt sistematizate informații cu privire la biosinteza pigmentilor carotenoizi și factorii care influențează acest proces. Totodată sunt analizate tipurile substratelor folosite pentru cultivare în scopul creșterii capacității de biosinteză a acestor pigmenți. Deoarece, aceste drojdii prezintă capacități de degradare enzimatică a produselor polifenolice, s-au analizat câteva mecanisme de degradare a unora dintre cei existenți în materialele vegetale utilizate în partea experimentală.

Capitolul II - Stadiul actual al cercetărilor privind posibilitățile de degradare ale ligninei utilizând drojdiile *Rhodotorula*

În acest capitol sunt descrise aspecte generale cu privire la structura macromoleculei de lignină, precum și utilizarea acesteia în procesele de cultivare a plantelor sau ca sursă de carbon în cultivarea microorganismelor din clasa basidiomicetelor. De asemenea, sunt prezentate căile și produșii de degradare a monomerilor ligninei de către sistemele enzimactice biosintetizate de drojdiile din genul *Rhodotorula*.

Capitolul III - Aspecte privind interacțiunea polifenolilor și drojdiilor cu ionii de cupru

Capitolul III cuprinde informații cu privire la capacitatea și condițiile de complexare a compușilor polifenolici cu ionii de cupru precum și modalitățile de adsorbție a acestor ioni utilizând biomasa celulelor de drojdie.

PARTEA II – CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul IV - Încadrarea taxonomică a tulpinilor de drojdie utilizate în experimente

IV.1. Oportunitatea abordării temei de cercetare

Identificarea unor noi specii de drojdii reprezintă un subiect foarte important cu atât mai mult cu cât tulpinile respective pot fi utilizate mai apoi pentru stabilirea unor posibilități de utilizare în cercetarea fundamentală și aplicativă. În experimentele efectuate în cadrul tezei de doctorat s-au folosit două tulpini de drojdii izolate în laboratoarele Platformei Alimentare din cadrul Universității “Dunărea de Jos” din Galați

O a treia tulpină de drojdie s-a obținut prin tratarea cu o lampă UV a tulpinii notată R1, o perioadă de minim 12 ore. Identificarea celor trei tulpini de drojdie a fost posibilă în

laboratoarele Departamentului de Biologie Aplicată, Secția de Microbiologie și Colecția de Drojdii Industriale DBVPG, din cadrul Universității din Perugia, Italia (University of Perugia – Department of Applied Biology, Section of Microbiology & Industrial Yeasts Collection DBVPG (www.agr.unipg.it/dbvpg), Perugia, Italy). În aceste laboratoare s-a parcurs stagiul de cercetare extern, iar activitățile de cercetare sub conducerea Prof. Pietro Buzzini au permis îndeplinirea obiectivului propus.

IV.2. Materiale și metode utilizate

IV.2.1. Izolarea tulpinilor de drojdie

Cele două tulpini de drojdie *Rhodotorula sp.*, au fost izolate în laboratoarele Platformei Alimentare din cadrul Universității “Dunarea de Jos” din Galați. Selecția s-a realizat din medii lactice naturale (Bai M., și colab. 2010). Cele două tulpini au fost notate conventional cu R1 și R2.

IV.3.1. Teste fiziologice de identificare a drojdiilor

IV.3.1.2. Metabolizarea surselor de carbon

Numite și teste de asimilare, sunt în realitate teste care stabilesc abilitatea drojdiilor de a crește aerobically pe diferiți compuși ai carbonului care constituie singura sursă de energie din mediul de cultură. Aceste teste se pot realiza atât pe mediul solid cât și pe mediul lichid însă, pentru identificarea unor specii noi este necesară creșterea acestora pe medii lichide.

Tabel. IV. 1.

Rezultatele obținute în urma testelor de metabolizare a surselor de carbon

Sursa de carbon	R1-2	R2-2	R2-2 UV
D-glucoză	+	+	+
D-galactoză	+	W	W
L-sorboză	W	W	V
D-riboză	+	+	+
D-xiloză	+	+	+
L-arabinoză	+	+	+
D-arabinoză	+	+	+
Sucroză	+	+	+
Maltoză	+	+	+
α , α trehaloză	+	+	+
Metil α -glucozidă	-	-	V
Salicină	+	+	+
Arbutină	+	+	+
Melibioză	-	-	-
Lactoză	-	-	-
Rafinoză	+	+	+
Melezitoză	+	+	+
Glicerol	W	W	+
Meso-eritritol	-	-	-
Ribitol	+	+	+
Xilitol	+	+	+
D-glucitol (sorbitol)	W	W	W
D-manitol	W	W	+
Galactitol	-	-	-
Mio-inositol	-	-	-
Glucono δ -lactonă	+	+	+
D-gluconat	+	+	+
D-glucuronat	-	-	-
D-galacturonat	-	W	W
DL-lactat	W	W	+
Succinat	+	+	Nu
Metanol	-	-	-
Etanol	-	Nu	Nu
Acid L-malic	+	+	+
N-acetil D-glucozamină	-	-	-
Acetat de etil	+	+	+

Monitorizarea rezultatelor se face la fiecare 7 zile (Tabel. IV. 1.) și se notează după cum urmează:

- ⇒ v - variabil – când tulpina prezintă o creștere slabă la sfârșitul celor 3 săptămâni;
- ⇒ + - pozitiv – când tulpina prezintă o creștere evidentă după prima săptămână;
- ⇒ - negativ – când tulpina nu prezintă turbiditate după 3 săptămâni;
- ⇒ W – slab – când tulpina prezintă o creștere slabă după două săptămâni;
- ⇒ Nu – nu s-au testat sursele de carbon respective;

După cum se poate observa din Tabelul IV. 1., cele trei tulpini de drojdie se manifestă diferit în mediul de cultură ce conține aceeași sursă de carbon. Diferența se constată pentru următorii compuși: D-galactoză, L-sorboză, metil α -glucozidă, glicerol, sorbitol, D-manitol, D-galacturonat, DL-lactat, cazuri în care nu se înregistrează aceeași dinamică de creștere pentru toate tulpinile. Cu toate acestea, rezultatele introduse în baza de date CBS confirmă o similaritate de 100 % cu *Rhodotorula mucilaginosa* pentru toate cele trei tulpini.

Aceste diferențe în asimilarea surselor de carbon pot fi determinate de deosebirile interspecifice care intervin în interiorul aceleiași specii de drojdie, dar care a fost izolată din medii naturale diferite. Astfel, odată ce tulpinile au fost izolate una din lapte, iar cealaltă din branză, se poate afirma că aceste mici diferențe pot apare însă, cele trei tulpini aparțin aceleiași specii.

IV.3.1.3. Creșterea pe diferite surse de azot

Drojdiile sunt capabile să utilizeze o varietate foarte largă a surselor de azot. Cu toate acestea, cele mai indicate surse de azot folosite în testarea noilor specii sunt următoarele: **nitrați**, **nitriți**, **hipoclorura de etilamină**, **dihidrociorură de cadaverină**, **L-lizină**, imidazolul, glucozamină, creatină, creatinină, **sulfatul de amoniu**, dintre care doar cele marcate au fost utilizate în experimente.

Tabelul IV. 2.

Rezultatele obținute în urma testelor de asimilare a surselor de azot

Sursa de azot	R1-2	R2-2	R2-2 UV
Nitrați	-	-	-
Etil amină	+	+	+
L- lizină	+	+	+
Cadaverină	+	+	+
Sulfat de amoniu	+	+	+

Din Tabelul IV.2. se poate constata că cele trei tulpini de drojdie manifestă reacție pozitivă pentru toate sursele de azot cu excepția nitraților.

IV.3.1.4. Influența temperaturii

Majoritatea speciilor de drojdie cresc foarte bine la temperaturi cuprinse între 20°C și 28°C. Cu toate acestea, sunt specii care se dezvoltă în alte domenii de temperatură, printre acestea încadrându-se cele izolate din habitate extreme (Kurtzman C. P., Fell J. W., 1998, pg. 95).

Pentru cele trei tulpini de drojdie s-au efectuat teste de cultivare la temperaturi de 4°C, 25°C, 30°C, și 37°C, în mediul de cultură YPD lichid. Inocularea s-a realizat cu 0,1 mL în 5 mL de mediu, și culturile s-au incubat pentru 4 zile. Evaluarea s-a efectuat la 2 și la 4 zile și rezultatele sunt prezentate în Tabelul IV. 3.

Se poate observa că singura temperatură la care drojdiile nu cresc este cea de 4°C, și prin urmare ele pot fi păstrate în siguranță, în stare latentă la această temperatură. De asemenea, reacția pozitivă a acestora la 37°C, care este temperatura corpului uman, confirmă

faptul că aceste tulpini pot parazita organismul uman în cazul în care acesta este labil imunitar (Tabelul IV. 3).

Tabelul IV. 3.

Rezultatele obtinute în urma testelor privind influența temperaturii			
Temperatura, °C	R1-2	R2-2	R2-2 UV
4	-	-	-
25	+	+	+
30	+	+	+
37	+	+	+

IV.3.2. Teste moleculare de identificare a drojdiilor

IV.3.2.3. Secvențierea domeniului D1/D2 aparținând genei 26S ARNr din macromolecula de ADN

Secvențierea domeniului D1/D2 propriu genei 26S ARNr care include gena 5.8S ARNr, se realizează prin amplificarea ADN-ului utilizând primerii RLR3R (5'-GGT CCG TGT TTC AAG AC-3') și V9 (5'-TGC GTT GAT TAC GTC CCT GC-3') (MWG Biotech) (Thomas – Hall S. R., și colab., 2010).

Pentru amplificarea zonei dorite se pregătesc flacoane prevăzute cu dop, cu volumul de 1 mL. Amestecul de reactivi pentru programul PCR se obține utilizând volumele din Tabelul IV. 4. Se ajunge la un volum total de 45 μL peste care se adaugă 5 μL din soluția de ADN extras.

Tabel. IV. 4.

Reactivi utilizați pentru prepararea probelor prior programului PCR		
Soluții stoc (conc.)	Concentrații finale	Volum/tub (μL)
Tampon PCR (10X)	1X	5
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	4
dNTPs (1,25 mM)	250 μM / pe proba	10
Taq (5U/ μL)	0,02 U / μL (1U / 50 μL)	0,2
Primer V9 (10 μM)	0,5 μM	2,5
Primer RLR3R (10 μM)	0,5 μM	2,5
AND extras	-	5
H ₂ O	-	20,8
Total		50 μL

Amplificarea ADN-ului se efectuează utilizând Tpersonal Combi Thermal Cycler (Biometra GmbH, Goettingen, Germany), aplicând programul descris în Tabelul IV. 5.

Tabel. IV. 5.
Programul PCR

Etape	Temperatură	Timp	Descriere
1	94 °C	5 min	Denaturare
2	94 °C	45 sec	X 30 de cicluri
3	52 °C	30 sec	
4	72 °C	2 min	
5	72 °C	7 min	Întindere
6	4 °C	-	Pauză
Durata		1 h 50 min	

Pe parcursul primei etape, este necesară o temperatură ridicată pentru denaturarea moleculei de ADN și separarea celor două catene pe care le conține. Pe parcursul etapelor 2-4 are loc atacul primerului asupra catenei de ADN și transcrierea secvențelor nucleotidice corespondente. ADN-polimeraza termostabilă (Taq), se leagă de primer inițiind polimerizarea unei noi catene de ADN care utilizează ca matrice catena de ADN extras și ca monomeri dNTPs (nucleozil tri-fosfat). Astfel, în urma celor 30 de cicluri are loc transcrierea domeniului care interesează din macromolecula de ADN.

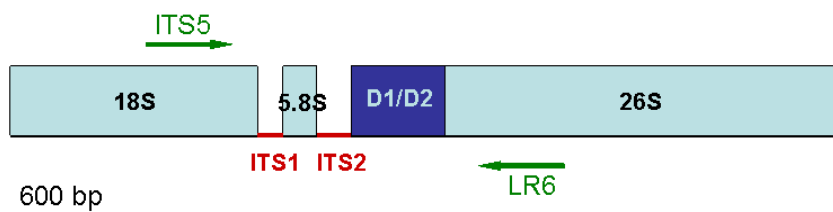
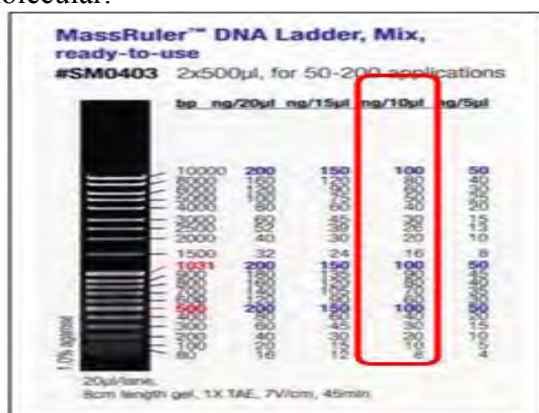


Fig. IV.3. Poziția domeniului D1/D2 pe gena 26S și direcția de transcriere a primerilor ITS5 și LR6 utilizați în secvențierea acestei zone.

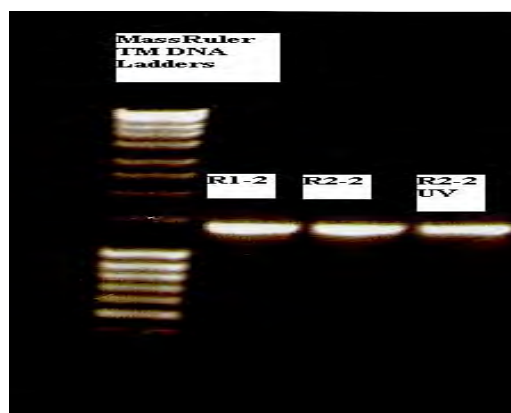
După finalizarea programului produșii rezultați în urma amplificării sunt separați prin electroforeză. Pentru această operație se amestecă foarte bine 5 μ L de amplificat cu 1 μ L de 6x Loading Dye (Fermentas Inc., Hanover, US). Se injectează în gelul de electroforeză și se rulează programul descris la IV.3. 2. 3. Întotdeauna acest procedeu se realizează față de un martor cu apă, astfel verificându-se puritatea apei utilizate în diluția probelor și puritatea amplificatului. După electroforeză, dacă în urma tratamentului PCR s-a putut amplifica domeniul D1/D2 (Fig. IV.3.) prin utilizarea inițială a primerului ITS5 (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3') a LR6 (5'- CGC CAG TTC TGC TTA CC -3') și LR6 (5'- CGC CAG TTC TGC TTA CC -3') (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) se trece la următoarea etapă de purificare a amplificatului utilizând un kit de purificare.

IV.3.2.5. Cuantificarea cantității de ADN amplificat

Amplificatul obținut în urma purificării necesită cuantificare. Această etapă se realizează deoarece cantitatea de ADN obținută diferă de la probă la probă. În final, toate probele trebuie să prezinte o concentrație de ADN de 50 μ g/ μ L. Pentru a ajunge la această concentrație într-un volum total de 20 μ L se realizează diluții utilizând apă pentru uz molecular.



A) Semnificația cantitativă a fiecărei benzi



B) Cuantificarea cantității de ADN amplificat

Fig. IV.4. Comparația spoturilor obținute în urma electroforezei cu martorul utilizat în cuantificarea cantității de ADN

Cuantificarea se realizează în comparație cu un martor MASS Ruler DNA Ladder (80 bp-10kb) (Fermentas Inc., Hanover, US). Astfel, 10 μ L amplificat se amestecă cu 2 μ L 6x MASS Ruler Loading Dye (Fermentas Inc., Hanover, US) și se supune electroforezei față de martor care este în volum de 10 μ L MASS Ruler DNA Ladders (Fermentas Inc., Hanover, US).

Având în vedere rezultatele obținute (Fig. IV.4), probele proprii de ADN se vor dilua în raport de 1:1 amplificat ADN:soluție tampon. Probele diluate se supun apoi analizei macrogen în vederea identificării succesiunii de baze și identificarea speciei cărora aparțin tulpinile studiate. Specile au fost identificate prin compararea secvențelor obținute în banca de date GenBank (BLASTN freeware) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Conform analizei, toate cele trei tulpini de drojdie se identifică cu *Rhodotorula mucilaginosa* (Tabel. IV. 6.). Diferențele de aspect al culturii pe mediul agarizat se explică prin prezența deosebirilor interspecifice care apar ca rezultat al izolării speciilor din medii naturale diferite.

Tabel. IV. 6.
Analiza BLASTN (Yang C., și colab., 2008);

Tulpina	Numărul de baze (bp)	Specii	Număr de acces	Identitate maximă (%)
R1-2	531	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 26S ribosomal RNA gene	AF070432	100% - 531/531
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain CBS482	AF189961	100% - 531/531
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain CBS8383	AF189959	99% - 530/531
R2-2	556	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 26S ribosomal RNA gene	AF070432	100% - 556/556
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain CBS482	AF189961	100% - 556/556
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain CBS8383	AF189959	99% - 555/556
R2-2 UV	561	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 26S ribosomal RNA gene	AF070432	100% - 561/561
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain CBS482	AF189961	100% - 561/561
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> strain CBS8383	AF189959	99% - 560/561

Se poate observa că indiferent de numărul de baze izolate pentru fiecare tulpină de drojdie analizată, procentul de asemănare este de 100% cu *Rhodotorula mucilaginosa* AF070432.

Capitolul V - Influența compușilor polifenolici separați prin extracție apoasă din diferite materiale vegetale asupra dezvoltării a două tulpini de drojdii

V.1. Oportunitatea abordării temei de cercetare

Pigmenții din clasa carotenoizilor prezintă capacitate de pigmentare pe lângă proprietățile binecunoscute de agenți antioxidanți și anticancerigeni. Aceștia se găsesc într-o paletă foarte largă de culori, de la galben până la nuanțe de albastru, astfel acoperind o bună parte din produsele industriale din care ar putea să facă parte.

În ultimii ani utilizarea microorganismelor cu capacități de sinteză a compușilor chimici cu importanță tehnologică a devenit de interes major (Shimada H. și colab., 1998). Conform datelor de literatură, există numeroase specii de microorganisme capabile să producă acești pigmenți naturali din clasa carotenoidelor ca și compuși metabolici secundari. Printre clasele principale de organisme identificate se remarcă specii de bacterii, alge, drojdii, fungi. Deoarece aceste microorganisme prezintă o viteză ridicată de creștere și de producere a unor cantități semnificative de caroteni, s-au studiat diferite procedee biotehnologice de obținere a pigmenților carotenoizi utilizând ca materii prime pentru mediile de cultură, produse secundare rezultate din diferite domenii industriale. De asemenea, carotenii produși

în urma cultivării microorganismelor în aceste medii de cultură, s-au dovedit a avea proprietăți similare cu cele ale celor extrași din plante, dar într-un timp redus de biosinteză.

În acest scop, în experimentele efectuate în cadrul tezei de doctorat s-au analizat posibilitățile de utilizare a trei materiale vegetale reziduale ca resurse pentru obținerea de medii de cultură în cultivarea unor specii de drojdii capabile să biosintetizeze pigmenți carotenoizi. Astfel, folosind *Asclepias syriaca* plantă, coajă de *Picea abies* și semințele de *Vitis vinifera* (soiul Merlot), s-au preparat extracte apoase care au fost folosite în mediile de cultură. Procesul de cultivare a microorganismelor a fost urmărit prin randamentul în biomasă umedă și conținutul acestora în pigmenți carotenoizi precum și concentrația compușilor polifenolici din mediul de cultură rezidual.

