



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari



Indirizzo Biotecnologie microbiche agroalimentari

Ciclo XXVI

Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo

dr.ssa Raffaella Cutzu

*Direttore della Scuola
Referente di Indirizzo
Docente Guida*

prof.ssa Alba Pusino
prof. Severino Zara
prof.ssa Ilaria Mannazzu

Anno accademico 2012- 2013

Indice

PREMESSA.....	5
1. INTRODUZIONE.....	7
I CAROTENOIDI.....	8
1.1.1 Caratteristiche chimiche	8
1.1.2 Sintesi dei carotenoidi.....	12
1.1.3 Carotenoidi in vivo.....	14
1.1.4 Funzioni biologiche dei carotenoidi.....	15
1.1.5 Carotenoidi e salute umana.....	16
1.1.6 Produzione di carotenoidi	18
1.1.6.1 Estrazione da fonti vegetali	19
1.1.6.2 Sintesi chimica	19
1.1.6.3 Sintesi microbiologica.....	20
1.1.6.4 Produzione biotecnologia di β -carotene con microrganismi naturalmente carotenogenici	22
1.2 RHODOTORULA	23
1.2.1 Tassonomia e aspetti generali	23
1.2.2. <i>Rhodotorula glutinis</i>	25
1.2.2.1 Fattori che influiscono sulla produzione di carotenoidi	25
1.3 BIBLIOGRAFIA	29
2. CARATTERIZZAZIONE DEL CEPPO PARENTALE C2.5T1 E DEI MUTANTI 400A15 E 200A6.....	33

Raffaela Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

2.1 Introduzione	34
2.2 Materiali e Metodi:	35
2.2.1 Lieviti.....	35
2.2.2 Analisi citofluorimetrica	36
2.2.3 Estrazione dei carotenoidi, identificazione e quantificazione	36
2.2.4 Estrazione, metilazione e quantificazione degli acidi grassi	37
2.3 Risultati	38
2.3.1 Crescita, complessità cellulare e integrità della membrana plasmatica.....	38
2.3.2 Produzione di carotenoidi	39
2.3.3 Produzione di acidi grassi	47
2.4 Discussione	49
2.5 Bibliografia	51
3. ANALISI PROTEOMICA COMPARATIVA DEL PARENTALE C2.5T1 E DEI MUTANTI 400A15 E 200A6	53
3.1 Introduzione	54
3.2 Materiali e metodi	55
3.2.1 Terreni e condizioni colturali	55
3.2.2 Analisi proteomica	56
3.2.2.1 Estrazione delle proteine	56
3.2.2.2 Elettroforesi bidimensionale	56
3.2.2.3 Spettrometria di massa	57
3.2.2.4 Analisi dei dati di spettrometria di massa	58
3.3 Risultati	60
3.3.1 Analisi differenziale 2D-DIGE su replicati tecnici	60
3.3.2 Analisi differenziale 2D-DIGE su replicati biologici.....	64
3.3.3 Identificazione in spettrometria di massa degli <i>spot</i> differenziali	69
3.3.3.1 Identificazioni riguardanti il <i>trend</i> 1	69

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3.3.3.2 Identificazioni riguardanti il <i>trend</i> 2	74
3.3.3.3 Identificazioni riguardanti il <i>trend</i> 3	90
3.4 Discussione	108
3.5 Bibliografia	112
4. MESSA A PUNTO DI UN METODO CITOFLUORIMETRICO PER LA QUANTIFICAZIONE DEL β-CAROTENE IN <i>RHODOTORULA GLUTINIS</i>	113
4.1 Introduzione	114
4.2 Materiali e Metodi	115
4.2.1 Microrganismi e condizioni colturali	115
4.2.2 Estrazione dei carotenoidi e quantificazione per HPLC.....	116
4.2.3 Citofluorimetria.....	116
4.3 Risultati	117
4.4 Discussione	127
4.5 Bibliografia	128
5. INDIVIDUAZIONE DELLE CONDIZIONI CHE OTTIMIZZANO LA PRODUZIONE DI CAROTENOIDI	129
5.1 Introduzione	130
5.2 Materiali e Metodi:	131
5.2.1 Lievito	131
5.2.2 Disegni sperimentali	131
5.2.3 Analisi delle risposte	132
5.3 Risultati	136
5.3.1 Effetto dei fattori glicerolo grezzo, estratto di lievito e peptone sulla produzione di biomassa e carotenoidi.....	136
5.3.2 Effetto dei fattori kLa e C/N su produzione di biomassa e carotenoidi e su dimensione, granularità cellulare e permeabilità delle membrane	137

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

5.4 Discussione.....	143
5.4 Discussione.....	143
5.5 Bibliografia.....	146
6. CONCLUSIONI.....	148

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Premessa

Il lievito *Rhodotorula glutinis* appartiene al *phylum* dei Basidiomiceti che comprende numerose specie di lieviti di notevole interesse biotecnologico.

Questi lieviti sono noti per la produzione di enzimi e di metaboliti primari e secondari e per la capacità di degradare aerobicamente substrati complessi, contaminanti ambientali e xenobiotici. Nonostante ciò i lieviti basidiomiceti sono relativamente poco studiati e caratterizzati. Recentemente è stata pubblicata la sequenza genomica di *Rhodospiridium toruloides*, forma perfetta di *R. glutinis*, e sono state ottenute delle mappe proteomiche di questo lievito al fine di studiarne la via lipidogenica. Per quanto riguarda *R. glutinis*, attualmente è disponibile online solo parte della sua sequenza genomica. Si conoscono pochissime sequenze proteiche, in parte dedotte sulla base delle sequenze genomiche note, e poco è noto della sua fisiologia.

In questo contesto il progetto svolto nel corso dei tre anni di dottorato aveva lo scopo di generare strumenti utili per lo studio della via carotenogenica in *R. glutinis* e l'ottimizzazione della produzione di β -carotene.

Per la realizzazione di questo progetto sono stati utilizzati il ceppo selvatico di *R. glutinis* C2.5t1, selezionato sulla base della sua capacità di produrre carotenoidi su terreno contenente glicerolo come unica fonte di carbonio, e due suoi mutanti primari, 400A15 e 200A6, che differiscono per la produzione di carotenoidi. In particolare, il mutante 400A15 mostra incrementate produzioni di β -carotene, mentre il mutante 200A6 è incapace di produrre pigmenti ed è quindi albino.

Da un lato si è quindi ipotizzato che lo studio comparativo dei tre ceppi avrebbe consentito di individuare gli enzimi coinvolti nella biosintesi dei carotenoidi e contribuito a fare luce sul funzionamento della via carotenogenica in *R. glutinis*. D'altra parte si è pensato di esplorare la possibilità di impiegare il mutante 400A15 per la produzione biotecnologica di β -carotene.

Il lavoro qui presentato si articola quindi in due parti. La prima parte ha riguardato la comparazione dei tre lieviti per comprendere se le mutazioni indotte in 400A15 e 200A6 avessero compromesso la crescita e la produzione di triacil-gliceroli che, come è

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

noto, compete con la via carotenogenica per l'utilizzo dell'acetil-CoA (capitolo 2). Una volta stabilito che i tre ceppi presentano un comportamento analogo per i fenotipi analizzati, e apparentemente differiscono solo per la produzione di carotenoidi, si è proceduto con la loro analisi proteomica comparativa allo scopo di individuare proteine connesse con la via carotenogenica (capitolo 3).

La seconda parte è stata dedicata allo studio dei parametri che incrementano la produzione di β -carotene nel mutante 400A15. La messa a punto di un metodo citofluorimetrico multiparametrico atto a valutare contemporaneamente e in tempo reale sia la produzione di β -carotene, sia lo stato fisiologico delle cellule (capitolo 4) era funzionale alla ricerca dei fattori che consentono di ottimizzare la produzione di β -carotene (capitolo 5).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

1. INTRODUZIONE

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.
Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.
Università degli studi di Sassari

I CAROTENOIDI

I carotenoidi costituiscono la classe di pigmenti più comune in natura. Attualmente si conoscono circa 750 carotenoidi naturali (Britton et al., 2004) che, variamente combinati, sono responsabili del colore giallo, arancione, rosso e viola di vegetali, microrganismi e animali. La sintesi dei carotenoidi è una prerogativa esclusiva di vegetali e di alcuni microrganismi che possiedono un set di geni conservati codificanti gli enzimi della via carotenogenica, mentre gli animali devono acquisirli con l'alimentazione. Questa regola presenta un'interessante eccezione. E' stato infatti riportato che alcuni afidi sono naturalmente in grado di sintetizzare i carotenoidi in quanto esprimono geni fungini della via carotenogenica acquisiti tramite trasferimento orizzontale (Moran e Jarvik, 2010).