V.2. Materiale și metode

V.2.2. Medii de cultură

Primul mediu de cultură care conține glucoză ca principală sursă de carbon are următoarea compoziție chimică: 15 g/L glucoză (Aksu Z., Eren A. Tugba, 2005), 2,5 g/L extract de drojdie, 3 g/L acetat de sodiu (Chiriță E., 2005), 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (D'Cunha G. B., 2005), 1 g/L KH_2PO_4 , 0,1 g/L CaCl_2 , 0,25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Liu H. și colab., 2008), 0,015 g/L ZnSO_4 , 0,015 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Cel de-al doilea mediu de cultură care conține glucoză ca sursă de carbon într-o concentrație redusă are următoarea compoziție chimică: 1 g/L glucoză, 2,5 g/L extract de drojdie, 3 g/L acetat de sodiu, 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L KH_2PO_4 , 0,1 g/L CaCl_2 , 0,25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,015 g/L ZnSO_4 , 0,015 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Cantitatea de 1 g/L glucoză este necesară ca o sursă minimă de carbon pentru activarea metabolismului și sinteza echipamentului enzimatic necesar pentru degradarea altor compuși chimici prezenți în extractele apoase. În acest caz mediile de cultură s-au preparat în extractele vegetale obținute anterior. Valoarea pH-ului a fost reglată la 6 utilizând o soluție tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Seracu D.I., 1989)

V.2.3. Materiale vegetale

Asclepias syriaca care este o plantă decorativă, meliferă, cultivată răzleț în țara noastră în zonele umede și însoțite în special în zona Ostrovul Moldova Veche. Planta a fost studiată datorită varietății de compuși chimici pe care îi posedă și numărului mare de utilizări. Inițial a fost cercetată ca sursă de cauciuc, dar cantitățile mici de polimer cis-izoprenic cu masă moleculară redusă nu a justificat aplicarea ei decât ca un component al gumei de mestecat (Rusan V. și colab., 1984). Alături de cauciuc, latexul extras din plantă conține și o componentă rășinoasă, raportul acestora fiind dependent de părțile morfologice și vârsta plantei (cauciuc/rășină: anul I: 0,2-0,7/8,2; anul II: 0,2/0,7; anul III: 0/16,3). Planta conține celuloză și lignină, hemiceluloze și polifenoli, zaharuri, alcaloizi și hidrocarburi, iar extracția cu apă permite recuperarea a 29,94% din componentele solubile (Simionescu Cr. I., și colab., 1987).

Semințele de *Vitis vinifera*, provin în urma procesării strugurilor (soiul Merlot) pentru obținerea mustului. Sâmburii au fost uscați și măcinați într-o moară de laborator, după care au fost extrași cu apă caldă. Acest material reprezintă o sursă foarte bogată de polifenoli, compuși cu puternice efecte antioxidante și antimicrobiene. Semințele de *Vitis vinifera* conțin catehină, epicatehină, acid galic, polimeri și oligomeri procianidinici (Furiga A. și colab., 2009).

În urma prelucrării lemnului rezultă cantități foarte mari de coajă, iar de cele mai multe ori aceste reziduuri sunt arse în cazane pentru a produce o parte din necesarul energiei în industria forestieră (Diouf P. N. și colab., 2009). Având în vedere însă compoziția chimică valoroasă a deșeurilor de coajă de molid (*Picea abies*), aceasta a fost utilizată pentru obținerea unor extracte apoase cu apă caldă după uscare și măcinare.

V.2.3.1. Extracția apoasă a materialelor vegetale

Utilizând materialele menționate s-a realizat extracția compușilor polifenolici după cum urmează: cantități determinate din materialul vegetal mărunțit au fost introduse în 125 mL apă într-un pahar Erlenmayer care se menține într-o baie de apă la o temperatură de 85-90 °C, sub agitare, menținându-se la această temperatură timp de 45 min. La aceste intervale materialul se decantează și soluția limpede se filtrează, operațiunea repetându-se până la obținerea unui extract incolor. Toate fracțiunile se aduc într-un flacon cotate de 1L și se completează până la semn cu apă distilată.

V.2.5. Metode

Pentru efectuarea experimentelor, s-au preparat mediile de cultură în extractele apoase din materialele vegetale prezentate, după care mediul a fost repartizat în pahare Erlenmayer pentru inoculare și cultivare. Etapele experimentale sunt prezentate în Fig. V.1.

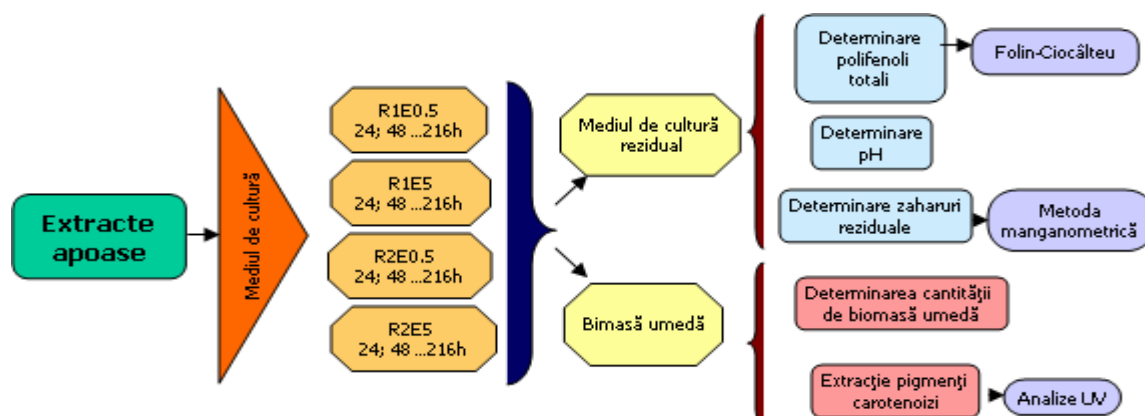


Fig. V. 1. Etapele experimentale parcurse

V. 3. Rezultate și discuții

V.3.1. Caracterizarea extractelor utilizate pentru prepararea mediilor de cultură

Pentru obținerea extractelor folosite în componența mediilor de cultură, s-a efectuat diluarea extractului din 20 g/500mL, până ce concentrația acestuia a devenit echivalentă cu cea a unui extract separat din 0,5 respectiv 5g/L material vegetal. Aceste extracte au fost caracterizate doar din punct de vedere al conținutului de polifenoli totali (Tabel. V. 2.).

Tabel V. 2.

Conținutul de polifenoli totali din extractele folosite pentru prepararea mediului de cultură în procesele de fermentație

Extracte apoase	Conținutul în polifenoli totali a extractului din 0,5 g/L material vegetal (mg GAE /L)	Conținutul în polifenoli totali a extractului din 5 g/L material vegetal (mg GAE /L)
Coajă de <i>Picea abies</i>	89,98	148,78
Semințe de <i>Vitis vinifera</i>	69,19	143,39
<i>Asclepias syriaca</i>	53,47	112,93

În Tabelul V. 4. se poate observa conținutul în compuși fenolici individuali al celor trei tipuri de material vegetal, determinări care s-au realizat prin analize HPLC (Hainal A. R. și colab., 2011b).

Tabel V. 4.

Concentrația compușilor fenolici în extractele apoase din coajă de *Picea abies*, semințe de *Vitis vinifera* și tulpină de *Asclepias syriaca* (mg/100g material uscat)

Compuși fenolici	Extracte din coajă de <i>Picea abies</i>	Extracte din semințe de <i>Vitis vinifera</i>	Extracte din <i>Asclepias syriaca</i>
Acid galic	3,19	6,12	-
Catehină	31	44,36	-
Acid vanilic	39,4	-	0,87
Acid siringic	-	-	0,98
Acid p-cumaric	-	-	0,11

V.3.2.1. Influența extractelor din *Asclepias syriaca* asupra randamentului în biomasă al microorganismelor

Extractele apoase obținute din planta *Asclepias syriaca* se caracterizează printr-un conținut ridicat de compuși polifenolici (Hainal A. R., și colab., 2010a), care introduși în mediul de cultură al drojdiilor *Rhodotorula sp.* pot stimula sau inhiba dezvoltarea acestora (Fig. V.2.).

S-a constatat că folosirea extractului apos din *Asclepias syriaca* cu un conținut în polifenoli totali de 53,47 mg/L GAE are ca efect inhibarea dezvoltării drojdiei R1 (Fig.V.2.). Cultivarea acestei tulpini într-un extract cu o concentrație mai ridicată în polifenoli (112,93 mg/L GAE) a avut ca efect obținerea unui randament mai ridicat în biomasă (R1AS5) comparativ cu cel corespunzător probei de referință (R1) și anume 52 g/L biomasă umedă la sfârșitul procesului fermentativ (Hainal A. R. și colab., 2009c).

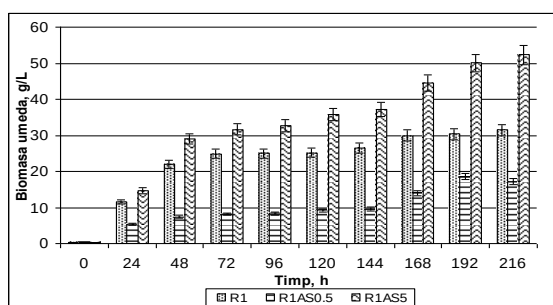


Fig. V. 2. Variația cantității de biomasă umedă pe parcursul procesului fermentativ folosind extract apos din *Asclepias syriaca* (semnificația notațiilor vezi Anexa I);

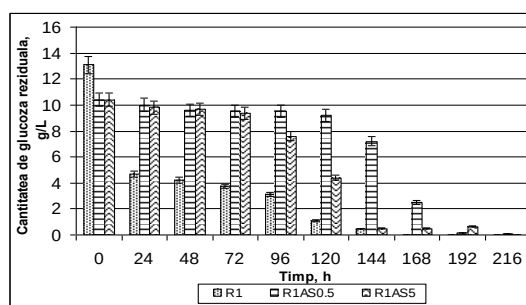


Fig. V. 7. Variația cantității de glucoză reziduală pe parcursul fermentației condusă în extract apos din *Asclepias syriaca*, (semnificația notațiilor vezi Anexa I);

Dacă se urmărește variația concentrației de glucoză din mediul de cultură se pot identifica situațiile în care a rezultat o cantitate maximă de biomasă, ceea ce este în concordanță cu consumul acestei surse.

Datele prezentate în Fig. V.7. evidențiază că drojdia consumă în mod diferit glucoza în funcție de condițiile de cultură. Astfel, în cazul culturii martor se observă epuizarea completă a glucozei la sfârșitul procesului, având în vedere că nu există o altă sursă de energie. Pentru culturile conduse în prezența extractelor apoase care conțin compuși polifenolici, metabolizarea glucozei are loc cu o viteză mai redusă. Diferențele în cantitatea de biomasă pot fi explicate astfel prin modul diferit de consum al glucozei (Hainal A.R. și colab., 2009c). În prima perioadă de până la 72 de ore nu se constată diferențe semnificative în evoluția concentrației acesteia. În situația în care s-a folosit extract diluat, se înregistrează un consum lent al glucozei comparativ cu martorul, acest lucru fiind pus pe seama faptului

că, prezența unor compuși în extract inhibă creșterea tulpinilor de drojdii, obținându-se totodată o cantitate scăzută de biomasă. Se poate observa că după 144 de ore, în mediu mai există încă aproximativ 7 g/L glucoză din cele 15 g/L introduse inițial. Fermentația condusă în extractul concentrat, pentru care s-au obținut cantitățile cele mai ridicate în biomasă umedă, prezintă în mediul de cultură după 144 de ore o concentrație foarte scăzută în sursă de carbon (aproximativ 1 g/L) (Fig. V.7.).

Conform datelor de literatură compușii polifenolici ar putea reprezenta surse de carbon pentru drojdii. Aceasta ipoteză a fost confirmată urmărind evoluția conținutului acestora pe parcursul proceselor fermentative. Datele obținute evidențiază faptul că procentul acestor compuși naturali organici degradați de către tulpina de drojdie R2 este mai ridicat comparativ cu tulpina R1 (Fig. V.10.). Astfel, se confirmă că polifenolii sunt utilizați ca sursă de carbon în creșterea microbiană (Hainal A. R. și colab., 2009c), această tulpină degradând până la sfârșitul procesului aproximativ 20% din cantitatea totală a compușilor polifenolici existenți în mediul de cultură (Fig. V.10.).

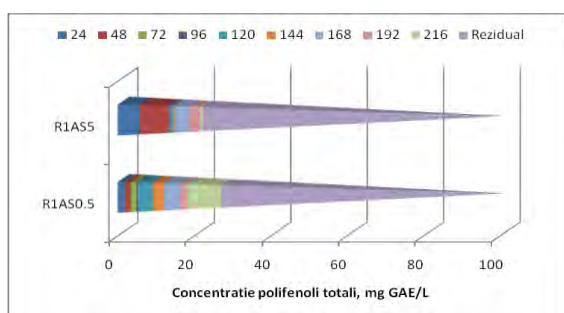


Fig. V.10. Variația concentrației în polifenoli totali pe parcursul procesului fermentativ condus în extract apos din *Asclepias syriaca*, (semnificația notațiilor vezi Anexa I);

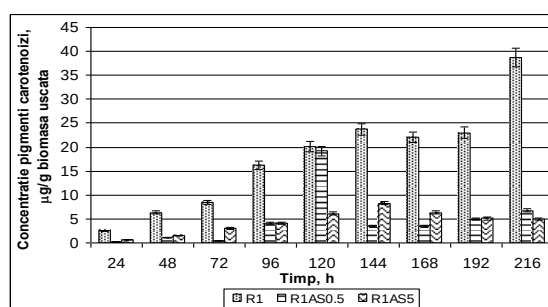


Fig. V.20. Variația concentrației în pigmenți carotenoizi pe parcursul experimentului condus în extract din *Asclepias syriaca*, A) – Tulpina R1; B) – Tulpina R2 (semnificația notațiilor vezi Anexa I);

Microorganismele folosite în acest studiu se caracterizează prin capacitatea lor de a biosintetiza pigmenți carotenoizi. În Fig. V.20. este prezentată variația concentrației pigmenților carotenoizi totali determinați din biomasă produsă de specia R1. Atunci când drojdiile sunt cultivate în mediul preparat în extract apos din *Asclepias syriaca* s-a constatat că prezența polifenolilor influențează negativ biosinteza pigmenților carotenoizi. Acest fapt nu se corelează însă cu cantitatea ridicată de polifenoli degradați de către această specie (Fig. V.10.), dar este responsabil pentru obținerea randamentului în biomasă umedă care înregistrează valori ridicate în prezența extractului concentrat (Fig. V.2.). Se poate presupune că polifenolii existenți în mediul de cultură manifestă efect favorabil doar asupra biosintezei de biomasă umedă, având rolul unei surse metabolizabile de carbon. O concentrație maximă în pigmenți carotenoizi este înregistrată pentru fermentația condusă în extract diluat (53,47 mgGAE/L) și ajunge la aproximativ 20 μg/g biomasă uscată.

V.3.2.3. Influența extractelor apoase din semințe de *Vitis vinifera* asupra dezvoltării celor două tulpini de drojdii

Dănăilă M. și colab., (2007a), au testat în cazul drojdiei *Rhodotorula glutinis* 9.3 un extract separat cu etanol din semințe de *Vitis vinifera*. Autorii citați au folosit extractul în diferite concentrații în mediul de cultură pentru a studia influența acestuia asupra dezvoltării biomasei și biosintezei de pigmenți carotenoizi. În urma cercetărilor s-a stabilit că, acest extract poate fi folosit ca sursă suplimentară de carbon pentru creșterea acestor drojdii, constatându-se dezvoltarea cantități de biomasă umedă și uscată în cazul culturilor ce conțin diferite concentrații de polifenoli. Acest lucru este valabil doar pentru anumite concentrații

ale acestor compuși naturali, deoarece odată cu depășirea concentrației de 8 g/L aceștia devin toxici pentru tulpina studiată.

Când în mediile de cultură a celor două tulpini de drojdie *Rhodotorula mucilaginosa*. utilizate în experimentele proprii s-au folosit extracte apoase din semințe de *Vitis vinifera*, s-a observat un efect stimulator asupra dezvoltării microorganismelor apreciată prin biomasa umedă.

Acest efect stimulator a fost înregistrat pentru tulpina R1 în cazul utilizării extractelor diluate, cu o concentrație în compuși polifenolici de 69,19 mg GAE /L (Fig. V.6.). În această situație se pot observa valori superioare matorului după 144 de ore de fermentație (36 g/L biomasa uscată). Se poate constata de asemenea, că în primele ore ale fermentației microorganismul prezintă o activitate redusă în mediul de cultură producând cantități foarte reduse de biomasa, după care, odată ce metabolismul drojdiei este activat se intensifică procesul de biosinteză rezultând un randament ridicat în biomasa la sfârșitul procesului fermentativ.

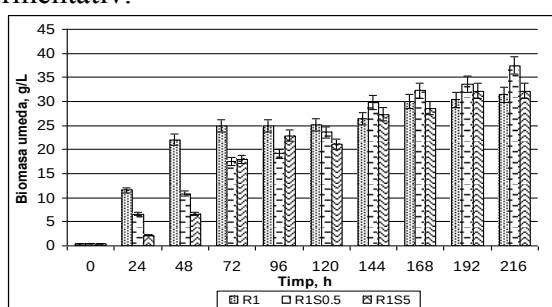


Fig. V. 6. Variația cantității de biomasa pe parcursul procesului fermentativ condus în extract din semințe de *Vitis vinifera*, (semnificația notațiilor vezi Anexa I);

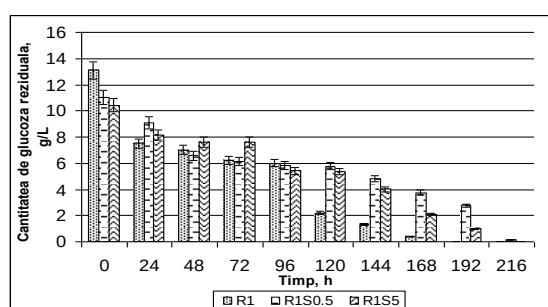


Fig. V.9. Variația cantității de glucoză reziduală pe parcursul fermentației condusă în extracte apoase separate din semințe din *Vitis vinifera*, (semnificația notațiilor vezi Anexa I);

În ceea ce privește utilizarea glucozei ca sursă de carbon în prezența extractelor apoase din semințe de *Vitis vinifera* se poate spune că aceasta este consumată pentru furnizarea energiei necesară degradării compușilor polifenolici existenți în mediu. Această afirmație se bazează pe faptul că randamentul în biomasa este superior celui înregistrat în cazul probei martor (Fig. V.6.), în timp ce cantitatea de glucoză consumată este mult mai mică comparativ cu ceea ce se întâmplă în cultura de referință (Fig. V.9.).

În ceea ce privește extractele apoase din semințe de *Vitis vinifera* în mediul de cultură, se poate observa faptul că, în cazul probelor mai diluate (69,19 mgGAE /L) cantitatea de polifenoli utilizați ca sursă de energie este mai ridicată. Extractele cu o concentrație mai mare în compuși polifenolici (143,39 mg/L GAE) manifestă un caracter stimulator de creștere în biomasa umedă produsă de cele două tulpini (Fig. V.6.). Cu toate acestea, există diferențe privind metabolismul celor două specii de drojdii. Astfel, tulpina R1 biosintetizează o cantitate mai ridicată în biomasa umedă în prezența acestor extracte (Fig. V.6.A) și acest lucru se corelează cu procentul polifenolilor utilizați ca sursă de carbon, și anume 40% (Fig. V.14.A).

Prin urmare, polifenolii prezenți în aceste extracte prezintă un caracter stimulator de creștere și în același timp sunt consumați de către drojdii ca sursă de carbon (Hainal A. R., și colab., 2010b).

În ceea ce privește conținutul în pigmenți carotenoizi în cazul folosirii extractelor apoase din semințe de *Vitis vinifera* în mediile de cultură, se poate observa că acești compuși polifenolici manifestă efecte deosebite asupra celor două tulpini de drojdii. Tulpina R1 este avantajată din acest punct de vedere oferind valori superioare ale concentrației carotenilor biosintetizați comparativ cu probele de referință. Pentru fermentația condusă în mediul de

cultură cu un conținut al compușilor polifenolici de 69,19 mgGAE /L, biosinteza carotenilor este favorizată astfel că la finalul procesului rezultă aproximativ 23 μg/g biomasă uscată.