1.1.1 Caratteristiche chimiche

La struttura base dei carotenoidi è lo scheletro a 40 atomi di carbonio che ne riflette la biosintesi. Lo scheletro è caratterizzato dalla presenza di doppi legami coniugati e può essere modificato tramite:

- ciclizzazioni a una o entrambe le estremità
- modificazioni delle idrogenazioni
- aggiunta di gruppi funzionali
- ossidazioni

I carotenoidi contenenti uno o più atomi di ossigeno vengono chiamati xantofille.

La nomenclatura dei carotenoidi deriva, secondo le indicazioni della Commission on Biochemical Nomenclature (1971), dal un comune sostantivo "carotene" al quale vengono aggiunte le lettere greche β , ϵ , ϕ , χ , K in relazione al gruppo terminale. La presenza dei doppi legami coniugati conferisce a queste molecole la maggior parte delle loro caratteristiche chimiche e fisiche. Infatti, gli elettroni π sono delocalizzati lungo tutta la catena alifatica e conferiscono alla molecola la forma, la capacità di assorbire

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

luce (colore) e la reattività chimica. Ciascun doppio legame può trovarsi nella forma isomerica cis o trans (Z o E). Tuttavia, poiché la forma cis porta a un ingombro sterico energeticamente sfavorito, si ritrovano per lo più isomeri di tipo trans, più stabili. Inoltre, la massima stabilità si ha quando i doppi legami risultano complanari; quindi la configurazione più stabile della molecola è quella che prevede la catena alifatica distesa (Britton, 1995). Per esempio nel caso del β - β carotene (Fig. 1) è possibile la rotazione attorno al legame singolo C-6,7 ma la presenza di un doppio legame C-5,6 coniugato con la catena alifatica favorisce la complanarità dell'anello con la catena. Tuttavia una rotazione di 40° dalla planarità è necessaria per alleviare la tensione sterica tra il sostituente metilico in C5 e l'atomo di idrogeno in C8 della catena. La presenza di gruppi funzionali inoltre può influire sulla forma della molecola (Britton, 1995).

A causa della presenza di una lunga catena carboniosa con doppi legami coniugati i carotenoidi sono lipofili tranne qualche eccezione. Sono quindi, praticamente insolubili in acqua ma sono solubili in solventi organici come acetone, etere etilico, cloroformio, etil acetato, dimetilsolfossido, etere di petrolio, esano e toluene.

I doppi legami coniugati costituiscono la parte cromofora della molecola e determinano l'assorbimento nello spettro del visibile perché l'energia necessaria per eccitare tali elettroni ricade nella regione dello spettro compresa tra 400 e 500 nm. L'assorbanza è caratteristica di ciascuna molecola e ne consente l'identificazione e la quantificazione.

La maggior parte dei carotenoidi assorbe a tre lunghezze d'onda il cui valore aumenta proporzionalmente al numero di doppi legami coniugati. Perché la molecola sia colorata sono necessari 7 doppi legami coniugati. Pertanto il fitoene (3 doppi legami coniugati) e il fitofluene (5 doppi legami coniugati) sono incolori e hanno un massimo di assorbimento a lunghezze d'onda di 276, 286, e 297 nm e di 331, 348, e 367 nm rispettivamente, in etere di petrolio (Britton, 1995). Il licopene invece, con i suoi 11 doppi legami coniugati, è rosso e ha tre lunghezze d'onda massime di assorbimento a 444, 470, e 502 nm in etere di petrolio. La presenza di anelli e di funzioni ossigenate cambia la lunghezza d'onda massima di assorbimento. Il risultato della ciclizzazione, per esempio, porta ad un ingombro sterico tra il gruppo metilico in C-5 dell'anello e

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

l'atomo di idrogeno appartenente al doppio legame fuori dal piano con quelli della catena. Come conseguenza si osservano lo shift ipsocromico (spostamento dal massimo al minimo della lunghezza d'onda), effetto ipsocromico (diminuzione dell'assorbanza) e perdita della struttura fine (spettro con picchi meno definiti) (Rodriguez-Amaya e Kimura, 2004). Perciò il β -carotene, che possiede lo stesso numero di doppi legami coniugati del licopene ma ha in più 2 anelli, è giallo-arancione e mostra un massimo di assorbimento a 450 e 477 nm e una spalla a 425 nm in esano. L'assorbimento inoltre è strettamente dipendente dal solvente. In tabella 1 sono riportate le lunghezze d'onda di assorbimento massimo di alcuni carotenoidi in alcuni solventi. La lunghezza d'onda massima di assorbimento risulta pressoché uguale in diversi solventi (etere di petrolio, esano, dietiletere, acetonitrile) ma può differire in altri (Britton, 1995).

Il fatto che i carotenoidi obbediscano alla legge di Lambert e Beer e che la loro assorbanza sia direttamente proporzionale alla concentrazione in un determinato solvente ne permette la quantificazione spettrofotometrica.

La presenza dei gruppi terminali e delle loro reazioni sono quindi importanti per la caratterizzazione. Le reazioni chimiche dei carotenoidi che spontaneamente accadono in natura, invece, riguardano specialmente la catena alifatica. Il calore, la luce e gli acidi possono indurre l'isomerizzazione dalla forma trans a quella cis. Inoltre, la disponibilità di elettroni π rende la catena alifatica disponibile ad attacchi da parte di agenti elettrofili e rende i carotenoidi sensibili alle ossidazioni e ai radicali liberi. L'ossidazione è in relazione alla disponibilità di ossigeno e può essere favorita dalla luce, dagli enzimi, dai metalli e dagli idroperossidi lipidici. La formazione di epossidi e di apocarotenoidi (carotenoidi a corto scheletro carbonioso) sono le prime fasi della degradazione dei carotenoidi. Successivamente si ottiene una vasta gamma di molecole a basso peso molecolare simili a quelle ottenute nell'ossidazione degli acidi grassi.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

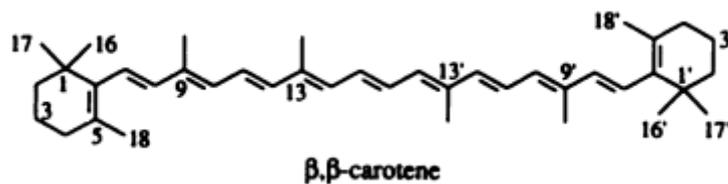


Figura 1. Struttura base e schema numerico del β,β -carotene. Tratto da Britton (1995)

Tabella 1: Lunghezze massime di assorbimento di alcuni carotenoidi in solventi organici.

	λ_{\max}	Solvente	$E^{1\%}_{1\text{cm}}$	λ
β-β carotene	425 450 477 nm	Esano	2592	453
	425 448 475 nm	Etere di petrolio	2592	453
	429 452 478 nm	Acetone	2620	450
	435 461 485 nm	Cloroformio	2396	465
	427 449 475 nm	Etanolo	2620	453
γ carotene	437 462 492 nm	Esano		
	437 462 494 nm	Etere di petrolio	2760	462
	439 461 491 nm	Acetone	3100	462
	446 475 509 nm	Cloroformio		
	440 460 489 nm	Etanolo		
Torulene	458 487 519 nm	Esano		
	460 484 518 nm	Etere di petrolio		
	467 501 537 nm	Cloroformio	3240	480
	456 486 520 nm	Etanolo		
Torularodina	507 535 nm	Etere di petrolio		
	483 515 554 nm	Cloroformio	2040	507
	463 495 532 nm	Etanolo	1932	515
	460 493 529 nm	Metanolo		

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

1.1.2 Sintesi dei carotenoidi

I carotenoidi sono terpeni perciò la loro sintesi inizia con la sintesi della catena isoprenica. Il precursore è l'acido mevalonico che si ottiene a partire dall'Acetil-CoA tramite la via dell'acido mevalonico (MVA). La prima reazione è una condensazione di 3 molecole di Acetil-CoA a produrre una molecola di 3-idrossimetil 3-glutaril-CoA che in seguito a riduzione nel citoplasma da parte dell'enzima idrossi metilCoA riduttasi genera il mevalonato. Questo viene fosforilato formando così il mevalonil pirofosfato. Simultaneamente avvengono una reazione di eliminazione e decarbossilazione concertata che portano al D₃-isopentenilpirofosfato (IPP). Questa è l'unità isoprenica che, per trasposizione protonica, si trasforma nel 3,3-dimetilallil-pirofosfato (DMAPP) che è l'effettivo agente alchilante nella biosintesi degli isoprenoidi. Questa via è presente in animali, funghi, piante e alcuni batteri. Esistono comunque in batteri e in organismi fototrofi vie alternative a quella del mevalonato come la via del metileritritolo fosfato/deossixilulosio fosfato (via MEXP/DXP) che portano alla sintesi di IPP e DMAPP.

I monoterpeni (terpeni con dieci atomi di carbonio) si originano per alchilazione del precursore DMAPP. Questa avviene per eterolisi del DMAPP che comporta la formazione del carbocatione alchilico, l'attacco del doppio legame al C, la formazione del C terziario, la perdita del protone e la conseguente formazione del geranilpirofosfato (GPP) composto a 20 atomi di C. Poiché il GPP è un estere allilico può subire l'attacco di una molecola di IPP dando il farnesil pirofosfato. A questo può essere aggiunta un'ulteriore unità IPP portando alla formazione del geranil-geranil pirofosfato. Il geranil-geranil pirofosfato (GGPP) è il precursore dei carotenoidi la cui biogenesi inizia con l'accoppiamento "testa a testa" di due molecole di GGPP a dare il fitoene, una molecola incolore con 40 atomi di carbonio e 3 doppi legami (Stephen, 2006).

L'enzima che catalizza questa reazione, la fitoene sintasi, è conservato in diversi organismi, dai batteri alle piante (codificato dai gene *crtB* e *psy* rispettivamente). È un enzima monomero di 35-39 kDa, è associato alla membrana e necessita di cationi divalenti. Il fitoene viene quindi sottoposto a deidrogenazione.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

L'introduzione di un ulteriore doppio legame porta alla sintesi del fitofluene. Questa reazione di insaturazione è catalizzata dalle fitoene deidrogenasi (Sieiro et al., 2003). Questi sono enzimi associati alle membrane dal peso molecolare di 53–69 kDa e l'isoforma più pesante (62–69 kDa) è di origine fungina. Possono essere suddivisi in due gruppi che differiscono sia per l'origine che per i prodotti di reazione. Al primo gruppo appartengono quelli di alghe e cianobatteri, codificati dal gene *crtP*, e che effettuano sia la prima deidrogenazione del fitoene al fitofluene sia una seconda deidrogenazione del fitofluene a dare come prodotto finale lo ζ -carotene (Sieiro et al., 2003).

Del secondo gruppo fanno parte le fitoene deidrogenasi di eubatteri, archea e funghi. Queste sono codificate dal gene *crtI* e catalizzano quattro deidrogenazioni per volta fino alla formazione del licopene che presenta 11 doppi legami coniugati (Sieiro et al., 2003).

Tra le deidrogenasi esistono delle eccezioni: in *Rhodobacter capsulatus* e in *Rhodobacter sphaeroides* questo enzima catalizza 3 sole deidrogenazioni dando come prodotto principale il neurosporene; in *Neurospora crassa* catalizza 5 deidrogenazioni a formare il 3,4-dihydrolicopene come intermedio nella formazione del torulene. Il substrato di queste deidrogenasi quindi non è molto specifico. Nonostante catalizzino la stessa reazione queste deidrogenasi non sono conservate nelle diverse specie probabilmente in seguito ad un processo di coevoluzione. Infatti utilizzano cofattori diversi (NADP o FAD) e sono sensibili a inibitori diversi (erbicidi o difenilammina). Nella maggior parte dei microrganismi la ciclizzazione del licopene avviene ad opera delle licopene ciclasi con anelli β o ϵ a una o ad entrambe le estremità della molecola. Questo può comportare una variazione nel numero totale dei doppi legami ma non nel numero doppi legami coniugati (Sieiro et al., 2003).

Esistono diversi tipi di licopene ciclasi originatisi per coevoluzione. Negli eubatteri, archea e funghi l'enzima è codificato dal gene *crtY* e ha peso molecolare di 43 kDa. Negli organismi fotosintetici sono codificati dal gene *crtL*, e hanno peso molecolare di 46 -56 kDa.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

La maggiore dimensione dell'enzima *crtL* è dovuta alla presenza di un peptide segnale per direzionare il trasporto al cloroplasto.

Le licopene ciclasi si differenziano nella struttura primaria ma presentano sempre 3 regioni conservate (Tab. 2) (Sieiro et al., 2003).

In *Xanthophyllomyces dendrorhous* la licopene ciclasi viene codificata da *crtYB* (Verdoes et al., 1999). Si tratta in questo caso di un enzima bifunzionale con attività fitoene sintasica all'estremità carbossi-terminale e licopene ciclasica a quella ammino-terminale. Enzimi simili a questo sono stati trovati anche in altri organismi. Viene codificato dal gene *carRP* in *Mucor circinelloides*, da *al-2* in *Neurospora crassa* e da *carRA* in *Phycomyces blakesleanus* (Sieiro et al., 2003).

Tabella 2. Regioni conservate delle licopene ciclasi.

Regione	Sequenza conservata	Funzione
1	DX ₄ GXGXAX ₄ A	legami dei cofattori
2	FXYX ₄ SX ₆ EXT	sequenza consenso I
3	GX ₂ AX ₃ HPX ₂ GY	sequenza consenso II, idrofoba, dominio transmembrana

1.1.3 Carotenoidi in vivo

Il comportamento dei carotenoidi in vivo differisce da quello in vitro in quanto le molecole si trovano in un sistema più complesso costituito, nel caso delle membrane biologiche, da proteine e lipidi.

Nelle membrane i carotenoidi assumono in genere una determinata posizione che vede la catena alifatica adiacente a quella dei lipidi di membrana; tuttavia la polarità, la grandezza e la forma della molecola del carotenoide influiscono sul suo assestamento nella membrana e sulla sua ripartizione nei diversi compartimenti subcellulari.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Per esempio il β -carotene e il licopene si inseriscono interamente nella parte interna del doppio strato lipidico (idrofobica) e mantengono un certo grado di mobilità.

I carotenoidi con funzioni polari dovranno necessariamente disporre tali funzioni nella regione idrofila della membrana. Inoltre l'inserimento di carotenoidi nella membrana determinerà una maggiore rigidità della membrana, nel caso di carotenoidi polari, e maggiore fluidità, nel caso di carotenoidi apolari. Anche la permeabilità della membrana alle molecole di acqua e ossigeno può essere influenzata.

Questa sorta di compartimentazione rende i carotenoidi più o meno disponibili alle reazioni. Pertanto il β -carotene, per esempio, sarà maggiormente attivo in reazioni intramembranarie. In alcuni vegetali i carotenoidi possono aggregarsi in cristalli nei cromoplasti come per esempio il licopene nei pomodori. L'aggregazione cambia le caratteristiche chimico fisiche dei carotenoidi e la biodisponibilità. Anche la vicinanza di altre molecole come le proteine e i lipidi ne cambia le caratteristiche; altresì la presenza di carotenoidi può influenzare l'ambiente circostante (Britton et al., 2008; Landrum, 2009).