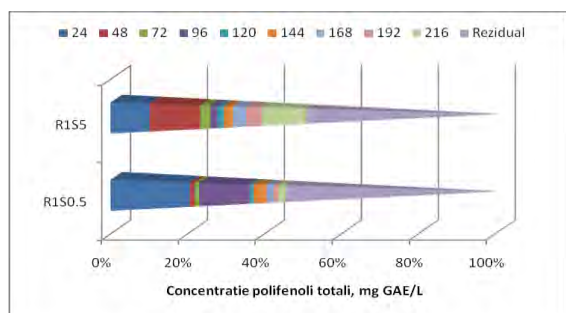


Fig. V.14. Variația concentrației în polifenoli totali pe parcursul procesului fermentativ condus în extract apos din semințe de *Vitis vinifera*, (semnificația notațiilor vezi Anexa I);

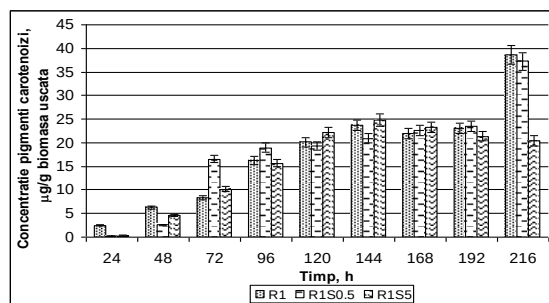


Fig. V.24. Variația concentrației în pigmenți carotenoizi pe parcursul procesului realizat în extracte apoase din semințe de *Vitis vinifera*, A) – Tulpina R1; B) – Tulpina R2 (semnificația notațiilor vezi Anexa I);

Acest fapt este în concordanță cu concentrația de polifenoli degradată de enzimele acestei tulpini (Fig. V.14.). În prezența extractelor cu un conținut mai ridicat în compuși polifenolici (143,39 mgGAE /L), biosinteza pigmentilor este stimulată după a cincea zi de cultură. O valoare maximă în pigmenți carotenoizi separați din biomasa recoltată se înregistrează după 144 de ore, comparativ cu referința, iar valoarea concentrației în pigment este de aproximativ 25 μg/g biomasă uscată (Fig. V.24.).

Capitolul VI - Modelarea procesului de biosinteză a biomasei și a pigmentilor carotenoizi folosind speciile de drojdii *Rhodotorula mucilaginosa* cultivate în extracte vegetale

VI.1. Oportunitatea abordării temei de cercetare

Având în vedere obținerea unor cantități semnificative de biomasă umedă și de pigmenți carotenoizi folosind cele două tulpini de drojdii *Rhodotorula mucilaginosa* cultivate în medii care conțin extracte apoase din cele trei materiale vegetale s-a urmărit optimizarea acestor procese în scopul obținerii unor randamente maxime.

VI.3. Rezultate și discuții

VI.3.1. Modelarea și optimizarea procesului de biosinteză a biomasei folosind două tulpini de drojdii *Rhodotorula mucilaginosa*, cultivate în medii ce conțin diferite extracte apoase din materiale vegetale

VI.3.1.1.2.1. Modelarea procesului de cultivare celor două tulpini de drojdii în mediul ce conține extracte apoase din *Asclepias syriaca*

Procesul notat cu R1AS5 este redat prin ecuația:

$$y_{R1AS5} = 0,3435 - 1,1155 \cdot x + 0,1546 \cdot x^2 - 0,0050 \cdot x^3 + 8,0990 \cdot 10^{-5} \cdot x^4 - 7,2683 \cdot 10^{-7} \cdot x^5 + 3,7112 \cdot 10^{-9} \cdot x^6 - 1,0057 \cdot 10^{-11} \cdot x^7 + 1,1215 \cdot 10^{-14} \cdot x^8$$

iar eroarea standard calculată pentru acest proces este de 1,0061 și coeficientul de corelație 0,9997.

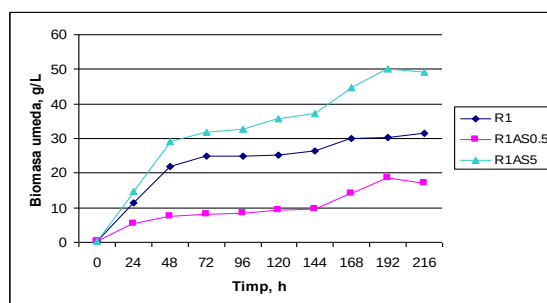


Fig. VI.1. Evoluția proceselor fermentative în medii de cultură ce conțin extracte apoase din *Asclepias siriaca* comparativ cu cultura de referință (semnificația notațiilor vezi Anexa I);

VI.4. Rezultatele optimizării procesului de obținere a biomasei umede folosind cele două tulpini de drojdie *Rodotorula mucilaginosa* cultivate în diferite medii de cultură

VI.4.2.2. Rezultate obținute

Astfel, în Tabelul VI.2. sunt prezentate valorile optime calculate în urma procesului de optimizare a randamentului în biomasă umedă, alături de valorile optime rezultate experimental ca urmare a aplicării condițiilor stabilite. De asemenea, sunt sistematizate valorile coeficienților de corelație și a erorilor standard pentru fiecare ecuație stabilită.

Tabelul VI.2.

Sistematizarea datelor rezultate din procesului de optimizare privind biomasa umedă
(semnificația notațiilor vezi Legenda I)

Proba	Coeficient de corelație	Eroarea standard	Restricția	Optim _{calc.}		Optim _{experim.}	
				Timp	Biomasă umedă, g/L	Timp	Biomasă umedă, g/L
R1	0,9996	0,4704	T < 210	210	30,6524	-	-
			T < 216	216	31,3991	-	-
			T < 220	220	32,2332	220	31,9852
R1AS0.5	0,9990	0,4155	T < 210	202,38	19,6112	210	19,4569
			T < 216	202,38	19,6112	-	-
			T < 220	202,38	19,6112	-	-
R1AS5	0,9997	1,0061	T < 210	192,01	50,0486	210	49,9547
			T < 216	216	49,2457	-	-
			T < 220	220	52,6255	-	-
R2	0,9994	0,7202	T ≤ 210	210	32,3782	-	-
			T ≤ 216	216	34,0732	-	-
			T ≤ 220	220	35,2674	220	35,0657
R2AS0.5	0,9993	1,0525	T ≤ 210	210,9	28,224	210	28,019
			T ≤ 216	210,9	28,224	-	-
			T ≤ 220	210,9	28,224	-	-
R2AS5	0,9997	0,7900	T ≤ 210	195	37,769	195	37,658
			T ≤ 216	195	37,769	-	-
			T ≤ 220	195	37,769	-	-
R1S0.5	0,9999	0,3993	T ≤ 210	211	38,893	211	38,746
			T ≤ 216	211	38,893	--	-
			T ≤ 220	211	38,893	-	-
R1S5	0,9999	0,3449	T ≤ 210	207	37,563	207	37,458
			T ≤ 216	207	37,563	-	-
			T ≤ 220	207	37,563	-	-
R2S0.5	0,9985	0,9044	T ≤ 210	133,79	26,6237	134	26,6325
			T ≤ 216	133,79	26,6237	-	-
			T ≤ 220	133,79	26,6237	-	-
R2S5	0,9952	1,5196	T ≤ 210	147,50	31,997	148	32,0058
			T ≤ 216	147,50	31,997	-	-
			T ≤ 220	147,50	31,997	-	-
R1M0.5	0,9999	0,2987	T ≤ 210	173,99	32,9156	174	32,9587
			T ≤ 216	173,99	32,9156	-	-
			T ≤ 220	173,99	32,9156	-	-
R1M5	0,9999	0,4320	T ≤ 210	220	47,8229	220	47,4596
			T ≤ 216	220	47,8229	-	-
			T ≤ 220	220	47,8229	-	-
R2M0.5	0,9994	0,7305	T ≤ 210	153,29	31,6733	154	31,5248
			T ≤ 216	153,29	31,6733	-	-
			T ≤ 220	153,29	31,6733	-	-
R2M5	0,9977	1,2974	T ≤ 210	116,11	38,0667	116	37,8862
			T ≤ 216	116,11	38,0667	-	-
			T ≤ 220	116,11	38,0667	-	-
R1'AS0.5	0,9996	0,5200	T ≤ 210	53,61	20,0748	54,0	20,1
			T ≤ 216	53,61	20,0748	-	-
			T ≤ 220	53,61	20,0748	-	-
			T ≤ 210	79,79	24,3488	80,0	24,4

R1'AS5	0,9998	0,3868	T ≤ 216	79,79	24,3488	-	-
			T ≤ 220	79,79	24,3488	-	-
R2'AS0.5	0,9998	0,2281	T ≤ 210	127,24	16,7802	127,30	16,72
			T ≤ 216	127,24	16,7802	-	-
			T ≤ 220	127,24	16,7802	-	-
R2'AS5	0,9972	0,7669	T ≤ 210	130,73	20,0937	131,0	20,10
			T ≤ 216	130,73	20,0937	-	-
			T ≤ 220	130,73	20,0937	-	-
R1'M0.5	0,9999	0,1366	T ≤ 210	133,27	21,6206	133,30	21,64
			T ≤ 216	133,27	21,6206	-	-
			T ≤ 220	133,27	21,6206	-	-
R1'M5	0,9999	0,1144	T ≤ 210	114,91	17,6651	115,0	17,71
			T ≤ 216	114,91	17,6651	-	-
			T ≤ 220	114,91	17,6651	-	-
R2'M0.5	0,9993	0,7506	T ≤ 210	208	22,519	208,0	22,50
			T ≤ 216	208	22,519	-	-
			T ≤ 220	208	22,519	-	-
R2'M5	0,9999	0,0641	T ≤ 210	101,32	21,5977	101,30	21,60
			T ≤ 216	101,32	21,5977	-	-
			T ≤ 220	101,32	21,5977	-	-

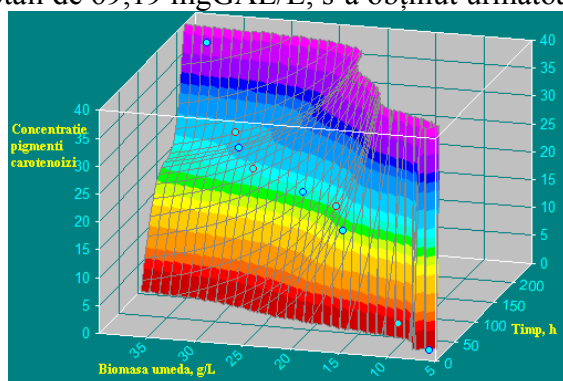
Din aceste date rezultă că pentru obținerea unui randament maxim în biomasă umedă cea mai avantajoasă varianta este cea în care se cultivă tulpina notată R1 în mediul de cultură preparat în extract din *Asclepias syriaca* cu o concentrație în polifenoli totali de 112,93 mgGAE/L, echivalentă cu cea separată din 5 g material vegetal (50 g/L biomasă umedă la 192 h de cultură).

VI.5. Modelarea și optimizarea procesului de obținere a pigmentilor carotenoizi folosind două tulpini de drojdie *Rhodotorula mucilaginosa* cultivate în medii ce conțin extracte apoase din diferite materiale vegetale

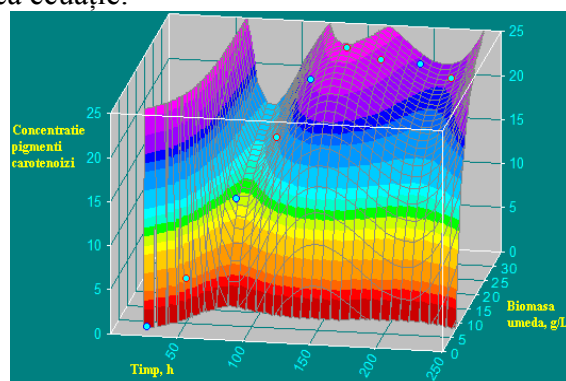
VI.5.1. Modelarea proceselor de obținere a pigmentilor carotenoizi

VI.5.1.6. Modelarea proceselor de biosinteză a pigmentilor carotenoizi pentru culturile în extracte apoase din semințe de *Vitis vinifera*

În cazul modelării procesului de biosinteză a pigmentilor carotenoizi prin cultivarea tulpinii R1 în extract apos din semințe de *Vitis vinifera* cu un conținut în compuși polifenolici totali de 69,19 mgGAE/L, s-a obținut următoarea ecuație:



A - R1S0.5



B - R1S5

Fig. VI.11. Evoluția proceselor de cultivare a tulpinelor R1 și R2 în mediul de cultură ce conține extracte apoase din semințe de *Vitis vinifera* (semnificația notațiilor vezi Anexa I) (Concentrația pigmentilor carotenoizi este exprimată în $\mu\text{g pigment/g biomasă uscată}$);

$$z_{R1S0.5} = -953289 - 21821.2x - 4038.55x \ln x + 210.867x^{1.5} - 147002x^{0.5} \ln x + \frac{5221983x}{\ln x} + 21465.87x^{0.5} + \frac{10998.27}{y^2}$$

care prezintă un coeficient de corelație de 0,9999 și o eroare standard calculată de 0,2788 (Fig. VI.11.A).

VI.5.2.Optimizarea procesului de obținere a pigmentilor carotenoizi

Optimizarea procesului notat R1S0.5 a permis obținerea unei concentrații a pigmentilor carotenoizi de 37,441 μg/g biomasă uscată pentru o durată de cultură de 216 ore. Efectuarea experimentului în condițiile stabilite a condus la o valoare a concentrației în pigmenti de 37,242 μg/g biomasă uscată confirmând rezultatele studiului de optimizare. Astfel, s-a realizat analiza optimului calculat prin normalizarea intervalului de timp în domeniul 192-216 ore și a cantității de biomasă umedă în intervalul 33,586-37,448 g/L. Rezultatele obținute prin simulare și prezentate în Fig. VI.17. (A și B) arată că la sfârșitul procesului se poate obține cantitatea maximă de pigment pentru o durată de cultură de 216 h, care asigură un randament în biomasă de 37 g/L.

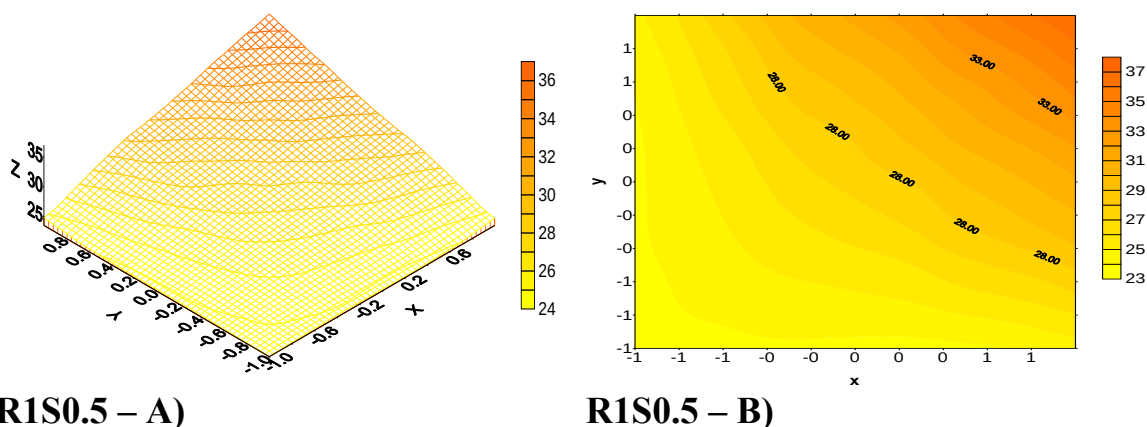


Fig. VI.17. Diagramele procesului de normalizare pentru optimizarea obținerii de pigment carotenoid prin cultivarea drojdiei R1 în mediul ce conține extracte apoase din semințe de *Vitis vinifera* (semnificația notațiilor vezi Anexa I);

Capitolul VII - Transformarea unor produse ligninice sub acțiunea drojdiilor din genul *Rhodotorula mucilaginosa*

VII.1. Oportunitatea abordării temei de cercetare

Lignina este unul dintre componenții aromatici principali caracteristici plantelor superioare. La nivel mondial, aceasta rezultă de la fabricarea celulozei sau din tehnologiile de hidroliză a biomasei vegetale și poate fi considerată o materie primă cu potențial ridicat de valorificare, ca urmare a provenienței sale din resurse regenerabile și datorită unui preț redus. (Căpraru M., 2010). Datorită structurii sale complexe, doar câteva tipuri de microorganisme sunt capabile să degradeze lignina. Biodegradarea macromoleculei de lignină se realizează sub acțiunea enzimelor extracelulare nespecifice, și anume, peroxidaza ligninei, peroxidaza manganului și lacaza.

Cu toate că în literatură sunt prezentate câteva specii de drojdii care degradează monomerii ligninei, cum ar fi *Rhodotorula graminis*, *Candida ingeniosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, această clasă de microorganisme nu este considerată a fi capabilă să acționeze asupra structurii macromoleculei de lignină. Sunt puține informații privind interacțiunea drojdiilor cu lignina. Cu toate acestea, studiile realizate de Slavikova E. și Kosikova B. în 2001 relatează schimbări în structura ligninei cauzate de sistemele enzimatice ale drojdiei

Geotrichum klebahnii, care produce scindări oxidative la nivelul legaturii Ca-C β dintre unitățile componente ale ligninei din lemnul de fag (Slavikova E., Kosikova B. 2001).

Pentru a investiga capacitatea drojdiilor din genul *Rhodotorula* privind utilizarea ligninelor ca sursă de carbon, s-au testat diferite produse izolate din iarbă și din paie de grâu în soluții cu concentrații diferite asupra randamentului în biomasă și biosintezei pigmentilor carotenoizi. De asemenea, s-au evaluat modificările suferite de polimerul aromatic sub acțiunea sistemelor enzimactice extracelulare folosind spectroscopia în IR.

VII.2. Materiale și metode utilizate

VII.2.1. Materiale

VII.2.1.2. Lignine

Ligninele au fost oferite în cadrul programului european Ecobinders (FP 6), de firma Granit Recherché Développement S.A. Lausanne din Elveția și sunt reprezentate de lignine reziduale separate din procesul de dezincrustare alcalină a unor plante anuale: paie de grâu - wheat straw (L1) și iarbă - *Sarkanda grass* (L2).

VII.2.2. Metode

Pentru efectuarea experimentelor, s-au preparat suspensii din cele două probe de lignină L1 și L2 cu diferite concentrații. Aceste suspensii au fost folosite pentru obținerea mediilor de cultură, care s-au sterilizat, și repartizat în flacoanele Erlenmeyer pentru inoculare și cultivare. Etapele experimentale sunt prezentate în Fig. VII.1.

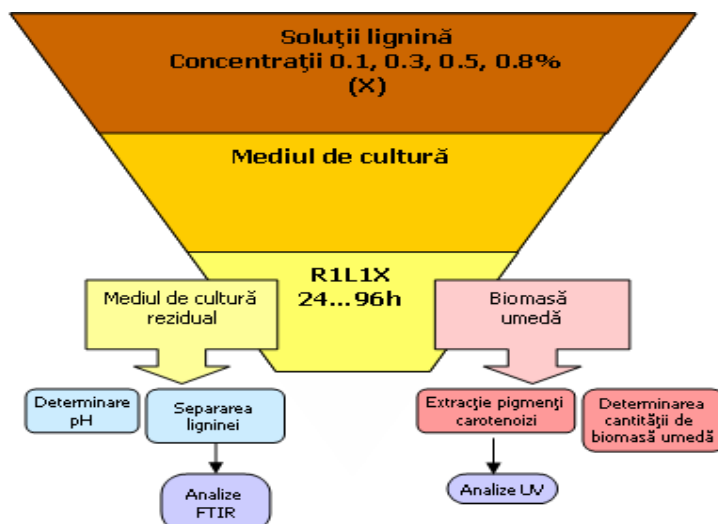


Fig. VII.1. Etapele experimentale

VII.2.2.1.2. Obținerea mediului de cultură

Mediul de cultură pentru cultivarea celor două tulpini de drojdie are următoarea compoziție chimică: 1 g/L glucoză (Gupta J.K. și colab., 1990), 5 g/L KH₂PO₄ (Huang Z. și colab., 1993), 1 g/L (NH₄)₂SO₄ (Narbad A. și Gasson M. J., 1998), 0,05 g/L MgSO₄ · 7H₂O (Narbad A. și Gasson M. J., 1998), 5 g/L extract de drojdie (Huang Z. și colab., 1993). Pentru corectarea pH-ului se utilizează HCl 6N, (Huang Z. și colab., 1993), sau NaOH 0,1N. Componentele mediului de cultură s-au dizolvat în soluția de lignină cu concentrațiile precizate anterior după care a urmat sterilizarea la 110°C, timp de 20 de minute. După sterilizare, mediul s-a repartizat (100 mL) în flacoane Erlenmeyer, cu volumul de 250 mL și inoculate după procedeul descris anterior (Hainal A. R. și colab., 2010b). Cultivarea s-a extins pentru o perioadă de 4 zile. La intervale de 24 de ore s-au luat probe și s-au cuantificat cantitatea de biomasă umedă și pH-ul. La finalul fiecărui experiment, lignina nedegradată a fost recuperată din mediul de cultură epuizat și pregătită pentru a fi caracterizată prin spectroscopie FT-IR.