1.1.4 Funzioni biologiche dei carotenoidi

Negli organismi fotosintetici come le piante e le microalghe i carotenoidi svolgono diversi ruoli: (i) pigmenti accessori durante la fase luminosa della fotosintesi e protezione dell'apparato fotosintetico dalla luce in eccesso; (ii) scavenging delle specie reattive dell'ossigeno e di altri radicali liberi; (iii) precursori nella sintesi dell'acido abscissico, ormone con importanti ruoli nella fisiologia delle piante.

Negli organismi non fotosintetici: (i) svolgono azione antiossidante in particolare nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno; (ii) sono precursori delle vitamine; (iii) hanno un ruolo importante come pigmenti ornamentali coinvolti nel corteggiamento in alcuni animali superiori. Per esempio nei fenicotteri la livrea rosa è dovuta alla presenza di carotenoidi assunti con la dieta. Probabilmente la colorazione della livrea costituisce un indicatore di salute dell'individuo favorendolo nella scelta da parte del partner; (iv) hanno azione fotoprotettiva (Britton et al., 2008; Lee et al., 2000; Stahl et al., 2000).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

1.1.5 Carotenoidi e salute umana

Diversi fattori influenzano l'assorbimento dei carotenoidi. Innanzitutto le caratteristiche fisico-chimiche della molecola che ne condizionano il posizionamento nelle membrane, l'interazione con le proteine e quindi la loro biodisponibilità (Britton et al., 2009). Inoltre, è necessario considerare il tipo di alimento e la composizione lipidica della matrice in cui si ritrova il carotene. Una volta rilasciata dalla matrice alimentare, la molecola di carotenoide viene solubilizzata in micelle nel lume intestinale dove avviene l'assorbimento da parte delle cellule della mucosa intestinale. Questo processo è tempo-dipendente, concentrazione-dipendente e va incontro a saturazione. Affinché i carotenoidi vengano distribuiti nei vari distretti dell'organismo devono essere veicolati dai chilomicroni che incorporano i carotenoidi con un meccanismo dose dipendente, sensibile alla saturazione (During et al., 2002).

I carotenoidi possono agire mantenendo la loro struttura chimica, reagire con altre molecole oppure essere modificati in composti attivi.

Tra le funzioni fisiologiche dei carotenoidi vi è quella di precursore della vitamina A. La vitamina A si presenta in tre diverse forme: alcolica (retinolo), aldeidica (retinaldeide) ed acida (acido retinoico). È necessaria per la vista, lo sviluppo embrionale, la crescita e la salute della pelle (differenziazione delle cellule epiteliali). La sua deficienza porta a diverse patologie quali cecità notturna, glaucoma e retinite pigmentosa (Berson, 2000). Gli animali sono incapaci di sintetizzare la vitamina A e quindi sono costretti ad assumerla con l'alimentazione in forma di vitamina A (alimenti di origine animale) o come provitamina, ossia, come carotenoide (alimenti di origine vegetale). I carotenoidi con attività provitaminica sono: α -, β -, γ -carotene e β -criptoxantina. I carotenoidi possono essere convertiti in retinoidi da una famiglia ancestrale di ossigenasi, fondamentali per molti processi fisiologici nelle piante e gli animali. I mammiferi per esempio codificano tre enzimi appartenenti a questa famiglia. Un enzima è presente nell'epitelio pigmentato retinico. Tale proteina di 65kDa (RPE65) che è essenziale per la vista, è indispensabile per l'isomerizzazione da trans a cis.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Gli altri due membri della famiglia sono ossigenasi che catalizzano la scissione ossidativa di doppi legami di carotenoidi e sono espressi in vari tessuti e tipi di cellule (Amengual et al., 2011).

Recenti studi dimostrano la capacità protettiva dei carotenoidi nei confronti di patologie croniche e degenerative. Questa capacità dei carotenoidi è dovuta sia alla loro capacità di proteggere la cellula dallo stress ossidativo cui sono soggette le membrane (McNulty et al., 2007) ma anche al coinvolgimento nei processi del controllo del differenziamento e della proliferazione cellulare (Bertram, 1999). I carotenoidi, infatti, potrebbero stimolare l'espressione di geni direttamente coinvolti nella regolazione dei processi di comunicazione cellulare in particolare delle gap-junctions (Bertram, 1999; Guerin et al., 2003).

Poiché la comunicazione tra cellule del sistema immunitario è fondamentale per il loro corretto funzionamento, il precedente meccanismo di azione carotenoidi potrebbe essere correlato all'effetto immunomodulatore dei carotenoidi. Infatti alte dosi di β -carotene aumentano il rapporto di linfociti CD4:CD8 (Olson, 1999). Anche la capacità protettiva dei carotenoidi nei confronti di alcuni tipi di tumore potrebbe essere dovuta alla attività immunostimolante (Hughes, 1999) e alla capacità di proteggere i tessuti dai radicali liberi che si formano nella fagocitosi (Erickson et al., 2000). Uno studio condotto in Cina su popolazioni con carenze nutrizionali di carotenoidi rivelano però che in soggetti a rischio come fumatori e persone esposte all'asbesto la somministrazione di β -carotene può aumentare il rischio di cancro. Questo potrebbe essere dovuto alla generazione di metaboliti secondari che promuovono lo stress ossidativo (Vilchez et al., 2011).

Lo stress ossidativo e l'infiammazione sono tra le cause che contribuiscono all'insorgenza di malattie cardiovascolari. Infatti lo stress ossidativo indotto dalle specie reattive dell'ossigeno può causare l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL). I carotenoidi, contrastando l'ossidazione lipidica, agirebbero come protettori delle LDL (Dugas et al., 1999). Anche Palozza et al. (2008) hanno dimostrato che i carotenoidi hanno una significativa attività antiossidante nei confronti dell'ossidazione del colesterolo.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

La maggior attività antiossidante è esercitata dall' astaxantina e in ordine decrescente da cantaxantina, luteina e β -carotene (Palozza et al., 2008).

Studi epidemiologici sull'integrazione alimentare di carotenoidi indicano che tali molecole possono ridurre il rischio di infarto miocardico e patologie connesse (Leppala et al., 2000).

In particolare elevate quantità di licopene plasmatiche sono inversamente correlate a malattie coronariche (Kristenson et al., 1997), infarto del miocardio (Kohlmeier et al., 1997) e rischio di arteriosclerosi (Klipstein-Grobush et al., 2000). Invece, bassi livelli plasmatici di luteina sono stati associati al rischio di infarto miocardico (Street et al., 1994).

1.1.6 Produzione di carotenoidi

Poiché i carotenoidi forniscono fotoprotezione alla pelle contro i raggi UV, sono scavengers delle specie reattive dell'ossigeno, possiedono proprietà anti-infiammatorie, sono fondamentali per la salute dell'occhio, hanno azione protettiva contro le malattie croniche e degenerative, spesso sono indicati come integratori alimentari. Infatti la cottura dei cibi, la loro compartimentazione all'interno di strutture cellulari come i cloroplasti, ne limitano l'assorbimento e quindi la biodisponibilità.

I carotenoidi sono utilizzati come conservanti nei prodotti cosmetici e, in combinazione con altre sostanze antiossidanti, anche in creme e lozioni per la protezione solare. Inoltre, poiché la degradazione dei carotenoidi porta a molecole più piccole che sono responsabili in parte della profumazione dei fiori e dei frutti ma anche di odori tipici del tabacco e del tè, questi pigmenti vengono impiegati anche nell'industria dei profumi.

Nell'industria alimentare e mangimistica sono utilizzati sia come coloranti che come antiossidanti.

Per tutte queste ragioni i carotenoidi e in particolare il β carotene, sono molecole ad elevato valore commerciale.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

La produzione del β -carotene può avvenire: (i) per estrazione da prodotti vegetali; (ii) per sintesi chimica; (iii) per sintesi microbica.

I vari metodi portano a percentuali differenti di isomeri cis e trans (Britton et al., 1996).

1.1.6.1 Estrazione da fonti vegetali

Il β -carotene venne isolato da Wackenroder nel 1931 in forma di cristallo rosso dalle carote. Fino al 1950, quando vennero messi a punto processi chimici per la produzione del β -carotene, la fonte principale di β -carotene rimasero i vegetali. Anche oggi una parte importante dei consumatori predilige l'uso di β -carotene estratto da fonti vegetali. L'estrazione avviene per macerazione della massa vegetale in solventi polari quali esano, acetone, etil acetato, etil lattato, etanolo (Dias Ribeiro et al., 2011).

Nonostante si possa estrarre β -carotene con un buon grado di purezza da fonti vegetali, il processo produttivo presenta degli svantaggi legati alla necessità di utilizzare notevoli quantità di materia prima e alla stagionalità della stessa.

1.1.6.2 Sintesi chimica

Il carotene di β -carotene è stato prodotto dalla Roche a partire dal 1954 e dalla Badische Anilin- & Soda-Fabrik (BASF) dal 1960. Nonostante le compagnie utilizzino processi differenti hanno in comune lo stesso precursore, il β -ionone. Inizialmente questo precursore veniva ricavato dall'olio di citronella (*Cymbopogon ciratus*) dal quale si ottiene il citrale e poi il β -ionone. Oggi il β -ionone viene sintetizzato a partire dall'acetone o dal butadiene (Isler, 1971; Britton et al., 1996).

Nella prima produzione industriale della Roche veniva usata la sintesi $C_{19} + C_2 + C_{19}$ nella quale la catena polienica veniva ottenuta con reazioni di accoppiamento di Grignard, eliminazioni e parziale idrogenazione. Successivamente è stata sviluppata una sintesi più efficiente della C_{19} basata sulla condensazione enolo-etero. Questo permette l'aggiunta di due atomi di carbonio per volta all'aldeide coniugata e quindi il raggiungimento del carotenoide della lunghezza desiderata (Britton et al., 1996; Isler, 1971).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

La BASF utilizza invece la condensazione di Witting ($C_{20} + C_{20}$) nella quale i sali di fosfonio, precedentemente derivatizzati con trifenilfosfina, reagiscono con un'aldeide, generando un doppio legame e allungando la catena polienica.

Oggi il metodo più efficiente per la produzione di carotenoidi simmetrici rimane la condensazione di Witting.

La maggior parte del β -carotene di sintesi viene prodotto dalla DSM (Freeport Texas) e dalla BASF, Roche, Merk, Rhône-Poulenc (Dias Ribeiro et al., 2011).

1.1.6.3 Sintesi microbiologica

L'interesse alla produzione biotecnologica di β -carotene è dovuta alla possibilità di produrre β -carotene da fonti naturali e a basso costo ma anche al fatto che, nonostante il β -carotene di sintesi e quello naturale abbiano la stessa struttura polienica, la produzione biotecnologica di β -carotene comporta anche la produzione di piccole concentrazioni di altri carotenoidi che portano benefici alla salute.

I carotenoidi possono essere sintetizzati naturalmente sia da microrganismi fotosintetici come le alghe e i cianobatteri, sia da microrganismi non fotosintetici come batteri, funghi e lieviti (Dias Ribeiro et al., 2011).

Microalghe

Le microalghe costituiscono una ottima fonte di carotenoidi. Tra quelle che producono β -carotene la più conosciuta è *Dunaliella*. Questa è una microalga alotellerante che accumula grandi quantità di β -carotene nei cloroplasti. In media, in appropriate condizioni colturali, produce 400 mg di β -carotene per area di crescita (m^2) al giorno, cioè fino al 10-14% del peso secco di *Dunaliella salina* e *Dunaliella bardawil* (Dufossé et al., 2005). La carotenogenesi in tale microalga è attivata da agenti stressogeni tra cui elevate concentrazioni saline, carenza o assenza di azoto o fosforo. Il β -carotene prodotto è un misto di isomeri *cis* e *trans*: 10% 15-*cis*- β -carotene, 41% 9-*cis*- β -carotene, 42% *trans*- β -carotene, 6% di altri isomeri. Sono prodotti anche altri carotenoidi tra i quali luteina nella quantità del 15% rispetto ai carotenoidi totali (Dias Ribeiro et al., 2011).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Batteri

Alcuni batteri sono naturalmente in grado di sintetizzare β -carotene. Per esempio il *Flavobacterium multivorum* produce 2,9 mg/g di carotenoidi totali di cui 82% β -carotene (Bhosale e Berstein, 2004). Sono stati inoltre ingegnerizzati diversi batteri per la produzione di β -carotene. Per esempio *Escherichia coli*, ingegnerizzato con geni di *Erwinia uredovora* e *Erwinia herbicola*, è in grado di produrre in bioreattore fino a 390 mg/l di β -carotene (Kim et al., 2006). Lo stesso batterio se ingegnerizzato con geni di *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* 465 mg/L di β -carotene coltivati per dopo 120 ore di coltivazione (Yoon et al., 2009).

Funghi filamentosi

Tra i funghi filamentosi i più conosciuti per la produzione di β -carotene sono *Blakeslea trispora* e *Phycomyces blakesleanus*. In questi la carotenogenesi viene indotta dall'acido trisporico, stress ambientali (luce blu) e chimici (retinolo, surfattanti e generatori di stress ossidativo). Per esempio la somministrazione di 1% n-dodecano e 0.1% Span 20 aumenta la produzione di β -carotene in *B. trispora* da 335 a 596 mg/l (Dias Ribeiro et al., 2011).

Lieviti

I lieviti che producono carotenoidi sono chiamati "red yeasts". Appartengono a diversi generi tra cui *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Phaffia* e *Xantophyllomyces*.

Rhodotorula produce β -carotene, torularodina e torulene in proporzioni variabili a seconda della composizione del mezzo colturale. *Sporobolomyces* presenta un profilo di produzione dei carotenoidi simile a quello di *Rhodotorula*.

Per quanto riguarda la produzione ricombinante di carotenoidi, sono stati ottenuti buoni risultati esprimendo in *Saccharomyces cerevisiae* geni del lievito *Xantophyllomyces dendrorhous*. In questo caso la produzione totale di carotenoidi era pari a 11.3 mg/g di cui 52% di β -carotene e il 48% di fitoene (Verwaal et al. 2007)

I carotenoidi sono metaboliti secondari.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Infatti i lieviti iniziano la loro biosintesi nella tarda fase logaritmica e continuano l'accumulo nella fase stazionaria.

La possibilità di coltivare il lievito su substrato a basso costo ne rende l'impiego per la produzione di β -carotene economicamente competitivo rispetto ad altre produzioni (Frengova e Beshkova, 2009).

1.1.6.4 Produzione biotecnologia di β -carotene con microrganismi naturalmente carotenogenici

La sintesi microbiologica del β -carotene è stata presa in considerazione già dalla seconda metà del secolo scorso da Grob and Büttler nel 1954; da Goodwin nel 1958; da Lotspeichet et al. nel 1959 (Chichester 1966). Lilly e collaboratori nel 1960 hanno ottenuto 4 mg di β -carotene per grammo di micelio secco di *Phycomyces blakesleanus*. Mentre Ciegler et al., (1962) riportano una resa di 17,5 mg di β -carotene per grammo di biomassa di *Blakeslea trispora* (Chichester, 1966).

Nel 1954 fu commercializzato il primo carotenoide estratto da *Cryptococcus*. Nel 1963 iniziò la produzione di carotenoidi dalla specie *Rhodotorula*. Negli anni 1970 venne isolata l'astaxantina dal lievito *Phaffia rhodozima* coltivato su essudati di alberi decidui. Tra la fine del 1970 e gli inizi del 1980 iniziò la produzione di β -carotene con *Dulianella salina* (Joshi et al., 2003). Nel 1995 avvenne la prima produzione europea di β -carotene in *Blakeslea*. La Commissione Europea "Health and Consumer Protection Directorate General" ha ritenuto che il β -carotene prodotto per in tale maniera sia equivalente a quello prodotto per sintesi chimica industriale e pertanto possa essere utilizzato come colorante alimentare.