VII.2.2.6. Caracterizarea ligninelor prin spectroscopie FT-IR

Spectroscopia FTIR poate fi folosită pentru a urmări modificările funcționale care apar în structura macromoleculei de lignină în raport cu probele inițiale. Spectrele au fost înregistrate în pastilă de KBr, în proporție de 1:200, folosind un spectrometru *Digilab-Excalibur FTS 2000*. Parametrii de lucru au fost: domeniul spectral 4000 - 400 cm^{-1} , rezoluția 4 cm^{-1} și numărul de scanări de 20. Spectrele FT-IR s-au prelucrat cu ajutorul unui program specializat din seria *SpectraManager*.

VII.3. Rezultate și discuții

VII.3.1. Influența naturii ligninelor asupra randamentului în biomasă umedă

Drojdiiile din genul *Rhodotorula mucilaginosa* au capacitatea de a asimila compuși aromatici cum ar fi acizii vanilic, ferulic, protocatehic și L-malic, sau polifenoli din diferite surse vegetale (Hainal A. R. și colab., 2011b)

Acești compuși cu structură aromatică (Libkind D. și colab., 2004) sunt de regulă asociați cu degradarea ligninei (ex. acizii vanilic și galic), din materialele vegetale.

În Fig. VII. 2 se poate observa variația cantității de biomasă umedă rezultată prin cultivarea tulpinii R1 în soluțiile ligninei L1 prezentă în concentrații diferite. Din datele obținute se poate constata că la concentrații reduse în lignină din paie de grâu, se înregistrează un randament mai scăzut în biomasă umedă comparativ cu situația în care se utilizează concentrații mai ridicate. Cea mai bună producție în biomasă umedă (21 g /L) se obține pentru culturile conduse în medii care conțin 0,8% lignină L1. Aceste condiții sunt comparabile cu cele din cazul în care s-a utilizat glucoza (R1M) ca sursă de carbon și pentru care a rezultat o cantitate de biomasă umedă de 25 g/L.

La o concentrație de 0,1% lignină L1 se constată o evoluție lentă a tulpinii R1 în primele 48 de ore de fermentație. Creșterea microorganismelor se observă după 72 de ore, când randamentul în biomasă atinge o valoare maximă. Pentru cazurile când s-au utilizat concentrații de 0,3 și 0,5 %, se obțin randamente de biomasă umedă care ating valori ridicate la sfârșitul experimentului și care sunt de aproximativ 17 respectiv 16 g/L.

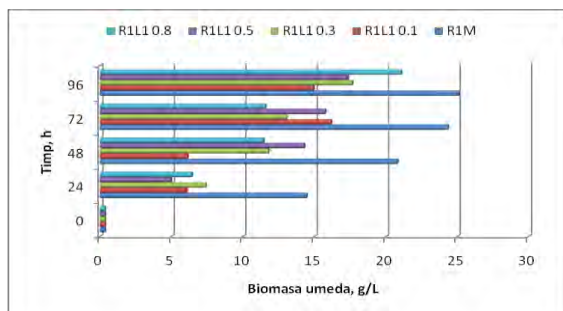


Fig. VII. 2. Variația cantității de biomasă umedă rezultată prin cultivarea tulpinii R1 în soluție de lignină L1 prezentă în diferite concentrații comparativ cu referința (semnificația notațiilor vezi Anexa III);

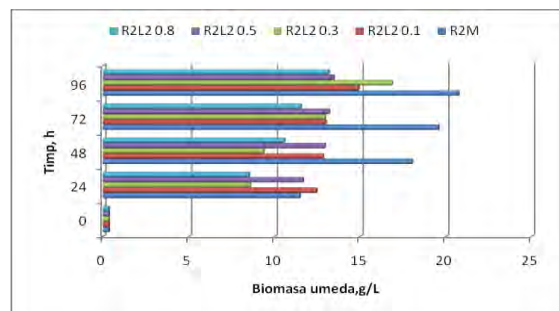


Fig. VII. 5. Variația cantității de biomasă umedă pentru tulpina R2 cultivată în soluție de lignină din iarbă L2 prezentă în diferite concentrații comparativ cu referința (semnificația notațiilor vezi Anexa III);

În Fig. VII. 5 sunt evidențiate rezultatele înregistrate în cazul cultivării tulpinii R2 în mediul de cultură în care s-au dizolvat diferite cantități de lignină din iarbă (L2) comparativ cu proba martor, cultivată în prezența glucozei. De asemenea, și în acest caz se manifestă particularitățile structurale ale ligninei. Astfel, microorganismul evoluează mai rapid la concentrații mai reduse în lignină (0,1 %) obținându-se cantități de biomasă umedă superioare referinței în primele zile de fermentație. Ulterior, diferențele se atenuează, pentru ca în final randamentele maxime în biomasă să se situeze în domeniul concentrațiilor scăzute ale ligninei (0,1 și respectiv 0,3 %), diferența față de proba de referință încadrându-se în intervalul 6 - 4 g/L. De asemenea, pentru această tulpină de drojdie, prezența în mediul de cultură a ligninelor din iarbă prezintă un efect slab de inhibare asupra biosintezei de biomasă.

VII.3.2. Influența prezenței produselor ligninice în mediul de cultură asupra variației pH-ului

Introducerea ligninei din paie de grâu în mediul de cultură al drojdiei R1 nu influențează semnificativ variația pH-ului pe parcursul fermentației (Fig. VII. 6), acesta înregistrând variații între 6 și 5. O ușoară scădere a pH-ului ar putea fi asociată cu formarea unor produse de degradare a ligninei și care ulterior sunt metabolizate, valoarea acestuia revenind la 6 către sfârșitul experimentului.

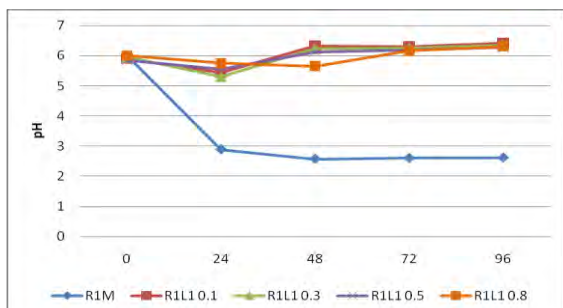


Fig. VII. 6. Variația pH-ului pe parcursul procesului fermentativ al tulpinii R1 în soluții de lignină L1 prezentă în diferite concentrații, comparativ cu referința (semnificația notațiilor vezi Anexa III);

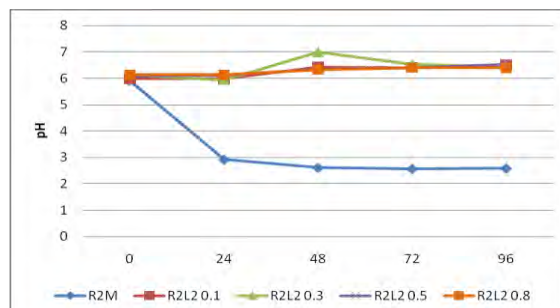


Fig. VII. 9. Variația pH-ului pe parcursul procesului fermentativ al tulpinii R2 în soluție de lignină L2 prezentă în diferite concentrații comparativ cu referința (semnificația notațiilor vezi Anexa III);

În cazul folosirii ligninei din iarbă în mediul de cultură al tulpinii R2, se înregistrează o creștere a pH-ului după 48 de ore la o concentrație de 0,3 % în polimer aromatic. Ulterior, valoarea pH-ului se menține în aceleași limite pentru toate variantele de cultură. De asemenea, și în cazul tulpinii R2 cultivată în mediul de cultură ce conține lignina L2, valoarea pH-ului este superioară referinței (Fig. VII. 9).

VII.3.3. Influența prezenței produselor ligninice asupra biosintezei de pigmenți carotenoizi

Biosinteza diferiților carotenoizi de către drojdiile roșii au recomandat aceste microorganisme ca o sursă potențială de pigmenți determinând un interes imens pentru cercetările biotehnologice (Libkind D. și colab., 2004) având în vedere dependența compoziției cantitative și calitative a pigmenților carotenoizi de specie, substrat și condițiile de creștere folosite.

Datele obținute în acest studiu au evidențiat condițiile în care lignina poate constitui sursă de carbon pentru cele două specii de drojdii în biosinteza pigmenților carotenoizi. Astfel, s-a constatat (Fig. VII. 10) că tulpina R1 cultivată într-un mediu ce conține lignină L1 produce o biomasă cu un conținut ridicat în pigmenți, pentru o concentrație a polimerului aromatic de 0,5 %.

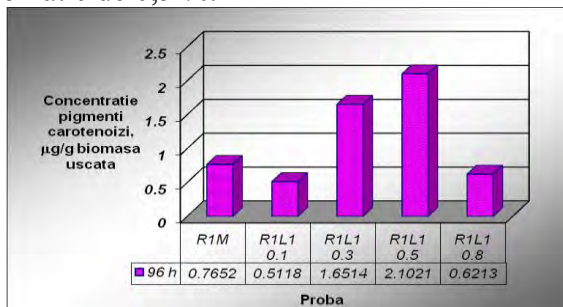


Fig. VII. 10. Variația concentrației pigmenților carotenoizi în biomasa obținută prin cultivarea drojdiei R1 pe substratul ligninic L1, prezentă în diferite concentrații, comparativ cu referința după 96 de ore (semnificația notațiilor vezi Anexa III);

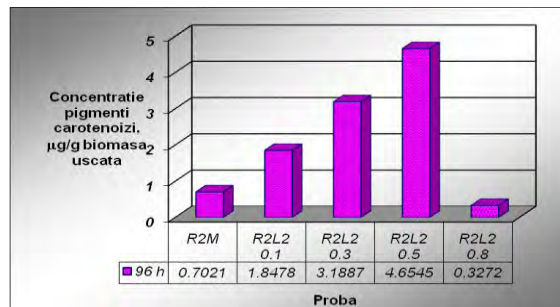


Fig. VII. 13. Variația concentrației pigmenților carotenoizi în biomasa obținută prin cultivarea tulpinei R2 pe substratul ligninic L2, prezentă în diferite concentrații, comparativ cu referința după 96 de ore (semnificația notațiilor vezi Anexa III);

În acest caz s-au obținut valori mai ridicate (2,10 $\mu\text{g/g}$ biomasă uscată) decât în cazul probei de referință pentru care valoarea concentrației pigmenților extrași a fost de 0,76 $\mu\text{g/g}$ biomasă uscată. Prin urmare, cele două procese de biosinteză a biomasei și pigmenților se desfășoară pe căi diferite, ceea ce poate explica deosebirea constatată în evoluția celor doi indicatori în funcție de concentrația ligninei.

Tulpina R2 cultivată pe medii ce conține lignină din iarbă L2 biosintetizează cantități maxime de pigmenți la concentrația de 0,5 % a polimerului aromatic (4,6545 $\mu\text{g/g}$ biomasă uscată) (Fig. VII. 13). Ca și în celelalte situații condițiile de biosinteză a pigmenților carotenoizi sunt diferite de cele în care microorganismele produc biomasă (Fig. VII. 5). Concentrațiile ridicate ale ligninei (0,8 %) în mediul de cultură prezintă efecte puternice inhibitorii asupra biosintezei de pigmenți comparativ cu proba martor. Această situație ar putea fi corelată și cu capacitatea drojdiilor de a acumula pigmenții carotenoizi în faza de creștere exponențială și la începutul fazei staționare (Bhosale P. și Gadre R.V., 2001).

VII.3.4. Caracterizarea spectrală a produselor ligninice transformate în procesele fermentative

Spectrele FT-IR se înregistrează ca instrument analitic de evaluare calitativă a schimbărilor și modificărilor chimice și biochimice (Ozturk I., și colab., 2010), survenite în urma transformării ligninei prin tratamente care afectează structura acesteia. Comparativ cu analizele chimice convenționale, această tehnică necesită cantități mici de probe și un timp de analiză scurt (Chan H., și colab., 2010). Analiza ligninelor se poate realiza prin urmărirea intensității benzilor de absorbție date de numărul variat de grupe funcționale prezente în structura acestor compuși aromatici.

Astfel, în urma introducerii ligninelor în mediul de cultură, sistemele enzimatice proprii drojdiilor acționează asupra structurii acesteia. Pentru a observa modificările produse, s-au înregistrat spectrele FT-IR. În analiza acestor spectre, s-au urmărit modificările la nivelul grupelor hidroxil, carbonil, carboxil, metil, și chiar la nivelul structurilor benzenice, guaiacilice și siringilice.

Lignina din paie de grâu (L1) și cea din iarbă (L2) alese pentru testare s-au analizat din punct de vedere spectral folosind spectroscopia FT-IR. În Fig. VII. 14 se prezintă spectrul IR pentru lignina din paie de grâu (L1).

Din analiza spectrală se observă că în zona $3000\text{--}2846\text{ cm}^{-1}$ se întâlnesc vibrații caracteristice legăturilor C-H aromatice, alifatică și grupelor hidroxil fenolice. Lignina nemodificată prezintă o intensitate mai mare a picurilor în domeniul $1710\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, care se atribuie legăturilor eterice și grupelor carbonilice legate de nucleul aromatic. Domeniul $1700\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, constituie o zonă în care se întâlnesc absorbții corespunzătoare unităților structurale guaiacil și siringil cu substituții diferite.

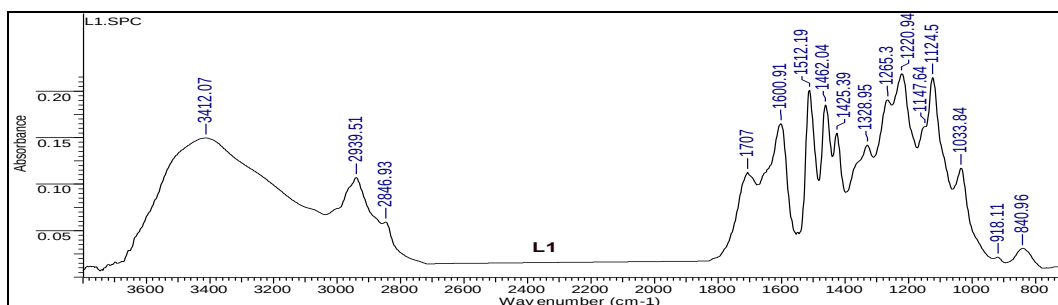
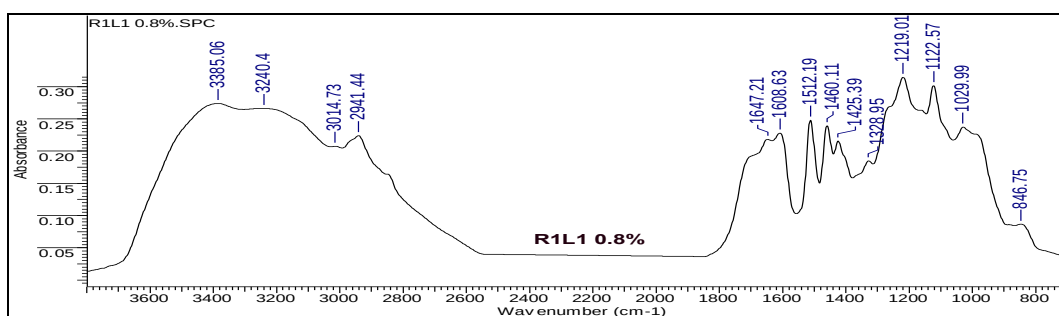


Fig. VII. 14. Spectrul FT-IR înregistrat pentru lignina din paie de grâu (L1);

În Anexa IV.b este prezentat spectrul FT-IR înregistrat pentru lignina recuperată din mediul epuizat rezultat în urma cultivării drojdiei R1 în prezența soluțiilor de lignină 0.8%. Banda de absorbție prezentă la 3400 cm^{-1} , este atribuită grupelor hidroxil fenolice și structurilor aromatice. Se poate observa din Fig. VII. 14, că intensitatea picului de absorbție

este diferită, comparativ cu cel al probelor de lignină recuperate din mediul de cultură a tulpinii R1. În cazul acestor probe, se observă că lărgimea picului de absorbție este mai mare, acesta scăzând în intensitate (Anexele IV.b), ceea ce poate constitui o dovadă pentru introducerea de grupe –OH la nivelul nucleelor aromatice. Domeniul $2835\text{--}2938\text{ cm}^{-1}$ (Sharma R.K., si colab., 2004, Yang X. si colab., 2010), constituie o zonă în care se întâlnesc absorbții corespunzătoare vibrației grupărilor metoxi legate de nucleul aromatic, grupări metil-alifatic și vibrații ale legăturilor –C-O- neconjugate specifice grupelor cetonice, carbonilice și eterice. Pentru proba martor de lignină L1 (Fig. VII. 14) se pot observa picurile foarte bine delimitate în acest interval. Pentru probele de lignină recuperate din mediul de cultură, acest domeniu este afectat, prin scăderea intensității picurilor, uneori constatându-se chiar dispariția acestora. Aceste observații ar putea fi corelate cu demetoxilarea nucleelor aromatice din structura ligninei de către sistemele enzimatice caracteristice tulpinii de drojdie R1, sau prin atacul asupra legăturii –C-O.



Anexa IV.b. Spectrul IR înregistrat pentru lignina din paie de grâu recuperată din mediul de cultură a experimentului notat R1L10,8%

La 1710 cm^{-1} se înregistrează absorbții caracteristice vibrațiilor de valență ale grupărilor carbonil și carboxil. La probele de lignină recuperată se observă modificări ale intensității acestor picuri, modificări care ar putea fi determinate de reacțiile de oxidare de către sistemele enzimatice ale drojdiei.

Domeniul $1500\text{--}1590\text{ cm}^{-1}$, corespunde vibrațiilor legăturilor –C=C- și –C-C- din nucleul aromatic. În Anexa IV.b, se observă modificări ale intensității picurilor în acest domeniu comparativ cu proba martor (L1). Aceste modificări au loc probabil datorită atacului sistemelor enzimatice ale drojdiei asupra nucleelor aromatice, având în vedere și datele de literatură (Higuchi T., 2004) conform cărora, enzimele sintetizate de aceste drojdii ar ataca nucleele aromatice din structura ligninei, hidroxilate anterior.

În domeniul de absorbție $1330\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$ se regăsesc vibrații ale unităților siringil și guaiacil prezente în structura ligninei în raport diferit, în funcție de specia de plantă, de modificările aduse în structura acesteia și de procedeul de obținere. Modificările la acest nivel apar probabil datorită transformărilor produselor la nivelul nucleelor aromatice sub acțiunea enzimelor microorganismului.

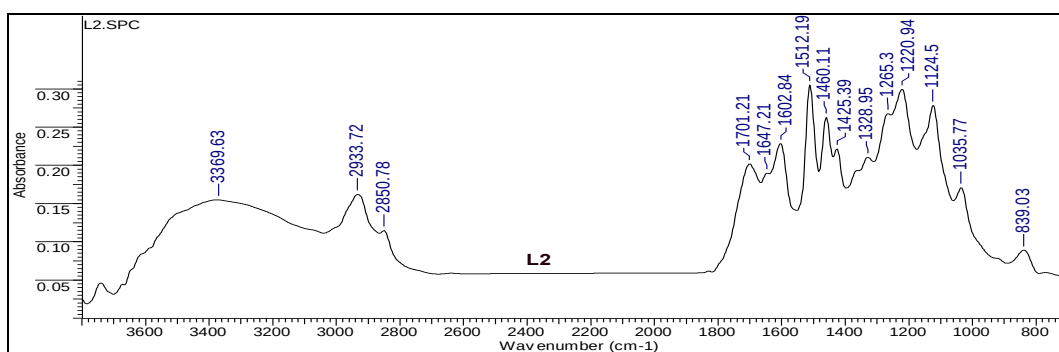


Fig. VII. 19. Spectrul FT-IR înregistrat pentru lignina din iarbă (L2) – martor;

Prezența benzilor de absorbție în domeniul $1300-900\text{ cm}^{-1}$ sunt considerate specifice legăturilor C-O din alcoolii secundari, esterice sau eterice, a legăturilor C-C, și deformației acestora. La nivelul acestor legături intervin diferite schimbări, astfel că benzile de absorbție scad sau cresc în intensitate, uneori chiar lipsind. Toate aceste modificări sunt caracteristice pentru o serie de reacții cum ar fi cele de oxidare, dehidrogenare și posibil de condensare între unitățile structurale din macromolecula de lignină.