Oggi la produzione biotecnologica di β -carotene avviene utilizzando la microalga *Dunaliella* e il fungo *Blakeslea trispora* (Dufossé, 2005). Nel 2005 l'India aveva una grande industria di produzione β -carotene (Parry's agro Ltd.) basata sulla coltivazione di microalghe. Nel 2005 anche le seguenti imprese usavano *Dunaliella* per produrre β -carotene a fini commerciali: Betatene Ltd (Cheltenham, Vie. 3192, Australia, a division of Cognis Ltd, Australia), Cyanotech Corp. (Kailua-Kona, HI 96740, USA), Inner

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Mongolia Biological Eng. Co. (Inner Mongolia, 750333, P. R. China), Nature Beta Technologies (NBT, Ltd, Eilat 88106), Israel, a subsidiary of Nikken Sohonsa Co.(Gifu, Japan), Tianjin Lantai Biotechnology, Ine. (Nankai, Tianjin, incollaboration with the Salt Scientific Research Institute of Light Industry Ministry, P. R. China), Western Biotechnology Ltd. (Bayswater, WA 6053), Aqua Carotene Ltd (Subiaco, W A 6008, Australia).

Piccoli impianti produttivi erano situati in Chile, Mexico, Cuba, Iran, Taiwan, and Giappone (Dufossé et al., 2005).

La DSM (Koninklijke DSM N.V., the Netherlands) produce β -carotene utilizzando il fungo *Blakeslea trispora*.

1.2 RHODOTORULA

1.2.1 Tassonomia e aspetti generali

Kingdom: Fungi
 Phylum: Basidiomycota
 Class: Urediniomycetes
 Order: Sporidiales
 Family: Sporidiobolaceae
 Genus: *Rhodotorula*

Appartengono al genere *Rhodotorula* basidiomiceti caratterizzati da cellule sferoidali, ellissoidali od ovoidali e da riproduzione vegetativa con gemmazione multilaterale o polare e rapida velocità di crescita. Al genere *Rhodotorula* sono ascritte specie che differiscono nell'assimilazione di nutrienti, nella composizione dei pigmenti e nella morfologia (alcune specie si distinguono per la formazione di ife o pseudoife).

Le specie del genere *Rhodotorula* sono: *R. acheniorum*, *R. acuta*, *R. araucariae*, *R. armeniaca*, *R. aurantiaca*, *R. auriculariae*, *R. bacarum*, *R. bogoriensis*, *R. buffonii*, *R. diffluens*, *R. ferulica*, *R. foliorum*, *R. fragaria*, *R. fujisanensis*, *R. futronensis*,

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

R. glutinis, *R. graminis*, *R. hinnulea*, *R. hordea*, *R. hylophila*, *R. ingeniosa*, *R. javanica*, *R. lactosa*, *R. lignophila*, *R. marina*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa*, *R. muscorum*, *R. nothofagi*, *R. philyla*, *R. phylloplana*, *R. pilati*, *R. pustula*, *R. sonckii*.

La prima specie del genere *Rhodotorula* ad essere descritta fu *Rhodotorula glutinis* da Harrison nel 1928. Nel 1963 Banno ne scoprì lo stato perfetto collocando questo lievito tra i Basidiomiceti col nome di *Rhodosporidium toruloides*. La specie ha due varietà: *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* e *Rhodotorula glutinis* var. *dairenensis*.

La varietà *glutinis* è la specie tipo del genere, mentre la varietà *dairenensis* benché simile alla *glutinis*, si distingue da quest'ultima per la capacità di assimilare debolmente il nitrato, l'incapacità di assimilare il 2-keto-D-glutarato e ed è richiesta la tiamina per la crescita. Inoltre la varietà *dairenensis* è filogeneticamente più vicina a *R. mucilaginosa* che a *R. glutinis*. *R. glutinis* è la forma imperfetta di almeno 3 specie: *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodosporidium sphaerocarpum*, *Rhodosporidium diobovatum* (Kurtzman, 2011).

È un lievito ubiquitario: lo si ritrova in aria, suolo, laghi, oceani. *R. glutinis* e *R. mucilaginosa* sono stati ritrovati in alimenti quali pollame fresco, gamberi, pesce e carne di manzo, sui formaggi e sulla superficie del burro, sui semi oleaginosi, sul cacao e nelle spezie. Nelle olive fermentate, poiché produttore di poligalatturonasi, *Rhodotorula* è responsabile del rammollimento dei tessuti della drupa. *Rhodotorula* può colonizzare piante, umani e altri mammiferi. Considerato da sempre come un lievito non patogeno, negli ultimi decenni è stato annoverato tra i patogeni emergenti, soprattutto in organismi dal sistema immunitario compromesso (Miceli et al., 2011).

R. glutinis non ha capacità fermentative ed è dotato essenzialmente di metabolismo respiratorio. Ha capacità di produrre carotenoidi quali β -carotene, torulene e torularodina. Inoltre per la tendenza ad accumulare lipidi in determinate condizioni colturali viene considerato un lievito oleaginoso.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

1.2.2. *Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula glutinis è conosciuto come lievito carotenogenico per la produzione di pigmenti quali β -carotene, torulene e torularodina e come lievito oleaginoso per la sua capacità di accumulare lipidi (Perrier et al., 1995).

La produzione di carotenoidi inizia alla fine della fase logaritmica di crescita e aumenta rapidamente fino alla fine della fase stazionaria (Buzzini e Martini 1999; El Banna et al., 2011, Frengova et al., 1997).

L'interesse industriale per questo lievito è comunque legato anche alla sua capacità di produrre biomassa e diversi enzimi. Rubio et al. (2002) riportano la produzione di una invertasi, la β -d-fructofuranoside fructohydrolase, di particolare interesse per la produzione di sciroppo a partire da prodotti come la melassa di canna da zucchero. Yamada (1981) descrive l'utilizzo di *R. glutinis* per la rapida conversione dell'acido trans-cinnamico in L-fenilalanina tramite l'enzima L-fenilalanina ammoniacalasi (EC 4.3.1.5). *R. glutinis* può inoltre produrre tannasi e pectinasi. La tannasi ha diverse applicazioni nella produzione di succhi di frutta, birra, cosmetici, e prodotti farmaceutici e chimici, ma i suoi usi principali sono nella produzione di acido gallico. Le pectinasi possono essere utilizzate per chiarificare succhi di frutta e vino senza che si abbia la concomitante produzione di metanolo (Taskin et al., 2013). Weijers (1997) ha dimostrato la capacità di idrolisi enantioselettiva di vari epossidi arilici, aliciclici e alifatici di un ceppo di *R. glutinis*. Gli epossidi enantiomericamente puri sono importanti blocchi chirali in sintesi organica e possono essere utilizzati come intermedi chiave nella sintesi di altri composti bioattivi.

R. glutinis è stato inoltre utilizzato nel trattamento delle acque reflue (Yang et al., 2005; Xue et al., 2006) e per la produzione di "single-cell proteins" da etanolo, acido acetico e acetaldeide (Rubio et al., 2002).

1.2.2.1 Fattori che influiscono sulla produzione di carotenoidi

Per quanto riguarda la produzione di carotenoidi diversi autori hanno utilizzato *R. glutinis* come biocatalizzatore ottenendo risultati variabili in funzione del ceppo, della

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

fonte di carbonio utilizzata e del tipo di processo utilizzato. Secondo El Banna et al. (2012) i fattori che maggiormente influiscono sulla produzione di carotenoidi sono il C/N, il tipo di fonte di carbonio e azotata, la presenza di sali minerali e la temperatura di crescita. In relazione al C/N questi autori riportano un incremento della produzione di biomassa e una parallela diminuzione della produzione di carotenoidi all'aumentare del C/N. In accordo, Bhosale e Gadre (2001) osservano che la maggior produzione volumetrica di carotenoidi si ottiene in *R. glutinis* per C/N pari 10.

La scelta della fonte carboniosa è dettata dal ceppo utilizzato, dal tipo di processo impiegato e dal prodotto che si vuole ottenere. Latha et al. (2005) distinguono l'effetto di monosaccaridi, disaccaridi e pentosi sulla produzione di carotenoidi. Per quanto riguarda i monosaccaridi il fruttosio permette l'ottenimento di una maggior quantitativo di carotenoidi rispetto al glucosio e al galattosio. Quest'ultimo, sebbene porti a una minor resa di carotenoidi rispetto agli altri due zuccheri permette una maggior resa in biomassa. Tra i disaccaridi il saccarosio è quello migliore per la resa sia in biomassa che in carotenoidi. Tra i pentosi è stato osservato che l'L-arabinosio non determina una buona crescita e resa di carotenoidi; il D-xilosio permette una buona crescita ma non consente una buona resa in carotenoidi mentre il D-ribosio permette di ottenere sia un buon rendimento in biomassa sia in carotenoidi. In accordo El Banna et al. (2012) suggeriscono di utilizzare sciroppo di fruttosio per massimizzare la produzione di biomassa e saccarosio per massimizzare quella di carotenoidi.

Il tipo di fonte carboniosa influisce anche sulla proporzione dei pigmenti prodotti. Bhosale e Gadre (2001) hanno osservato che la somministrazione di glucosio, fruttosio o saccarosio massimizza la produzione di β -carotene (69%), torulene (63%) o (60%), rispettivamente. Per El Banna et al. (2012) il fruttosio o il glucosio aumentano la percentuale di β -carotene e il saccarosio e lo sciroppo di glucosio quella di torulene e torularodina.

La capacità di *R. glutinis* di crescere su substrati diversi ha spinto numerosi autori a valutare l'utilizzo fonti di carbonio complesse derivanti dai reflui dei processi produttivi. In tabella 3 sono riportati alcuni esempi.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Buzzini e Martini (1999) hanno utilizzato mosto d'uva, sciroppo di glucosio, melassa di barbabietola, estratto di farina di soia, estratto di farina di granturco. Tinoi et al (2005) hanno utilizzato come fonte di carbonio la farina di fagioli mung mentre Aksu e Eken (2007) hanno utilizzato sia melasso di saccarosio che il siero di latte.

Tabella 3. Alcune delle fonti di carbonio assimilabili da *R. glutinis*

Ceppo <i>R.glutinis</i>	Fonte di C	
DBVPG 3853	Mosto d'uva	Buzzini et al. 2000
KCTC	Melassa di zucchero di canna	Park et al. 2005
Mutant 32	Melassa di zucchero di canna	Bhosale e Gadre 2001
CCT 2186	Melassa di zucchero di canna	Sguina et al. 2002
DBVPG 3853	Mosto d'uva	Buzzini et al. 1999
DBVPG 3853	Melassa di barbabietola	Buzzini et al. 1999
TISTR	Farina idrolizzata di fagioli mung	Tinoi et al. 2005
TISTR 5159	Glicerolo	Saenge et al. 2011
CCY20-2-26	Siero di latte	Marova et al. 2011
CCY20-2-26	Estratto di patate	Marova et al. 2011

Per quanto riguarda la natura della fonte azotata secondo El Banna et al. (2012) la produzione di biomassa viene favorita dall'idrolizzato di caseina mentre quella di carotenoidi dall'ammonio solfato.

L'impiego di fonti inorganiche di azoto è stato discusso anche da altri autori che hanno valutato l'effetto del nitrato di sodio sulla produzione di pigmenti (Latha et al., 2005). D'altra parte le fonti di azoto organico (Bhosale e Gadre, 2001) tra cui l'idrolizzato acido di caseina, l'urea e l'estratto di lievito (Latha et al., 2005) influiscono positivamente sulla produzione di carotenoidi. Anche il rapporto tra β -carotene, torulene e torularodina può variare in relazione al tipo di fonte azotata.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

El Banna et al. (2012) hanno osservato che l'ammonio solfato favorisce la produzione di β -carotene, mentre la somministrazione di peptone porta a una maggior produzione di torulene. Questo è in contrasto con quanto riportato da Bhosale e Gadre (2001) che ottengono una maggior produzione di β -carotene quando il terreno colturale contiene nitrato d'ammonio, peptone o peptone di soia e una maggior produzione di torulene con terreni contenenti idrolizzato di caseina, urea o ammonio solfato.

La temperatura è un fattore molto importante sia per la crescita cellulare che per la produzione di carotenoidi. La maggior parte degli autori coltiva questo lievito a temperature comprese tra 25 e 35°C. La temperatura di coltivazione influenza il rapporto tra i diversi pigmenti prodotti. Frengova et al (1995; 1997) affermano che nell'intervallo compreso tra 20 e 25°C sono favorite la sintesi di β -carotene e torulene mentre a 30°C e 35°C è favorita la sintesi di torularodina. Questi risultati sono in accordo con quanto osservato da Buzzini et al. (1999).

Poiché *R. glutinis* è un microrganismo aerobio è stato valutato anche l'effetto dell'aerazione sulla crescita cellulare e sulla produzione di carotenoidi (Bhosale e Gadre, 2001; Simonova et al., 2004; Tinoi et al., 2005). Secondo Davoli et al. (2004) l'uso di beute flangiate permette di ottenere una maggior concentrazione di carotenoidi. Aksu e Eren (2007) hanno dimostrato che l'aumento dell'aerazione favorisce la crescita cellulare e di conseguenza il rendimento di carotenoidi in *R. glutinis*.

I carotenoidi hanno azione antiossidante, perciò la loro produzione potrebbe essere notevolmente influenzata dalla presenza di fattori di stress esogeni durante la fermentazione. Per esempio *R. glutinis* aumenta la produzione di β -carotene di 2.5 volte in seguito all'aggiunta di NaCl al 10%. Anche lo stress provocato da H₂O₂ determina un aumento della produzione di carotenoidi nonostante la diminuzione della biomassa (Marova et al., 2004, 2010). Sakaki et al. (2002) affermano infatti che l'aggiunta di blu di metilene e altri generatori di specie attive dell'ossigeno non influenzino la produzione di β -carotene ma comportino un aumento marcato della produzione di torulene e torularodina.

Diversi autori riportano l'aumento della produzione e la variazione del profilo dei

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

pigmenti prodotti in seguito ad aggiunta nel terreno colturale di ioni metallici quali rame, zinco, ferro, calcio, cobalto e alluminio (Bhosale, 2004; Buzzini et al., 2005). Infatti, questi potrebbero attivare o inibire gli enzimi carotenogenici (Buzzini et al., 2005) o indurre la formazione di specie attive dell'ossigeno.

Un altro fattore che può influenzare positivamente la produzione dei pigmenti è la luce, in particolare la luce bianca che secondo Sakaki et al., (2001) aumenta la produzione di torularodina e secondo Bhosale e Gadre (2002) quella di β -carotene. Anche l'irraggiamento UV si è dimostrato utile per l'incremento della produzione dei carotenoidi in *R. glutinis* (Marova et al., 2010).

Per stimolare la sintesi di carotenoidi possono essere aggiunti al terreno colturale anche intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici (Marova et al., 2010). Anche i solventi come etanolo, metanolo, etilen glicole nel mezzo colturale sono ritenuti induttori della carotenogenesi (Bhosale 2003). L'etanolo per esempio attiva l'idrossimetil glutaril CoA riduttasi e di conseguenza aumenta la produzione di carotenoidi. Inoltre essendo l'etanolo un pro-ossidante determinerebbe un aumento delle specie reattive dell'ossigeno e di conseguenza una maggior produzione di carotenoidi.