În Fig. VII. 19 este prezentat spectrul IR pentru lignina din iarbă - *Sarkanda grass* (L2), care se caracterizează prin prezența unor benzi specifice grupelor -OH fenolice și structurilor alifactice din domeniul $3410-3460\text{ cm}^{-1}$ (Fig. VII. 19), benzi care prezintă o intensitate ridicată, comparativ cu spectrele ligninei separate din mediul de cultură, unde picul de absorbție lipsește (Fig. VII. 23).

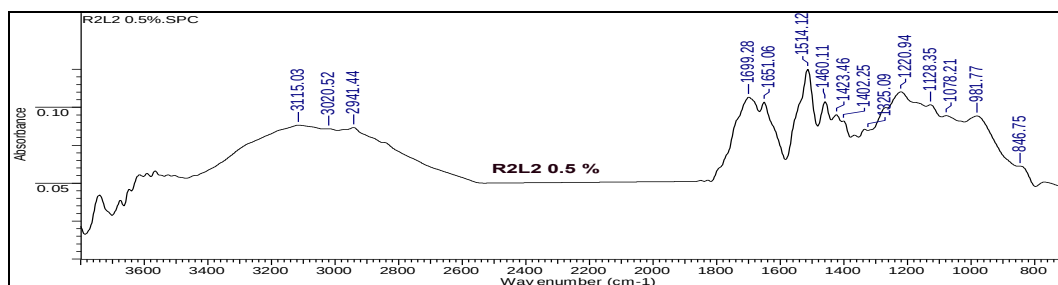


Fig. VII. 23. Spectrul IR înregistrat pentru lignina din iarbă recuperată din mediul de cultură rezidual propriu experimentului notat R2L2 0,5%

După cum se poate observa din Fig. VII. 23, sistemele enzimatice sintetizate de tulpina de drojdie R2 de asemenea modifică structura ligninei la nivelul diferitelor grupe și legături. De exemplu, picul din domeniul $3410-3460\text{ cm}^{-1}$, caracteristic vibrației grupelor hidroxil fenolice și structurilor alifactice suferă modificări ale intensității semnalelor de absorbție. Semnalele din domeniul $2840-2835\text{ cm}^{-1}$ sunt responsabile vibrațiilor legăturii -C-O neconjugate, specific grupelor cetone, carbonilice și eterice, iar în cazul celorlalte probe (Fig. VII. 23) acestea dispar. Acest lucru se realizează probabil, datorită sistemelor enzimatice sub acțiunea cărora are loc ruperea legăturilor -C-O din structura ligninei.

Domeniul cuprins în intervalul de absorbanță $1590-1740\text{ cm}^{-1}$ care este responsabil pentru vibrațiile legăturilor -C=O, suferă modificări în special prin intensificarea picurilor care se regăsesc în jurul valorii de 1600 cm^{-1} , caracteristice vibrației legăturilor conjugate -C=O de la nivelul grupele cetone și carbonilice.

După cum se poate observa din Fig. VII. 19, semnalul responsabil vibrației legăturilor din nucleul aromatic ($1505-1590\text{ cm}^{-1}$), este bine definit și prezintă o intensitate mare, pe când picurile specifice probelor de lignină separate din mediul de cultură prezintă semnale de intensitate redusă.

În domeniul $1270-1275\text{ cm}^{-1}$ se întâlnesc vibrații ale legăturii fenolice sau eterice, unde intensitatea semnalelor de absorbție se modifică în cazul probelor de lignină separate din mediul de cultură, (Fig. VII. 23), comparativ cu proba martor (Fig. VII. 19). Totodată, semnalele prezente în domeniul de absorbție $1126-1127\text{ cm}^{-1}$, atribuit vibrațiilor legăturii -C-H din inelul aromatic, caracteristic unităților siringilice, sau vibrațiilor specifice alungirii legăturii -C-O prezente la nivelul alcoolilor primari, și cel de la 1035 cm^{-1} , caracteristic deformației legăturilor -C-O, prezente la nivelul alcoolilor primari și legăturilor -C-H din planul inelului aromatic (Dizhbite T., și colab., 2011, Yang X. și colab., 2010), suferă modificări semnificative, prin scăderea intensităților acestora. Această scădere se poate explica prin faptul că la nivelul acestor grupe funcționale prezente în structura ligninei se pot produce oxidări ce duc la ruperea legăturilor chimice.

În concluzie se poate afirma că, în urma analizei spectrale a probelor de lignină nemodificate (L1 și L2) cât și a celor recuperate din mediul de cultură epuizat, s-au evidențiat

modificări semnificative la nivelul grupelor funcționale din structura ligninei determinate de drojdii.

Transformarea ligninelor sub acțiunea microorganismelor are ca rezultat formarea unor produse micromoleculare asimilabile de către acestea cu consecințe în biosinteza de biomasă și pigmenți carotenoizi. Spectrele FT-IR pot fi considerate semnificative pentru a evidenția modificările de funcționalitate, în majoritatea reacțiilor oxidative care determină eroziunea structurilor ligninice pentru a oferi sursă de carbon pentru microorganisme.

Capitolul VIII - Studii privind cultivarea drojdiilor *Rhodotorula mucilaginosa* sub influența unor factori de stres și în prezența produselor polifenolice

VIII.1. Oportunitatea abordării temei de cercetare

Substanțele chimice din compoziția unui mediu în care se dezvoltă microorganismele pot exercita, în funcție de natura și concentrația lor, trei efecte asupra acestora:

- favorizarea dezvoltării și multiplicării celulare prin aportul de substanțe nutritive și realizarea echilibrului fizico-chimic indispensabile vieții;
- blocarea potențial reversibilă a proceselor de multiplicare celulară, deci un efect microbiostatic;
- alterarea profundă și ireversibilă a unor procese metabolice esențiale, ceea ce reprezintă un efect microbicid (Dănăilă M., 2009).

În acest capitol s-a urmărit capacitatea de complexare a compușilor polifenolici separați din diferite materiale vegetale reziduale cu ioni de cupru disociați din sulfatul de cupru. În acest sens s-a analizat complexarea acestui metal greu, prezent frecvent în sol, urmat apoi de introducerea acestor soluții în mediul de cultură a două tulpini de drojdie din genul *Rhodotorula mucilaginosa*. Paralel, s-a studiat metabolizarea compușilor cu structură aromatică de către drojdii, precum și efectul acestor medii de cultură asupra biosintezei de pigmenți carotenoizi. Aceste experimente au urmărit două aspecte: (1) biosorbția din mediu de cultură și concentrarea ionilor liberi de către biomasa celulară și (2) biosinteza cu randament cât mai ridicat a pigmenților carotenoizi caracteristici celor două tulpini de *Rhodotorula mucilaginosa*.

VIII.2.2. Metode

În efectuarea experimentelor s-au folosit extracte din trei tipuri de materiale vegetale, și anume, *Asclepias syriaca* plantă, semințe de *Vitis vinifera* și coajă de *Picea abies* și s-au parcurs etapele din Fig. VIII.1.

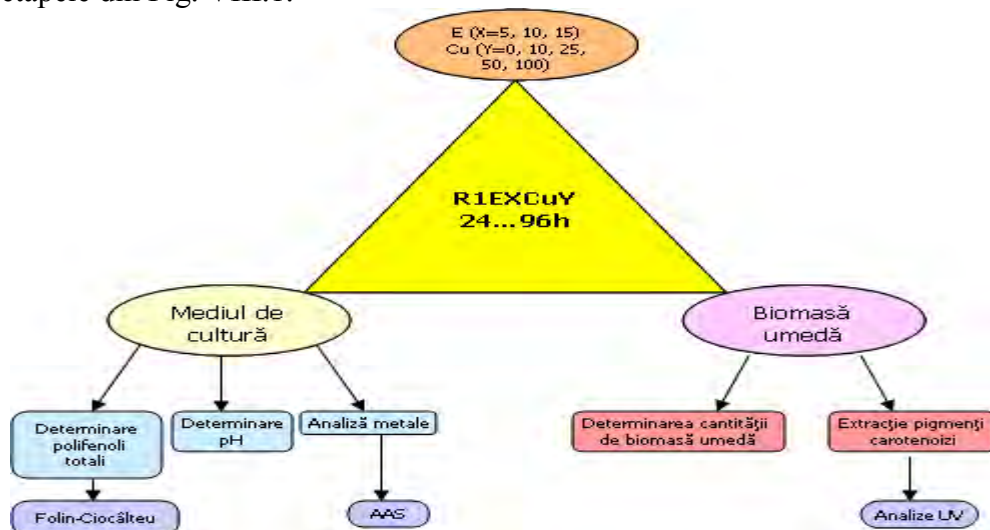


Fig. VIII.1. Schema etapelor experimentale pentru cultivarea celor două tulpini de drojdie *Rhodotorula mucilaginosa*.

VIII.2.2.1.2. Obținerea mediului de cultură

În extractele apoase astfel obținute și caracterizate din punct de vedere al conținutului de polifenoli totali, s-a adăugat sulfat de cupru în diferite concentrații, și anume, 10, 25, 50 și 100 mg/L. Soluțiile au fost păstrate la frigider timp de 24 de ore, după care s-au prelevat probe pentru determinarea concentrației polifenolilor totali și de ioni metalici existenți în soluție.

După prelevarea probelor, s-a preparat mediul de cultură cu următoarea compoziție chimică: 1g/L glucoză, 1g/L KH_2PO_4 , 1g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05g/L CaCl_2 , care a fost supus sterilizării 20 de minute la 110°C, iar apoi repartizat în pahare Erlenmeyer.

VIII.3. Rezultate și discuții

VIII.3.1. Caracterizarea extractelor utilizate în cultivarea microorganismelor

Pentru obținerea mediilor de cultură, s-a efectuat diluarea extractului din 20 g de material aflat într-un volum de 500 mL și caracterizat în detaliu în Capitolul V. 3. 1, până ce concentrația acestuia a devenit echivalentă cu cea a unui extract separat din 5, 10 respectiv 15 g/L material vegetal. În extractele astfel obținute s-a stabilit conținutului de polifenoli totali (Tabelul VIII. 1).

Tabel VIII. 1.

Conținutul de polifenoli totali din extractele folosite pentru realizarea mediului de cultură

Extrakte apoase din:	Conținutul în polifenoli totali al extractului din 5 g/L material vegetal (mg GAE/L)	Conținutul în polifenoli totali al extractului din 10 g/L material vegetal (mg GAE/L)	Conținutul în polifenoli totali al extractului din 15 g/L material vegetal (mg GAE/L)
Coajă de <i>Picea abies</i>	148,78	258,95	390,53
Semințe de <i>Vitis vinifera</i>	143,39	259,14	391,87
<i>Asclepias syriaca</i> plantă	112,93	151,56	213,59

VIII.3.4. Cultivarea drojdiilor în extracte din semințe de *Vitis vinifera* în prezența diferitelor adaosuri ale ionilor de cupru

VIII.3.4.1. Influența condițiilor de cultură asupra randamentului în biomasă

Mediile de cultură ce conțin extracte apoase cu un conținut în polifenoli totali de 391,87 mgGAE/L nu determină un comportament foarte diferit al tulpinii R2. Cantitatea maximă de biomasă umedă atinge valori de 9,6 g/L și se înregistrează pentru cultura condusă în mediul în care s-au adăugat 50 mg/L ioni de cupru (Fig. VIII. 68.).

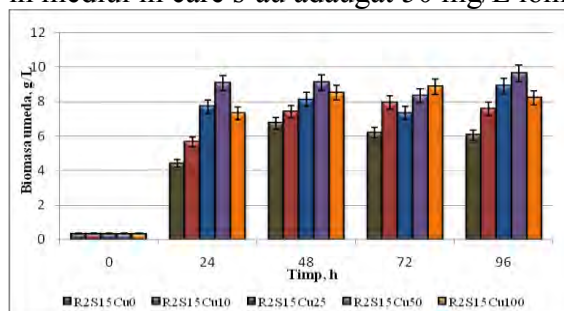


Fig. VIII. 68. Variația cantității de biomasă umedă pentru culturile R2S15Cu0, 10, 25, 50, 100 (semnificația notațiilor vezi Anexa VII);

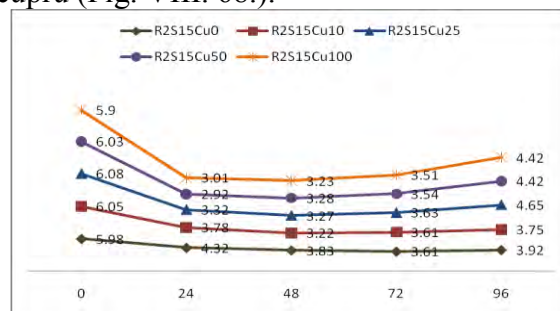


Fig. VIII. 74. Variația pH-ului pe parcursul culturilor R2S15Cu0, 10, 25, 50, 100 (semnificația notațiilor vezi Anexa VII);

VIII.3.4.2. Variația pH-ului pe parcursul proceselor fermentative

Conform datelor publicate de Ertugrun S. și colab în 2009, cuprul este adsorbit de celulele drojdiei la valori ale pH-ului de 4 și 5 în aceleași concentrații. De asemenea, bioacumularea cuprului de către drojdiile *Rhodotorula mucilaginosa* a fost investigată în

mediul de cultură ce conține melasă ca sursă de carbon, valoarea optimă a pH-ului pentru procesul de bioadsorbție fiind în jur de 4. Maximul cantității de cupru bioadsorbit se realizează în intervalul 4-6 zile și crește o dată cu creșterea concentrației ionului metalic în mediul de cultură.

Astfel, se poate observa din datele proprii obținute că, concentrația cuprului este în scădere până la sfârșitul procesului, fenomen determinat de valorile scăzute ale pH-ului în mediul de cultură, acești ioni metalici fiind probabil adsorbiți de către biomasa biosintetizată.

Prezența în mediul de cultură a extractelor cu concentrația cea mai ridicată în compuși polifenolici totali (391,87 mgGAE /L) are ca efect o scădere a pH-ului în primele 24 de ore până la valori de 3,5. De asemenea, se poate remarca faptul că, pentru fermentațiile în urma cărora s-a obținut cantitatea maximă în biomasă umedă (Fig. VIII. 68.), valoarea pH-ului se situează în jurul valorii de 4,5 (Fig. VIII. 74.).

VIII.3.4.3. Variația concentrației compușilor polifenolici în mediul de cultură

La concentrații ridicate ale compușilor polifenolici în extract cantitatea celor care formează complecși cu ionii de cupru este mult mai mare decât în cazurile în care concentrația compușilor polifenolici totali este mai scăzută (Fig. VIII. 80). La cultivarea tulpinii R2, s-a remarcat că, cantitatea maximă de compuși polifenolici degradați s-a produs în cazul culturii notată R2S15Cu25 (Fig VIII. 80.), însă care nu a reprezentat experimentul în care s-a înregistrat un maxim al randamentului în biomasă umedă (Fig. VIII. 68.).

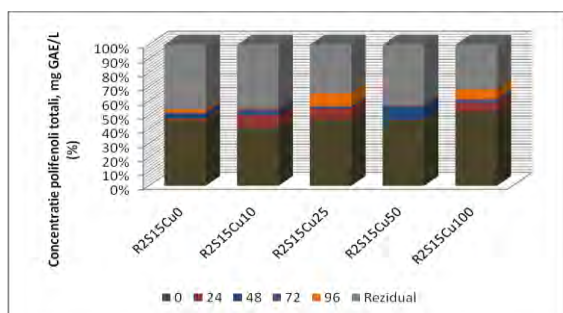


Fig. VIII. 80. Variația concentrației polifenolilor totali pe parcursul culturilor R2S15Cu0, 10, 25, 50, 100 (semnificația notațiilor vezi Anexa VII);

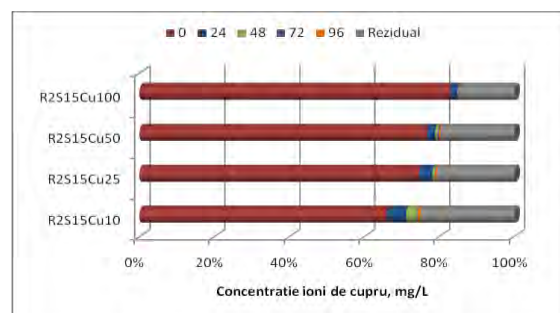


Fig. VIII. 86. Variația concentrației ionilor de cupru pe parcursul culturilor R2S15Cu0, 10, 25, 50, 100 (semnificația notațiilor vezi Anexa VII);

VIII.3.4.4. Variația concentrației ionilor de cupru

În ceea ce privește situația ionilor de cupru introduși în extract, se poate observa că cea mai mare cantitate este legată înainte de inoculare. Acest fapt este susținut de către datele de literatură (Kraal P., și colab., 2006) conform cărora, ionii de cupru sunt complexați în soluțiile apoase de către compușii polifenolici. De asemenea, se poate remarca faptul că o cantitate însemnată a acestora este reținută de biomasa celulară, un procent care se ridică până la 5%.

În Fig. VIII. 86 se poate remarca sinergismul constatat între existența compușilor polifenolici din extractele apoase și prezența ionilor de cupru adăugați în mediu. Cu toate că aceste extracte apoase prezintă concentrația cea mai ridicată în compuși polifenolici, și anume 391,87 mgGAE/L, se poate observa că în momentul în care s-au adăugat în mediu 10 mg/L ioni de cupru, un procent de 60% din aceștia au fost complexați. Cu cât crește concentrația ionilor de cupru în mediu cu atât crește și gradul lor de reținere. De asemenea, cantitatea de ioni metalici captați de biomasă este ridicată doar în cazul culturilor conduse în extract în care s-au adăugat 10 mg/L cupru. Însă, odată cu creșterea cantității de biomasă din mediul de cultură, crește și procentul ionilor metalici reținuți.

VIII.3.4.5. Influența condițiilor de cultură asupra biosintezei pigmenților carotenoizi

Prezența în mediul de cultură a extractelor cu o concentrație cea mai ridicată în compuși polifenolici (391,87 mgGAE/L) permite obținerea celor mai ridicate randamente în pigmenți carotenoidici biosintetizați de cele două tulpini de drojdie.

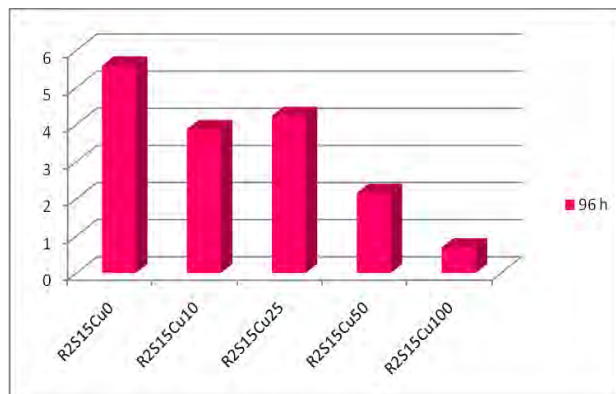


Fig. VIII. 92. Variația concentrației pigmenților carotenoizi pe parcursul culturilor R2S15Cu0, 10, 25, 50, 100 (semnificația notațiilor vezi Anexa VII);

Efectul favorabil al extractelor este mult mai evident pentru tulpina R2 comparativ cu tulpina R1. Astfel, tulpina R2 biosintetizează cantități maxime de pigment carotenoid care ating valori de 6 $\mu\text{g/g}$ biomasă uscată, și se înregistrează pentru cultura martor (Fig. VIII. 92).

Capitolul IX Concluzii finale

Rezultatele obținute în urma cercetărilor prezentate în teza de doctorat cu titlul **STUDIUL INFLUENȚEI PRODUSELOR POLIFENOLICE ASUPRA PROCESELOR METABOLICE ȘI DEZVOLTĂRII UNOR MICROORGANISME**, au evidențiat posibilitatea utilizării unor extracte din materiale vegetale reziduale în prepararea mediilor pentru cultivarea a două tulpini de drojdie *Rhodotorula mucilaginosa* care să ofere cantități semnificative de pigmenți carotenoizi.

Astfel, s-au utilizat extracte apoase din *Asclepias syriaca* (Mierea albinelor), coajă de *Picea abies* (molid) și semințe de *Vitis vinifera* (struguri roșii) în concentrații diferite în mediile de cultură, alături de glucoză în concentrații normale sau scăzute, urmărindu-se efectele acestora asupra randamentului în biomasă precum și biosintezei de pigmenți carotenoizi.

De asemenea, alături de extractele menționate în alte experimente s-au testat și ionii de cupru în diferite concentrații. În acest caz s-au urmărit aceiași parametri în paralel cu evoluția concentrației ionilor de cupru care pot fi adsorbiți de biomasa umedă sau complexați de compuși polifenolici prezenți în mediul de cultură. Într-o altă serie de experimente au fost testate efectele a două tipuri de lignină asupra microorganismelor studiate și s-au evidențiat prin metode spectrale transformările suferite de polimerul aromatic.

Studiile de literatură precum și rezultatele experimentale prezentate în lucrarea de doctorat au condus la următoarele concluzii:

1. Drojdiile *Rhodotorula sp.* au fost cultivate pe foarte multe tipuri de substraturi pentru a obține cantități cât mai ridicate de pigment carotenoid, și anume: iaurt, melasă, glicerol, tărațe de orez, acid lactic însă, în funcție de condițiile de cultivare produc pigmenți carotenoizi în cantități semnificative.

2. Drojdiile din genul *Rhodotorula* sunt capabile a degrada compuși cu structură polifenolică printre care: acizii ferulic, vanilic, sinapic și acid galic.

3. Lignina este o substanță care joacă un rol foarte important în ciclul carbonului pe pământ. Informațiile de literatură evidențiază faptul că aceasta poate avea aplicații mult mai largi, fiind menționată utilizarea sa în hrana animalelor, în fertilizarea solului, în procese de bioremediere etc. Datorită structurii sale complexe, doar câteva tipuri de microorganisme sunt capabile să degradeze

lignina, biodegradarea macromoleculei de lignină realizându-se sub acțiunea enzimelor extracelulare nespecifice, dintre care cele mai importante sunt: lignin peroxidaza, mangan peroxidaza și lacaza.

4. Cu toate că în literatură sunt prezentate câteva specii de drojdii care degradează monomerii ligninei, cum ar fi *Rhodotorula graminis*, *Candida ingeniosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, această clasă de microorganisme nu este considerată a fi capabilă a degrada structura polimerului. Sunt puține informații privind interacțiunea drojdiilor cu lignina. Conform datelor de literatură, anumite specii din genul *Rhodotorula* pot ataca enzimatic lignina scindând molecule de dimensiuni mici pe care mai apoi să le introducă în circuitul metabolic, fără a biosintetiza sisteme enzimatice care să degradeze produsele până la dioxid de carbon și apă. *Rhodotorula sp.* pot degrada acidul ferulic care este componentul majoritar al ligninei în plantele anuale, rezultate apreciate cu ajutorul tehnicilor spectrale.

5. Cuprul reprezintă un micronutrient esențial în plante, important pentru funcționarea diferitelor enzime cum ar fi Cu/Zn superoxid dismutaza, ascorbat oxidaza, polifenol oxidaza, citocrom C oxidaza și plastocianina. În lipsa acestuia, creșterea plantelor se realizează cu dificultate. Prezența acestor ioni în formă liberă în organismele vii conduce la interacțiuni cu formele libere ale oxigenului, consecința acestei reacții fiind producerea de specii reactive ale oxigenului prin reacția Fenton, care sunt generate necontrolat ducând astfel la distrugerii oxidative ale biomoleculelor.

6. Mulți compuși polifenolici prezintă caracter antioxidant mult mai puternic comparativ cu vitaminele. Activitatea antioxidantă a acizilor fenolici derivă din numărul și poziția grupelor hidroxil legate de nucleul aromatic, și de asemenea de tipul de substituenți. Cea mai mare activitate antioxidantă a fost înregistrată pentru *orto*-difenoli. Abilitatea de chelatizare a metalelor cu polifenoli este legată de prezența compușilor *orto*-dihidroxi, ca de exemplu grupele galoil sau structurile de tip catehol; reacția prezentând o foarte mare importanță o dată ce chelatarea metalelor are loc la pH-ul fiziologic. Studiile fizico-chimice cu privire la complexii formați între metale și polifenoli în stare de echilibru au stabilit că oxidarea catalitică sau necatalitică în soluție a acizilor cinamic, vanilic, siringic, protocatehuic, și 3,4,5-trimetoxibenzoic, acidului tanic, flavonelor (quercetinei), catehinei, acizilor galic și ferulic are loc în prezența ionilor metalici.

7. Multe tipuri de biomase microbiene au capacități de biosorbție. Biomasa drojdiilor a fost utilizată cu succes ca biosorbent în eliminarea ionilor de Ag, Au, Cd, Cu, Cr, Ni, U și Zn din soluțiile apoase. Multe dintre drojdii pot adsorbi un spectru larg de metale sau pot fi specifice pentru unul singur. Celulele de *Rhodotorula mucilaginosa* prezintă capacitate de îndepărtare a ionilor de Cu(II) din soluțiile apoase, mai ales atunci când concentrația acestora este sub 100 mg/L, situație în care procesele de depoluare existente în acest moment sunt prea costisitoare și slab eficiente în îndepărtarea acestor concentrații scăzute din soluții.

8. În experimentele efectuate s-au folosit trei tulpini de drojdii *Rhodotorula mucilaginosa* selecționate și puse la dispoziție de laboratoarele Platformei Alimentare din cadrul Universității “Dunărea de Jos” din Galați iar identificarea lor a fost posibilă ca urmare a stagiului de cercetare efectuat în laboratoarele Departamentului de Biologie Aplicată, Secția de Microbiologie și Colecția de Drojdii Industriale DBVPG, din cadrul Universității din Perugia, Italia (University of Perugia – Department of Applied Biology, Section of Microbiology & Industrial Yeasts Collection DBVPG (www.agr.unipg.it/dbvpg), Perugia, Italy).

9. Astfel, studiul proceselor de metabolizare a diferitelor surse de carbon și azot, precum și influența temperaturii, a condus la concluzia că cele două tulpini de drojdie folosite în partea experimentală se identifică cu *Rhodotorula mucilaginosa*. Cu toate acestea, s-au observat diferențe interspecifice între cele trei tulpini analizate, fapt constatat prin aspectul coloniilor cultivate pe mediul de cultură agarizat precum și în asimilarea anumitor surse de carbon cu o dinamică diferită, deosebiri care apar datorită izolării acestora de pe diferite medii naturale. Ținând seama de aceste informații cele două tulpini utilizate în partea experimentală au fost notate cu R1 și R2.

10. În urma analizelor moleculare s-a stabilit că cele trei tulpini de drojdii sunt identice în proporție de 100% cu *Rhodotorula mucilaginosa* AF070432, tulpină care se găsește în baza de date GenBank.

11. Extractul apos din *Asclepias syriaca*, cu un conținut în polifenoli totali de 112,93 mgGAE/L, duce la obținerea unui randament maxim în biomasă pentru tulpina notată R1. Fermentațiile realizate în medii de cultură ce conțin pe lângă extractele apoase din *Asclepias syriaca*, 1 g/L glucoză, întrețin creșterea celor două tulpini de drojdie până în a patra zi de cultură, cantitatea de biomasă produsă de tulpina notată R1 ajungând la jumătate comparativ cu situația în care tulpina R1 a fost cultivată în mediul de cultură cu o concentrație a polifenolilor totali separați din *Asclepias syriaca* de 112.93 mgGAE/L.

12. În prezența extractelor din *Asclepias syriaca*, tulpina notată R2 degradează o cantitate mai mare de polifenoli totali comparativ cu tulpina R1, cele două microorganisme caracterizându-se prin procese metabolice diferite. Compușii polifenolici existenți în extractele apoase din *Asclepias syriaca* sunt folosiți cu precădere ca sursă de carbon în creșterea celor două tulpini de drojdie, cantitatea consumată crescând atunci când în mediul de cultură nu mai există o altă sursă de carbon.

13. Condiția optimă pentru biosinteza unor cantități maxime de pigmenți carotenoizi pentru fermentațiile celor două tulpini de drojdie în extractele apoase separate din *Asclepias syriaca* este reprezentată în cazul cultivării tulpinii R2 în mediul de cultură ce conține extract apos din *A. syriaca* cu un conținut în compuși polifenolici totali de 112,93 mg GAE/L.

14. Extractul apos din coajă de *Picea abies*, cu un conținut în polifenoli totali de 148,78 mgGAE /L reprezintă mediul în care se obține o cantitate maximă de biomasă umedă în urma fermentației tulpinii R1.

15. Prezența extractului apos din coajă de *Picea abies*, cu un conținut în polifenoli totali de 89,98 mgGAE /L, oferă condiții pentru a realiza un randament maxim în biomasă umedă pentru fermentațiile conduse în mediul de cultură ce conține 1 g/L glucoză, condiție reprezentată de fermentația tulpinii notată R2.

16. Compușii polifenolici din extractele apoase din coajă de *Picea abies*, sunt utilizați de către cele două tulpini de drojdie, fiind degradați într-o proporție de 40% din concentrația inițială când în mediu este introdusă o cantitate de 15 g/L glucoză. În lipsa glucozei ca sursă complementară de energie, sistemele enzimactice proprii celor două tulpini degradează un procent de aproximativ 60% din concentrația compușilor polifenolici existenți în aceste extracte apoase indiferent de concentrația acestora.

17. Situația în care se obține cantitatea maximă de pigment pentru fermentațiile conduse în extracte apoase din coajă de *Picea abies*, este reprezentată de fermentația tulpinii notată R1 în mediul de cultură ce conține o concentrație în compuși polifenolici de 89,98 mgGAE /L.

18. Maximul randamentului în biomasă umedă pentru fermentațiile conduse în extracte separate din semințe de *Vitis vinifera* se înregistrează pentru cultivarea tulpinii notată R1 în mediul ce conține o concentrație în compuși polifenolici totali de 69,19 mgGAE/L. Aceasta reprezintă condiția și pentru obținerea unei cantități maxime în pigment carotenoid.

19. În urma procesului de modelare statistică a datelor referitoare la cantitatea de biomasă umedă rezultată în urma cultivării celor două tulpini de drojdie *Rhodotorula mucilaginosa*, s-a obținut un coeficient de corelație apropiat de valoarea 1, ceea ce semnifică faptul că rezultatele experimentale sunt în concordanță cu cele calculate.

Analiza diferitelor variante a condus la concluzia că pentru obținerea unui randament maxim în biomasă umedă cea mai avantajoasă situație este cea în care se cultivă tulpina notată R1 în prezența extractului din *Asclepias syriaca* cu un conținut în polifenoli de 112,93 mg GAE/L și a unei concentrații în glucoză de 15 g/L.

20. În urma optimizării randamentului în pigmenți carotenoizi biosintetizați de cele două tulpini de drojdie a rezultat că valoarea rezultată se încadrează în domeniul experimental pentru toate variantele analizate. De asemenea, testarea stabilității optimului determinat a dus la concluzia că acesta se păstrează pentru intervale stabile de timp și randament în biomasă umedă. Analiza efectuată a condus la stabilirea condițiilor optime pentru obținerea unui conținut maxim în pigmenți carotenoizi de 37,24 μg pigment/g biomasă uscată și un randament în biomasă uscată de 37,488 g/L care sunt oferite de cultivarea tulpinii notată R1 folosind ca sursă de carbon extractul din semințe de *Vitis vinifera* cu o concentrație în compuși polifenolici totali de 69,19 mgGAE/L și o concentrație a glucozei de 15g/L.

21. Cele două tulpini de drojdie *Rhodotorula mucilaginosa*, sintetizează enzime capabile să acționeze asupra diferitelor grupe funcționale din structura ligninei, pe care le folosește ca sursă de carbon și energie.

22. Condiția pentru obținerea unei cantități maxime de biomasă în cultivarea celor două tulpini de drojdie în medii ce conțin soluții de diferite concentrații din lignine din paie de grâu și iarbă, este reprezentată de cultivarea tulpinii notată R1 în mediul ce conține 0,8% lignină notată L1.

23. Concentrații maxime de pigmenți carotenoizi rezultă în cazul cultivării celor două tulpini de drojdie în medii ce conțin soluții din lignine din paie de grâu și iarbă, reprezentată de cultivarea tulpinii R2 în mediul ce conține o concentrație de 0,5% din lignina notată L2.

24. Sistemele enzimactice biosintetizate de drojdii în condițiile cultivării în mediul pe bază de produse ligninice produc modificări semnificative asupra structurii acestora. Modificările apar la nivelul grupelor metil, prin scindarea acestora de pe nucleul aromatic sau din catenele laterale. Un alt

tip de reacție care determină modificările produse în structura ligninei sunt reacțiile de oxidare de la nivelul grupelor carbonil, carboxil și hidroxil, aparținând cetoneilor, alcoolilor, fenolilor, aldehydelor. Astfel, se poate spune că soluțiile de lignină folosite în fermentațiile drojdiilor sunt propice dezvoltării și biosintezei de compuși carotenoizi pentru cele două tulpini de drojdii.

25. Condiția pentru obținerea celui mai ridicat randament în biomasă umedă, pentru fermentațiile celor două tulpini de drojdie conduse în extracte apoase din cele trei materiale vegetale alături de ioni de cupru, este reprezentată de fermentația tulpinii notată R1 în extract apos din *Asclepias syriaca* cu o concentrație în compuși polifenolici de 213,59 mgGAE/L alături de care s-au introdus 10 mg/L ioni de cupru.

26. Cea mai ridicată concentrație în pigment carotenoid se înregistrează pentru fermentațiile celor două tulpini de drojdii conduse în extracte apoase din cele trei materiale vegetale alături de ioni de cupru, în cazul tulpinii notată R1 în extract apos separat din coajă de *Picea abies* cu o concentrație în compuși polifenolici totali 390,53 mgGAE/L.

27. În situația în care cele două tulpini de drojdie au fost cultivate în medii ce conțin pe lângă compuși polifenolici 10 mg/L ioni de cupru, cea mai mare concentrație a acestuia a fost adsorbită în urma fermentației tulpinii notată R2 în extract apos separat din semințe de *Vitis vinifera* cu un conținut în compuși polifenolici totali de 143,39 mgGAE/L.

28. Cele două tulpini de drojdie cultivate în medii ce conțin pe lângă compuși polifenolici 25 mg/L ioni de cupru, au dus la adsorbția unei cantități maxime în urma fermentației tulpinii notată R1 în mediul de cultură ce conține extract apos separat din coajă de *Picea abies* cu o concentrație în compuși polifenolici totali 390,53 mgGAE/L.

29. Atunci când cele două tulpini de drojdie au fost cultivate în medii ce conțin pe lângă compuși polifenolici 50 mg/L ioni de cupru, cea mai mare concentrație a acestuia a fost adsorbită în urma fermentației tulpinii notată R1 în extract apos din *Asclepias syriaca* cu o concentrație în compuși polifenolici de 213,59 mgGAE/L.

30. Când cele două tulpini de drojdie au fost cultivate în medii ce conțin pe lângă compuși polifenolici 100 mg/L ioni de cupru, cea mai mare cantitate din acesta a fost adsorbită în cazul culturii tulpinii notată R2 în mediul de cultură ce conține extract apos din *Asclepias syriaca* cu o concentrație în compuși polifenolici de 151,56 mgGAE/L.

Bibliografie selectiva

3. Aksu Z., Eren A. Tugba, 2005, *Carotenoids production by the yeast Rhodotorula mucilaginosa: Use of agricultural wastes as a carbone source*, Process biochem., **40** (9): 2985-2991;
20. Bai M., Qing M., Guo Z., Zhang Y., Chen X., Bao Q., Zhang H., Sun T., 2010, *Occurrence and dominance of yeast species in natural fermented milk from the Tibetan Plateau of China*, Can. J. Microbiol., **56**: 707-714;
26. Bhosale P., Gadre R.V., 2001, *β -Carotene production in sugarcane molasses by a Rhodotorula glutinis mutant*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **26**: 327-332;
38. Căpraru A.M., 2010, Teza de doctorat, *Contribuții în domeniul modificării ligninei prin reacții de hidroximetilare și epoxidare*, Universitatea Tehnică Gh. Asachi, Iași;
39. Chan H., Ferrari C., Angiuli M., Yao J., Raspi C., Bramanti E., 2010, *Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis*, Carbohydr. Polym., **82**: 772-778;
43. Chiriță E., 2005, *Sinteza orientată a carotenoidelor de către drojdii și perspectiva utilizării lor*-Autoreferat al tezei de doctor în biologie, Chișinău.
49. Dănăilă M., Popa, V.I., Volf I., 2007a, *Influence of polyphenols on the biosynthesis of carotenoids by yeasts*, Proceedings of the 8 th ILI Forum, May - 10-12, Rome, 105-108;
51. Dănăilă M., 2009, *Contribuții la studiul influenței unor compuși naturali cu structură aromatică asupra dezvoltării microorganismelor* – Teză de doctorat, Universitatea Tehnică "Gh. Asachi", Iași;
53. D'Cunha G. B., 2005, *Enrichment of phenylalanine ammonia lyase activity of Rhodotorula yeast*, Enzyme Microb. Technol., **36** (4): 498-502;
56. Diouf P. N., Stevanovic T., Cloutien A., 2009, *Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from Picea mariana and its proanthocyanidin – rich fraction*, Food Chem., **113**: 897-902;
57. Dizhbite T., Telysheva G., Dobeles G., Arshanitsa A., Bikovens O., Andersone A., Kampars V., 2011, *Py-GC/MS for characterization of non-hydrolyzed residues from bioethanol production from softwood*, J. Anal. Appl. Pyrol., **99** (2): 126-132;
64. Ertugrun S., San N. O., Donmez G., 2009, *Treatment of dye (Remazol Blue) and heavy metals using yeast cells with the purpose of managing polluted textile wastewaters*, Ecol. Eng., **35**: 128-134;
68. Furiga A., Lonvaud-Funel A., Badet C., 2009, *In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract*, Food Chem., **113**: 1037-1040;
78. Gupta J.K., Sharma P., Kern H.W., Sahm H., 1990, *Degradation of synthetic lignins and some lignin monomers by the yeast Rhodotorula glutinis*, World J. Microbiol. Biotechnol., **6**: 53-58;
81. Hainal A. R., Volf I., Popa I. V., 2009c, *Study regarding the influence of Asclepias syriaca aqueous extracts in the development of a strain of yeast (Rhodotorula spp.)*, Bull. Inst. Politech. Iași, **LV (LIX)** (4) 95-101;

- 82.Hainal A. R.,** Ignat I., Volf I., Popa V. I., 2010a, *Study of the influence of aqueous extracts from Asclepias syriaca on the development of species of Rhodotorula sp.* *Lucrări științifice, Seria Horticultură*, Editura “Ion Ionescu de la Brad” Iași, **53**, (1): 603-608;
- 83.Hainal A. R.,** Ignat I., Volf I., Popa V. I., 2010b, *Research on the influence of aqueous extracts from the grape seeds on the development of some specie of Rhodotorula sp.*, *Lucrări științifice, Seria Horticultură*, Editura “Ion Ionescu de la Brad” Iași, **53** (1): 661-666;
- 85.Hainal A. R.,** Ignat I., Volf I., V. I. Popa, 2011b, *Transformation of polyphenols from biomass by some yeast species*, *Cellul. Chem. Technol.*, **45** (3-4) 211-219;
- 90.Higuchi T., 2004, *Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase – Review*, from *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **80** (5): 204-214;
- 91.Hoareau W., Trindade W.G., Siegmund B., Castellán A., Frollini, 2004, *Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability*, *Polym. Degrad. Stab.*, **86**: 567-576;
- 93.Huang Z., Dostal L., Rosazza J. P. N., 1993, *Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillin acid guaiacol by Rhodotorula rubra*, *J. Biol. Chem.*, **268** (32): 23954-23958;
- 113.Kraal P., Jansen B., Nierop K.G.J., Verstraten J.M., 2006, *Copper complexation by tannic acid in aqueous solution*, *Chemosphere*, **65**: 2193-2198;
- 116.Kurtzman C. P., Fell J. W., 1998, *The yeasts, A taxonomic study*, Fourth edition, Elsevier, USA;
- 126.Libkind D., Brizzio S., van Broock M., 2004, *Rhodotorula mucilaginosa, a carotenoid producing yeast strain from Patagonian high-altitude lake*, *Folia Microbiol.*, **49** (1): 19-25;
- 127.Liu H., Zhang J., Li J., Liu J., 2008, *Biodiesel production with the lipid of Rhodotorula gutini fermentation*, *J. Biotechnol.*, **136**: S453-S453;
- 143.Narbad A., Gasson M. J., 1998, *Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly isolated strain of Pseudomonas fluorescens*, *Microbiology*, **144**: 1397-1405;
- 147.Ozturk I., Irmak S., Hesenov A., Erbatur O., 2010, *Hidrolisis of kenaf (Hibiscus cannabinus L) stems by catalytical treatment in subcritical water*, *Biomass Bioenergy*, **34**: 1578-1585;
- 166.Rusan V., Cascaval C. N., Rosu D., Popa V., 1984, *Valorificarea complexa si integral a plantei laticifere Asclepias syriaca L. I. Consideratii asupra potentialului biologic si chimic*, Institutul agronomic “Ion Ionescu de la Brad” Iasi, *Lucrari stiintifice - seria agronomie*, **28**: 107-111;
- 171.Sharma R.K., Wooten J.B., Baliga V.L., Lin X., Chan W.G., Hajaligol M.R., 2004, *Characterization of chars from pyrolysis of lignin*, *Fuel*, **83**: 1469-1482;
- 170.Seracu D.I., 1989, *Îndreptar de chimie analitică*, Ed. Th. Bucuresti, 116, 292;
- 173.Shimada H., Kondo K., Fraser P. D., Miura Y., Saito T., Misawa N., 1998, *Increased carotenoid production by the food yeast Candida utilis through metabolic engineering of the isoprenoid pathway*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (7): 2676-2680;
- 175.Simionescu Cr. I., Rusan V., Popa V. I., 1987, *Options concerning phytomass valorification*, *Cellulose Chem. Technol.*, **21** (1): 3-16;
- 178.Slavikova E., Kosikova B., 2001, *Modification of lignin by Geotrichum klebahnii*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**: 1-3;
- 203.Tejado A., Pena C., Labidi J., Echeverria J.M., Mondragon I., 2007, *Physico-chemical characterization of lignins from different sources or use in phenol-formaldehyde resin synthesis*, *Bioresour. Technol.*, **98**: 1655-1663;
- 205.Thomas – Hall S. R., Turchetti B., Buzzini P., Branda E., Boekhout T., Theelen B., Watson K., 2010, *Cold – adapted yeasts from Antartica and the Italian Alps – description of tree novel species: Mrakia robertii sp. nov., Mrakia blollopis sp. nov. and Mrakiella niccombsii sp. nov.*, *Extremophiles*, **14**: 47-59;
- 225.Yang C., Cao G., Li Y., Zhang X., Ren H., Wang X., Feng J., Zhao L., Xu P., 2008, *A constructed alkaline consortium and its dynamics in treating alkaline black liquor with very high pollution load*, *PloS* (www.plosone.org), **3** (11): e3777;
- 227.Yang X., Ma F., Zeng Y., Yu H., Xu C., Zhang X., 2010, *Structure alteration of lignin in corn stover degraded by white-rot fungus Irpex lacteus CD2*, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **64**: 119-123;
- 240.www.ncbi.nlm.nih.gov/blast

Activitate științifică

Participarea la conferințe internaționale

The 9th Symposium of Metal Element in Environment Medicine and Biology, 16-17 octombrie 2009, Cluj. Romania

The 14th International symposium on Cellulose Chemistry and Technology, Universitatea Tehnica “Gh. Asachi”, Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, 8-10 septembrie, 2010, Iași, Romania;

Nordic Wood Biorefinery Conference (NWBC 2011), 22-24 Martie 2011, Stockholm, Suedia;

Italic 6, Science & Technology of Biomasses: Advances and Challenges From forest and agricultural biomasses to high added value products: processes and materials, 5-8 Septembrie, 2011, Universitatea din Tuscia, Viterbo, Italia;

Participarea la Manifestări Științifice și Conferințe Locale

- Zilele Facultății de Inginerie Chmică și Protecția Mediului, Ediția a VI-a Noi frontiere în chimie și inginerie chimică”, Secțiunea: Materiale avansate cu aplicații specifice, 18-20 noiembrie 2009, Iași,Romania;
- Simpozionul Științific Anual cu Participare Internațională „Horticultură – știința, calitate, diversitate și armonie”, organizat de Facultatea de Horticultură din cadrul Univ. de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad”, Iași, 27-28 mai 2010, România;

- Simpozionul științific „Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului”, Ediția a VII-a: “90 de ani de la nașterea Academicianului Cristofor Simionescu”, 17-19 Noiembrie 2010, Iași, România;
- Simpozionul Științific Anual cu Participare Internațională „Horticultură – știință, calitate, diversitate și armonie”, „60 ani de învățământ superior horticol la Iași”, organizat de Facultatea de Horticultură din cadrul Univ. de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad”, 26-28 Mai 2011, Iași, Romania;

Comunicări orale

Hainal A.R., Volf I., Popa V. I., *Study regarding the influence of Asclepias syriaca aqueous extracts in the development of a strain of yeast (Rhodotorula spp.)*, **Prezentare** susținută în cadrul manifestării: Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, „Noi frontiere în chimie și inginerie chimică”, Iași, 18-20 noiembrie 2009, Secțiunea: Materiale avansate cu aplicații specifice;

Hainal A. R., Ignat I., Volf I., Popa V. I., *Study of the influence of aqueous extracts from Asclepias syriaca on the development of species of Rhodotorula spp.*, **Prezentare** susținută în cadrul Simpozionului Științific Anual cu Participare Internațională „Horticultură – știință, calitate, diversitate și armonie”, organizat de Facultatea de Horticultură din cadrul Univ. De Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad”, Iași, 27-28 mai 2010, România;

Hainal A. R., Volf I., Popa I. V., *Study of the influence of copper ions and aqueous extracts from seeds of red grapes Vitis vinifera on a strain of yeast*, **Prezentare** susținută la Simpozionul științific „Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului”, Ediția a VII-a: “90 de ani de la nașterea Academicianului Cristofor Simionescu”, 17-19 Noiembrie 2010, Iași, România;

Hainal A. R., Volf I., Popa I. V., *Influence of aqueous extract from the bark of Picea abies on development of a yeast species Rhodotorula spp.*, **Prezentare** susținută la Simpozionul științific „Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului”, Ediția a VII-a: “90 de ani de la nașterea Academicianului Cristofor Simionescu”, 17-19 Noiembrie 2010, Iași, România;

Postere

Hainal A., Ignat I., Stingu A., Volf I., Popa V. I., *The influence of some natural polyphenols on Rhodotorula spp. growth in the presence of copper ions*, - **Poster** prezentat la The 9th Symposium of Metal Element in Environment Medicine and Biology, 16-17 octombrie 2009, Cluj. România;

Stingu A., Ignat I., **Hainal A.**, Volf I., Popa V. I., *Behavior of tomato plant during cultivation in the presence of copper in forest and sandy soils*, - **Poster** prezentat la The 9th Symposium of Metal Element in Environment Medicine and Biology, 16-17 octombrie 2009, Cluj. România;

Hainal A. R., Ignat I., Volf I., Popa V. I., *Research on the influence of aqueous extracts from the grape seeds on the development of some specie of Rhodotorula spp.*, - **Poster**, prezentat în cadrul Simpozionului Științific Anual cu Participare Internațională „Horticultură – știință, calitate, diversitate și armonie”, organizat de Facultatea de Horticultură din cadrul Univ. De Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad”, Iași, 27-28 mai 2010, România;

Hainal A. R., Ignat I., Volf I., Popa I. V., *Transformation of polyphenolic products from biomass by some yeast species*, - **Poster** prezentat la The 14th International symposium on Cellulose Chemistry and Technology , Septembrie 8-10, Iași, România;

Popa V. I., **Hainal A. R.**, Volf I., *Influence of lignin products on the development of yeast strains of Rhodotorula spp.*, **Poster** prezentat la Nordic Wood Biorefinery Conference (NWBC 2011), 22-24 Martie 2011, Stockholm, Suedia;

Tanase C., **Hainal A. R.**, Ignat I., Volf I., Popa V. I., *Development of Rhodotorula yeasts under the influence of polyphenolic compounds in the presence of copper ions*, **Poster** prezentat la Simpozionul Științific Anual cu Participare Internațională „Horticultură – știință, calitate, diversitate și armonie”, „60 ani de învățământ superior horticol la Iași”, Facultatea de Horticultură, 26-28 Mai 2011, Iași, România;

A.R. Hainal, V.I. Popa, I.Volf, *Study of interaction between copper ions and aqueous extracts from bark of Picea abies in the culture of Rhodotorula species*, **Poster** prezentat la Simpozionul International Italic 6, Science & Technology of Biomasses: Advances and Challenges From forest and agricultural biomasses to high added value products: processes and materials, 5-8 Septembrie, 2011, Universitatea din Tuscia, Viterbo, Italia;

Lucrări științifice publicate în reviste naționale și internaționale recunoscute CNCSIS

Hainal A., Ignat I., Stingu A., Volf I., Popa V. I., *The influence of some natural polyphenols on Rhodotorula spp. growth in the presence of copper ions*, Metal Element in Environment Medicine and Biology, Tome IX, pg. 79-83, Cluj University Press, 2009;

Stingu A., Ignat I., **Hainal A.**, Volf I., Popa V. I., *Behavior of tomato plant during cultivation in the presence of copper in forest and sandy soils*, Metal Element in Environment Medicine and Biology, Tome IX, pg. 90-93, Cluj University Press, 2009.

Hainal A. R., Volf I., Popa I. V., 2009c, Study regarding the influence of *Asclepias syriaca* aqueous extracts in the development of a strain of yeast (*Rhodotorula spp.*), Bull. Inst. Politech. Iași, **LV (LIX)** (4) 95-101;

Hainal A. R., Ignat I., Volf I., Popa I. V., *Transformation of polyphenolic products from biomass by some yeast species*, Proceedings of The 14th International symposium on Cellulose Chemistry and Technology, 259-264, Iași, România, 2010;

Hainal A. R., Ignat I., Volf I., Popa V. I. *Study of the influence of aqueous extracts from Asclepias syriaca on the development of species of Rhodotorula sp.* Lucrări științifice, Vol. 53, Nr. 1, Seria Horticultură, Editura "Ion Ionescu de la Brad" Iași 2010, p. 603-608;

Hainal A. R., Ignat I., Volf I., Popa V. I. *Research on the influence of aqueous extracts from the grape seeds on the development of some specie of Rhodotorula sp.* Lucrări științifice, Vol. 53, Nr. 1, Seria Horticultură, Editura "Ion Ionescu de la Brad" Iași 2010, ISSN 1454-7376, p. 661-666;

Popa V. I., **Hainal A. R.**, Volf I., 2011, *Influence of lignin products on the development of yeast strains of Rhodotorula spp*, Lucrare publicată în Volumul Conferinței Internaționale „The third Nordic Wood Biorefinery Conference NWBC 2011”, 385 – 386;

Hainal A. R., Ignat I., Volf I., Popa V. I., 2011, *Transformation of polyphenols from biomass by some yeast species*, Cellulose Chem. Technol., **45** (3-4): 211-219;

Hainal A. R., Volf I., Popa V. I., 2011, *Influence of aqueous extract from the bark of Picea abies on development of a yeast species Rhodotorula spp.*, Bull. Inst. Politech. Iași, **LVII (LXI)** (1): 43-51;

Hainal A.R., Volf I., Popa V. I., 2011, *Influence of copper ions in aqueous extracts of Vitis vinifera grape seeds on the development of Rhodotorula mucilaginosa yeast*, Bull. Inst. Politech. Iași, **LVII (LXI)** (2): 109-115;

Hainal A.R., Popa V.I., Volf I., 2011, *Study of interaction between copper ions and aqueous extracts from bark of Picea abies in the culture of Rhodotorula species*, Lucrare publicată în volumul conferinței internaționale Italic 6 - Science & Technology of Biomasses: Advances and Challenges, pg. 353 - 356, 5-8 September, Tuscia University, Viterbo, Italy, ISBN 978-88-95688-65-7;

Lucrări în curs de publicare:

Hainal A.R., Diaconescu R., Volf I., Popa V. I., *Studies concerning some possibilities of obtaining carotenoid pigments by cultivation of Rhodotorula spp in the presence of Asclepias syriaca extracts*, Romanian Biotechnological Letters;

Hainal A. R., Căpraru A. M., Volf I., Popa V. I., *Lignin as a carbon source for the cultivation of some species of Rhodotorula*, Cellulose Chemistry and Technology;

Anexe

Anexa I:

Semnificația notațiilor utilizate în fermentațiile prezentate în Capitolul V

R1 – cultură realizată prin fermentația tulpinei R1 în mediul de cultură fără extracte vegetale;
R2 - cultură realizată prin fermentația tulpinei R2 în mediul de cultură fără extracte vegetale;
R1AS0.5- cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 0.5 g/L *Asclepias syriaca*;
R1AS5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca*;
R2AS0.5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 0.5 g/L *Asclepias syriaca*;
R2AS5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca*;
R1'AS0.5 - cultură realizată în mediu de cultură cu adaos de 1 g/L glucoză ce conține extract din 0.5 g/L *Asclepias syriaca*;
R1'AS5 - cultură realizată în mediu de cultură cu adaos de 1 g/L glucoză ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca*;
R2'AS0.5 - cultură realizată în mediu de cultură cu adaos de 1 g/L glucoză ce conține extract din 0.5 g/L *Asclepias syriaca*;
R2'AS5 - cultură realizată în mediu de cultură cu adaos de 1 g/L glucoză ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca*;
R1M0.5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 0.5 g/L coajă de *Picea abies*;
R1M5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 5 g/L coajă de *Picea abies*;
R2M0.5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 0.5 g/L coajă de *Picea abies*;
R2M5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 5 g/L coajă de *Picea abies*;
R1'M0.5 - cultură realizată în mediu de cultură cu adaos de 1 g/L glucoză ce conține extract din 0.5 g/L coajă de *Picea abies*;
R1'M5 - cultură realizată în mediu de cultură cu adaos de 1 g/L glucoză ce conține extract din 5 g/L coajă de *Picea abies*;
R2'M0.5 - cultură realizată în mediu de cultură cu adaos de 1 g/L glucoză ce conține extract din 0.5 g/L coajă de *Picea abies*;
R2'M5 - cultură realizată în mediu de cultură cu adaos de 1 g/L glucoză ce conține extract din 5 g/L coajă de *Picea abies*;
R1S0.5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 0.5 g/L semințe de *Vitis vinifera*;
R1S5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 0.5 g/L semințe de *Vitis vinifera*;
R2S0.5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 0.5 g/L semințe de *Vitis vinifera*;
R2S5 - cultură realizată în mediu de cultură ce conține extract din 0.5 g/L semințe de *Vitis vinifera*;

Anexa II

Cantitățile maxime de biomasă umedă și pigmenți carotenoizi obținute în urma proceselor fermentative prezentate în Capitolul V

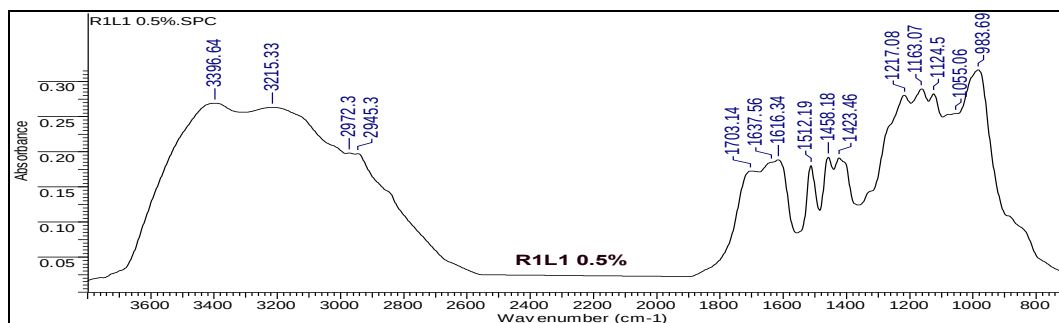
Experiment	Cantitatea maximă de biomasă umedă obținută		Cantitatea maximă de pigment biosintetizată	
	Timp, h	Biomasă umedă, g/L	Timp, h	Pigment carotenoid, μg/g biomasă uscată
R1	216	31,416	216	38,6965
R2	216	34,08	216	21,885
R1AS0.5	192	18,614	120	9,2332
R1AS5	192	50,009	144	8,325
R2AS0.5	168	29,129	192	11,4942
R2AS5	192	37,716	192	12,856
R1'AS0.5	144	20,54	120	7,8073
R1'AS5	72	24,24	120	5,19
R2'AS0.5	120	16,869	144	7,5758
R2'AS5	144	19,901	168	11,1279
R1M0.5	168	32,265	168	17,3146
R1M5	216	43,365	144	11,7896
R2M0.5	144	31,688	120	9,54
R2M5	96	38,424	168	9,2619
R1'M0.5	144	21,361	48	10,3185
R1'M5	168	17,66	48	9,5303
R2'M0.5	144	25,047	120	3,9312
R2'M5	96	21,413	120	1,4962
R1S0.5	216	37,488	216	37,2422
R1S5	192	33,191	144	24,803
R2S0.5	120	26,635	96	7,1459
R2S5	168	31,974	120	15,8915

Anexa III

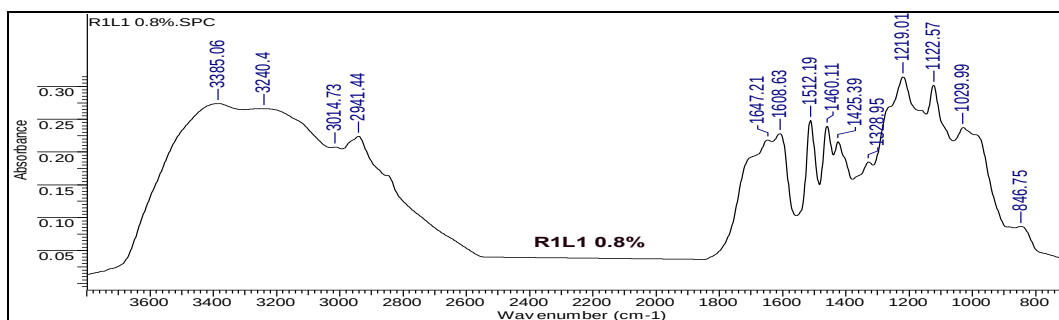
Semnificația notațiilor utilizate în fermentațiile prezentate în Capitolul VII

R1L10.1% - Fermentația tulpinii R1 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L1 în procent de 0,1%;
R1L10.3% - Fermentația tulpinii R1 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L1 în procent de 0,3%;
R1L10.5% - Fermentația tulpinii R1 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L1 în procent de 0,5%;
R1L10.8% - Fermentația tulpinii R1 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L1 în procent de 0,8%;
R2L10.1% - Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L1 în procent de 0,1%;
R2L10.3% - Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L1 în procent de 0,3%;
R2L10.5% - Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L1 în procent de 0,5%;
R2L10.8% - Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L1 în procent de 0,8%;
R1L20.1% - Fermentația tulpinii R1 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L2 în procent de 0,1%;
R1L20.3% - Fermentația tulpinii R1 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L2 în procent de 0,3%;
R1L20.5% - Fermentația tulpinii R1 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L2 în procent de 0,5%;
R1L20.8% - Fermentația tulpinii R1 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L2 în procent de 0,8%;
R2L20.1% - Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L2 în procent de 0,1%;
R2L20.3% - Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L2 în procent de 0,3%;
R2L20.5% - Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L2 în procent de 0,5%;
R2L20.8% - Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură la care s-a adăugat lignină L2 în procent de 0,8%;

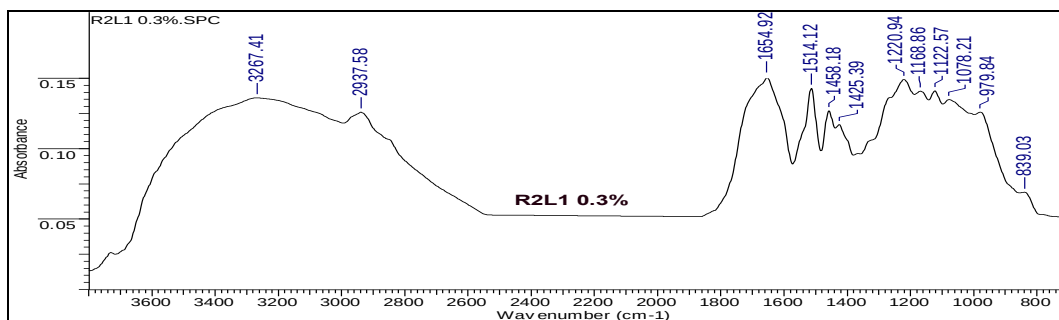
Anexa IV: Spectrele FT-IR a ligninelor recuperate din mediul de cultură rezidual



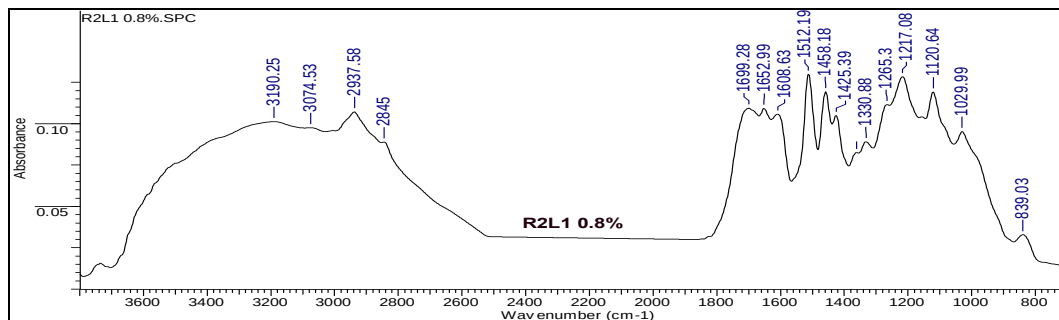
Anexa IV.a. Spectrul FT-IR înregistrat pentru lignina din paie de grâu recuperată din mediul de cultură a experimentului notat R1L10.5%;



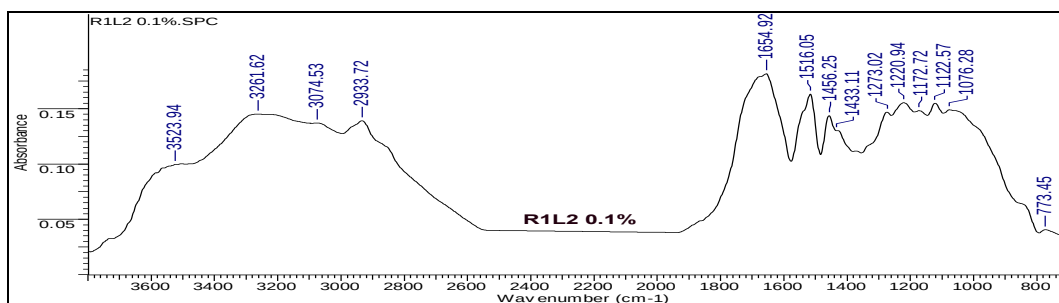
Anexa IV.b. Spectrul IR înregistrat pentru lignina din paie de grâu recuperată din mediul de cultură a experimentului notat R1L10.8%;



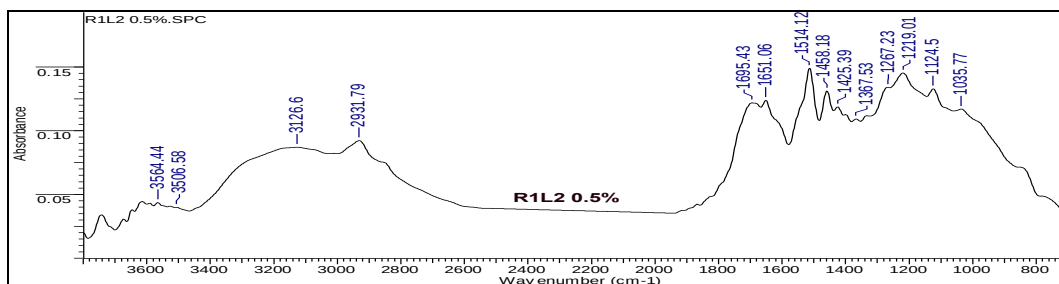
Anexa IV.c. Spectrul IR înregistrat pentru lignina din paie de grâu recuperată din mediul de cultură a experimentului notat R2L10.3%;



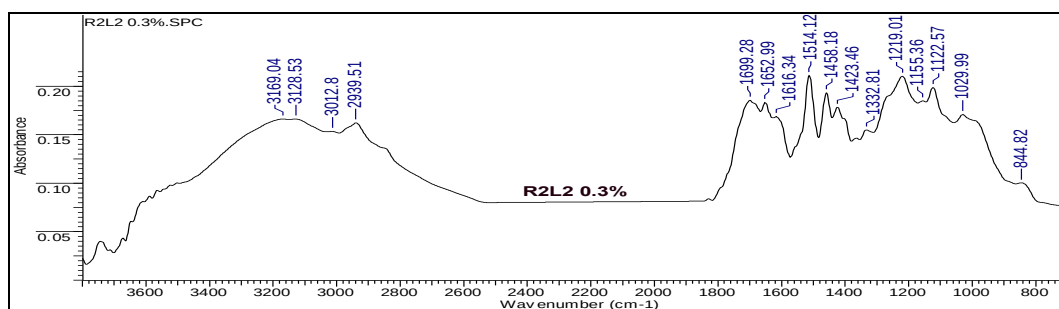
Anexa IV.d. Spectrul IR înregistrat pentru lignina din paie de grâu recuperată din mediul de cultură a experimentului notat R2L10.8%;



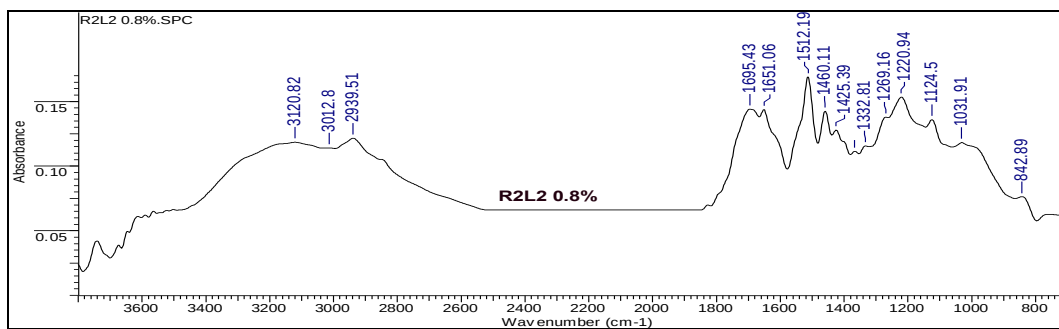
Anexa IV.e. Spectrul IR înregistrat pentru lignina din iarbă recuperată din mediul de cultură rezidual propriu experimentului notat R1L20.1%;



Anexa IV.f. Spectrul FT-IR înregistrat pentru lignina din iarbă recuperată din mediul de cultură rezidual propriu experimentului notat R1L20.5%;



Anexa IV.g. Spectrul FT-IR înregistrat pentru lignina din iarbă recuperată din mediul de cultură rezidual propriu experimentului notat R2L20.3%;



Anexa IV.h. Spectrul FT-IR înregistrat pentru lignina din iarbă recuperată din mediul de cultură rezidual propriu experimentului notat R2L20,8%;

Anexa V:
Intensitățile lungimilor de undă proprii spectrelor FT-IR înregistrate pe ligninele reziduale recuperate din mediul de cultură

Lungimea de undă, cm^{-1}	L1	L2	R1L1 0.1%	R1L1 0.3%	R1L1 0.5%	R1L1 0.8%	R1L2 0.1%	R1L2 0.3%	R1L2 0.5%	R1L2 0.8%	R2L1 0.1%	R2L1 0.3%	R2L1 0.5%	R2L1 0.8%	R2L2 0.1%	R2L2 0.3%	R2L2 0.5%	R2L2 0.8%
843,96	S	M	-	-	-	S	S	M	-	M	-	M	S	S	M	M	M	M
918,11	S	-	P	-	FP	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-
1033,84	M	M	FP	FP	P	P	-	-	P	P	P	P	-	P	P	P	P	P
1103	-	-	-	P	-	-	P	P	-	-	-	P	FP	-	P	-	P	-
1124,5	FP	FP	-	-	P	FP	P	FP	FP	P	FP	FP	FP	FP	P	FP	P	P
1147,64	P	-	P	P	FP	-	P	P	-	-	P	FP	FP	FP	-	P	P	-
1220,94	FP	FP	P	-	P	FP	P	FP	FP	P	-	FP	FP	FP	P	P	P	FP
1265,3	P	P	P	-	-	-	P	FP	FP	P	P	-	P	P	P	-	-	P
1328,95	P	P	-	-	-	M	-	P	P	P	-	-	-	P	-	P	P	P
1365,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	P	P	P	-	P	P
1425,39	P	P	P	M	M	P	P	P	P	P	-	P	P	P	P	P	P	P
1462,04	P	P	P	M	P	P	P	P	FP	P	P	P	P	FP	P	FP	P	P
1512,19	FP	FP	P	M	M	P	FP	FP	FP	FP	P	FP	P	FP	FP	FP	FP	FP
1600,91	P	P	-	-	M	P	-	-	-	M	-	-	-	P	P	P	-	-
1658,78	-	-	P	M	M	P	FP	P	P	P	P	FP	FP	P	FP	P	P	P
1707,0	M	P	-	M	M	-	-	P	P	P	-	-	FP	P	FP	P	P	P
2846,93	M	M	-	-	P	P	P	P	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-
2939,51	M	M	P	-	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
3215,33	-	-	-	-	P	P	P	P	P	P	FP	FP	FP	P	P	P	P	P
3412,07	P	M	FP	P	P	P	-	-	M	P	-	-	-	P	P	P	P	P
3523,94	-	-	-	-	-	-	M	M	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-

P – puternic FP – foarte puternic M – mediu S – slab

Anexa VI:

Cantitățile maxime de biomasă umedă și pigmenți carotenoizi obținute în urma proceselor fermentative prezentate în Capitolul VII

Experiment	Cantitatea de biomasă obținută		Concentrația de pigment biosintetizată	
	Timp, h	Biomasă umedă, g/L	Timp, h	Concentrație pigment carotenoid, μg/g biomasă uscată
R1M	96	25,093	96	2,145
R2M	96	20,725	96	2,383
R1L10.1%	72	16,168	96	0,5118
R1L10.3%	96	17,654	96	1,6514
R1L10.5%	96	17,347	96	2,1021
R1L10.8%	96	21,071	96	0,6213
R1L20.1%	96	14,52	96	0,123
R1L20.3%	72	7,325	96	2,763
R1L20.5%	72	7,892	96	0,334
R1L20.8%	96	7,281	96	1,0409
R2L10.1%	96	16,088	96	2,9073
R2L10.3%	96	16,93	96	2,4129
R2L10.5%	96	16,98	96	3,653
R2L10.8%	72	17,541	96	2,4689
R2L20.1%	96	14,891	96	1,8478
R2L20.3%	96	16,851	96	3,1887
R2L20.5%	96	13,445	96	4,6545
R2L20.8%	96	13,156	96	0,3272

Anexa VII

Semnificația notațiilor utilizate în fermentațiile prezentate în Capitolul VIII

R1AS5Cu0 – Tuplina R1 cultivată în mediu cu extract din 5 g/L *Asclepias syriaca* în absența ionilor de cupru;
R1AS5Cu10 – Tuplina R1 cultivată în mediu cu extract din 5 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 10 mg/L ioni de cupru;
R1AS5Cu25 - Fermentația tulpinii R1 în mediul de cultură ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 25 mg/L ioni de cupru;
R1AS5Cu50 - Fermentația tulpinii R1 în mediul de cultură ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 50 mg/L ioni de cupru;
R1AS5Cu100 - Fermentația tulpinii R1 în mediul de cultură ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 100 mg/L ioni de cupru;
R2AS5Cu0 - Fermentația tulpinii R2 condusă în extract din 5 g/L *Asclepias syriaca* în absența ionilor de cupru;
R2AS5Cu10 - Fermentația tulpinii R2 în mediul de cultură ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 10 mg/L ioni de cupru;
R2AS5Cu25 - Fermentația tulpinii R2 în mediul de cultură ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 25 mg/L ioni de cupru;
R2AS5Cu50 - Fermentația tulpinii R2 în mediul de cultură ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 50 mg/L ioni de cupru;
R2AS5Cu100 - Fermentația tulpinii R2 în mediul de cultură ce conține extract din 5 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 100 mg/L ioni de cupru;
R1AS10Cu0 – Fermentația tulpinii R1 condusă în extract din 10 g/L *Asclepias syriaca* în absența ionilor de cupru;
R1AS10Cu10 – Fermentația tulpinii R1 în mediul de cultură ce conține extract din 10 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 10 mg/L ioni de cupru;
R1AS10Cu25 - Fermentația tulpinii R1 în mediul de cultură ce conține extract din 10 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 25 mg/L ioni de cupru;
R1AS10Cu50 - Fermentația tulpinii R1 în mediul de cultură ce conține extract din 10 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 50 mg/L ioni de cupru;
R1AS10Cu100 - Fermentația tulpinii R1 în mediul de cultură ce conține extract din 10 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 100 mg/L ioni de cupru;
R2AS10Cu0 - Fermentația tulpinii R2 condusă în extract din 10 g/L *Asclepias syriaca* în absența ionilor de cupru;
R2AS10Cu10 - Fermentația tulpinii R2 în mediul de cultură ce conține extract din 10 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 10 mg/L ioni de cupru;
R2AS10Cu25 - Fermentația tulpinii R2 în mediul de cultură ce conține extract din 10 g/L *Asclepias syriaca* în care s-au adăugat 25 mg/L ioni de cupru;

[illegible]

[illegible]

R2S15Cu0 – Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură ce conține extract din 15 g/L semințe de *Vitis vinifera* în absența ionilor de cupru;
R2S15Cu10 – Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură ce conține extract din 15 g/L semințe de *Vitis vinifera* în care s-au adăugat 10 mg/L ioni de cupru;
R2S15Cu25 – Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură ce conține extract din 15 g/L semințe de *Vitis vinifera* în care s-au adăugat 25 mg/L ioni de cupru;
R2S15Cu50 – Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură ce conține extract din 15 g/L semințe de *Vitis vinifera* în care s-au adăugat 50 mg/L ioni de cupru;
R2S15Cu100 – Fermentația tulpinii R2 condusă în mediul de cultură ce conține extract din 15 g/L semințe de *Vitis vinifera* în care s-au adăugat 100 mg/L ioni de cupru;

Anexa VIII:

Condițiile pentru obținerea cantităților maxime a biomasei umede, biosintezei pigmentilor carotenoizi și absorbției ionilor de cupru pentru procesele fermentative prezentate în Capitolul VIII

Experiment	Condiții optime pentru obținerea de biomasă umedă		Condiții optime pentru absorbția de Cu^{2+}		Condiții optime pentru biosinteza de pigment carotenoid	
	Timp, h	Biomasă umedă, g/L	Timp, h	Concentrație Cu^{2+} , mg/L	Timp, h	Concentrație pigment carotenoid, $\mu\text{g/g}$ biomasă uscată
R1AS5Cu0	96	6,692	-	-	96	0,138
R1AS5Cu10	96	8,7	96	7,628	96	0,215
R1AS5Cu25	72	11,218	96	18,947	96	0,392
R1AS5Cu50	72	8,27	96	37,799	96	0,21
R1AS5Cu100	96	9,242	96	71,985	96	0,192
R1AS10Cu0	72	7,465	-	-	96	0,391
R1AS10Cu10	72	7,291	72	7,478	96	0,483
R1AS10Cu25	72	6,391	96	19,774	96	0,518
R1AS10Cu50	72	7,821	96	38,781	96	0,125
R1AS10Cu100	96	10,172	96	84,125	96	0,021
R1AS15Cu0	96	19,612	-	-	96	0,329
R1AS15Cu10	72	24,752	96	7,087	96	1,373
R1AS15Cu25	96	19,7	96	19,552	96	0,576
R1AS15Cu50	96	18,767	96	43,332	96	0,496
R1AS15Cu100	96	15,015	96	85,997	96	0,756
R2AS5Cu0	96	10,108	-	-	96	0,635
R2AS5Cu10	72	8,363	96	7,654	96	0,851
R2AS5Cu25	96	6,868	96	19,457	96	1,597
R2AS5Cu50	96	10,02	96	39,694	96	1,089
R2AS5Cu100	96	8,047	96	83,442	96	1,893
R2AS10Cu0	96	5,779	-	-	96	0,652
R2AS10Cu10	96	10,134	96	6,184	96	0,812
R2AS10Cu25	96	9,219	96	17,556	96	0,835
R2AS10Cu50	72	7,179	96	28,45	96	1,013
R2AS10Cu100	96	10,69	96	89,618	96	0,949
R2AS15Cu0	72	7,107	-	-	96	0,156
R2AS15Cu10	72	8,375	96	7,507	96	0,105
R2AS15Cu25	72	10,032	96	19,559	96	0,811
R2AS15Cu50	72	14,794	96	40,637	96	1,432
R2AS15Cu100	72	13,44	96	86,081	96	1,331
R1M5Cu0	48	6,157	-	-	96	0,381
R1M5Cu10	48	7,968	96	7,351	96	0,425
R1M5Cu25	24	7,358	96	20,128	96	0,912
R1M5Cu50	96	5,553	96	40,163	96	0,712
R1M5Cu100	48	1,651	96	80,105	96	0,815
R1M10Cu0	96	7,17	-	-	96	1,621
R1M10Cu10	96	7,257	96	7,686	96	1,951
R1M10Cu25	96	8,447	96	18,839	96	2,414
R1M10Cu50	96	7,111	96	38,227	96	3,382
R1M10Cu100	96	8,568	96	65,948	96	1,931
R1M15Cu0	96	9,639	-	-	96	6,612
R1M15Cu10	96	8,465	96	5,812	96	3,415

R1M15Cu25	72	6,644	96	21,545	96	2,465
R1M15Cu50	96	8,265	96	38,389	96	2,246
R1M15Cu100	72	7,213	96	76,404	96	1,766
R2M5Cu0	72	5,989	-	-	96	2,815
R2M5Cu10	48	5,747	96	7,774	96	2,125
R2M5Cu25	48	6,39	96	19,397	96	3,282
R2M5Cu50	96	3,803	96	40,466	96	2,895
R2M5Cu100	72	2,891	96	81,449	96	2,981
R2M10Cu0	96	3,556	-	-	96	0,152
R2M10Cu10	48	2,745	96	7,564	96	0,685
R2M10Cu25	48	8,81	96	20,019	96	0,523
R2M10Cu50	72	6,461	96	39,273	96	0,915
R2M10Cu100	72	1,665	96	81,89	96	0,721
R2M15Cu0	24	7,112	-	-	96	1,021
R2M15Cu10	96	6,286	96	7,707	96	1,567
R2M15Cu25	72	7,704	96	18,809	96	1,753
R2M15Cu50	96	6,645	96	39,414	96	2,829
R2M15Cu100	96	6,108	96	70,863	96	1,952
R1S5Cu0	24	6,503	-	-	96	0,632
R1S5Cu10	24	5,811	96	8,066	96	0,851
R1S5Cu25	24	5,938	96	20,848	96	0,532
R1S5Cu50	24	5,644	96	42,24	96	0,981
R1S5Cu100	24	1,924	96	81,538	96	0,803
R1S10Cu0	72	7,797	-	-	96	1,0193
R1S10Cu10	48	8,161	96	8,501	96	0,832
R1S10Cu25	48	7,637	72	20,227	96	0,9354
R1S10Cu50	48	7,442	72	39,67	96	1,215
R1S10Cu100	24	5,804	96	84,739	96	0,352
R1S15Cu0	96	8,078	-	-	96	1,013
R1S15Cu10	96	7,896	96	6,237	96	0,938
R1S15Cu25	96	7,932	96	19,793	96	1,254
R1S15Cu50	96	8,268	96	42,239	96	1,501
R1S15Cu100	72	6,583	96	82,583	96	1,483
R2S5Cu0	72	6,474	-	-	96	0,835
R2S5Cu10	72	6,003	96	8,615	96	0,892
R2S5Cu25	48	6,945	96	19,981	96	1,012
R2S5Cu50	24	6,1	96	36,474	96	0,915
R2S5Cu100	96	5,395	96	65,783	96	1,121
R2S10Cu0	96	5,297	-	-	96	1,132
R2S10Cu10	96	6,184	96	8,056	96	0,938
R2S10Cu25	72	9,457	96	20,65	96	1,741
R2S10Cu50	72	6,894	96	39,875	96	2,012
R2S10Cu100	96	9,882	96	84,229	96	3,621
R2S15Cu0	48	6,742	-	-	96	5,584
R2S15Cu10	72	7,95	96	7,493	96	3,871
R2S15Cu25	96	8,896	96	19,849	96	4,229
R2S15Cu50	96	9,647	96	40,139	96	2,153
R2S15Cu100	72	8,853	96	85,269	96	0,69