1.3 BIBLIOGRAFIA

- Amengual J, Lobo GP, Golczak M, Li HN, Klimova T, Hoppel CL, Wyss A, Palczewski K, von Lintig J. 2011. A mitochondrial enzyme degrades carotenoids and protects against oxidative stress. *FASEB J.*25(3):948-959
- Berson EL. 2000. Nutrition and retinal degenerations. *Int. Ophthalmol. Clin. Fall.* 40(4):93-111.
- Bertram JS. 1999. Carotenoids and gene regulation. *Nutr. Rev.* 57,182–191.
- Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB.* 9 (15): 1551-1558.
- Britton G, Liaaen-Jensen S., Pfander H. 1996. In *Carotenoids*, Vol. 2: Synthesis. Stuttgart, Germany: Birkhäuser Verlag Basel.
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. 2008. In *Carotenoids*, Vol. 4: Natural Functions Springer.
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H. 2009. In *Carotenoids*, Vol. 5: Nutrition and Health. Springer.
- Bhosale PB e Gadre RV. 2001. Production of β -Carotene by a Mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55(4):423-427

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

- Bhosale PB e Berstein PS. 2004. β -carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 31(12): 565-571.
- Buzzini P e Martini A. 1999. Production of Carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresour Technol.* 71(1):41-44
- Chew BP, Park JS, Wong TS, Kim HW, Weng BB, Byrne KM, Hayek MG, Reinhart GA. 2000. Dietary beta-carotene stimulates cell-mediated and humoral immune response in dogs. *J Nutr* 130(8):1910-1913.
- Chichester CO, Mraak EM, Stewart GF. 1966. *Advances in food research.* Volume 15 New York ; London : Academic Press.
- Dias Ribeiro B, Barreto DW, Coelho M A Z. 2011. Technological aspects of β -carotene production. *Food Bioprocess Technol* 4:693–701.
- Dufossé L, Galaup P, Yaron A, Arad SM, Blanc P, Murthy KNC, Ravishankar GA. 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a Scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci Technol.* 16, 389-406.
- Dufossé L. 2009. Pigments, Microbial. In: *Enciclopedia of Microbiology* (third Edition) Moselio Shaechter (Ed) Elsevier.
- Dugas TR, Morel DW, Harrison EH. 1999. Dietary supplementation with β -carotene, but not with lycopene, inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med.* 26,1238–1244.
- During A, Hussain MM, Morel DW, Harrison EH. 2002. Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells: beta-carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. *J Lipid Res.* 43:1086–1095.
- Erickson KL, Medina EA, Hubbard NE. 2000. Micronutrients and innate immunity. *J Infect Dis;* 182 Suppl 1:S5-10.
- El-Banna A, El-Razek A, El.Mahdy A . 2012. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food Nutr Sci* 3:64–71
- Frengova GI, Simova ED, Beskhova DM. 1997. Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 18(4):272-277
- Frengova GI e Beshkova DM. 2009. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36(2):163-180.
- Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. 2003. Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends Biotech.* 21, 210–216
- Harrison FC. 1928. In *Proceedings and Transactions of the Royal Society of Canada,* 3rd Series 22
- Hughes DA. 1999. Effects of carotenoids on human immune function. *Proc Nutr Soc.* 8(3):713-18.
- Isler O. 1971 *Carotenoids.* Stuttgart, Germany: Birkhäuser Verlag Basel.
- Kim SW, Kim JB, Jung WH, Kim JH, Jung JK. 2006. Over- production of β -carotene from metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 28(12):897-904.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

- Klipstein-Grobush K, Launer L, Geleijnse JM, Boeing H, Hofman A, Witteman JC. 2000. Serum antioxidant and atherosclerosis. The rotterdam study. *Atherosclerosis*. 148,49–56.
- Kristenson M, Zieden B, Kucinskiene Z, Elinder LS, Bergdahl B, Elwing B, Abaravicius A, Razinkoviene L, Calkauskas H, Olsson AG. 1997. Antioxidant state and mortality from coronary heart diseases in Lithuanian and Swedish men: Concomitant cross sectional study on men aged 50. *BMJ*. 314, 629–633.
- Kohlmeier L, Kark JD, Gomez-Gracia E, Martin BC, Steck SE, Kardinaal A, Ringstad, J, Thamm M, Masaev V, Riemersma R, Martin-Moreno JM, Huttunen JK, Kok FJ. 1997. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study. *Amer. J. Epidemiol.* 146,618–626.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. 2011. In: *The yeasts: a taxonomic study*. (ed) Elsevier.
- Landrum JT. 2009. *Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties*. Crc Pr I Llc.
- Leppälä JM, Virtamo J, Fogelholm R, Albanes D, Taylor PR, Heinonen OP. 2000. Vitamin E and beta carotene supplementation in high risk for stroke: A subgroup analysis of the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *Arch Neurol* 57(10):1503-1509.
- Lee J, Jiang S, Levine N, Watson RR. 2000. Carotenoid supplementation reduces erythema in human skin after simulated solar radiation exposure. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 23(2):170-174.
- Miceli M.H., Diaz J.A., Lee S.A. 2011. Emerging opportunistic yeast infection, *The Lancet Infectious Diseases*. 11(2):142-151.
- McNulty HP, Byun J, Lockwood SF, Jacob RF, Mason RP. 2007. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768,167–174.
- Margalith P, Meydav S. 1968. Carotenogenesis in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Phytochemistry* 7:765 –768.
- Moran NA, Jarvik T. 2010. Lateral transfer of genes from fungi underlines carotenoid production in aphids. *Science*. 328, 624-627.
- Olson JA. 1999. Carotenoids and human health. *Arch. Latinoamer. Nutr.* 49 (1-S): 7–11.
- Palozza P, Barone E, Mancuso C, Picci N. 2008. The protective role of carotenoids against 7-keto-cholesterol formation in solution. *Mol. Cell. Biochem.* 309, 61–68.
- Perrier V, Dubreucq E, Galzy P. 1995. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch Microbiol.* 164:173–179.
- Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. 2004. *Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus Technical Monographs.
- Sieiro C, Poza M, de Miguel T, Villa TG. 2003. Genetic basis of microbial carotenogenesis. *Int. Microbi.* 6 (1):11-16.
- Stahl W, Heinrich U, Jungmann H, Sies H, Tronnier H. 2000. Carotenoids and

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

- carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr.* 71(3):795-798.
- Stephen P, 2006. In *Natural Product chemistry at a Glance*. Stanforth, Blackwell Publishing.
- Street DA, Comstock GW, Salkeld RM, Schuep W, Klag M. 1994. Serum antioxidants and myocardial infarction: Are low levels of carotenoids and α -tocopherol risk factors for myocardial infarction? *Circulation.* 90, 1154–1161.
- Tinoi J, Rakariyatham N, Deming RL. 2005. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochem* 40, 2551–2557.
- Verdoes JC, Krubasik P, Sandmann G, van Ooyen AJJ. 1999. Isolation and Functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet.* 262: 453–461.
- Verwaal R, Wang J, Meijnen JP, Visser H, Sandmann G, Van der Berg JA, et al. 2007. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4342 –4350.
- Vílchez C, Forján E, Cuaresma M, Bédmar F, Garbayo I, Vega JM. 2011. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Mar Drugs.* Mar 3;9(3):319-333.
- Xue FY, Zhang X, Luo H, Tan TW. 2006. A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochem.* 41. 1699–1702.
- Yang QX, Yang M, Zhang SJ, Lv WZ. 2005. Treatment of wastewater from a monosodium glutamate manufacturing plant using successive yeast and activated sludge systems *Process Biochem.* 40, 2483–2488.
- Yoon SH, Lee SH, Das A, Ryu HK, Jang HJ, Kim JY, Oh DK, Keasling JD, Kim SW. 2009. Combinatorial expression of bacterial whole mevalonate pathway for the production of β -carotene in *E.coli*. *J Biotechnol.* 140(3-4):218-226.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

2. CARATTERIZZAZIONE DEL CEPPLO PARENTALE C2.5T1 E DEI MUTANTI 400A15 E 200A6

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

2.1 Introduzione

La produzione di carotenoidi di origine microbica è controllata sia dal flusso del carbonio che attraversa la via biosintetica, sia dal livello di espressione dei geni e dall'attività degli enzimi coinvolti nella carotenogenesi. Quindi, sia la sovrapproduzione dei carotenoidi normalmente prodotti dai microrganismi, sia la biosintesi di nuovi carotenoidi, possono essere ottenute attraverso la manipolazione genetica dei microrganismi che naturalmente li producono o la generazione di microrganismi ricombinanti (Schmidt-Dannert, 2000).

Negli ultimi decenni sono stati realizzati grandi progressi nel controllo molecolare della biosintesi dei carotenoidi di eubatteri, piante e funghi. Tra i lieviti, la specie maggiormente caratterizzata è *Xanthophyllomyces dendrorhous* che costituisce un modello biologico di interesse per la biosintesi di astaxantina, un pigmento che si colloca a valle del β -carotene nella via biosintetica (Visser et al., 2003). Meno nota invece è la fisiologia e la genetica della via biosintetica dei carotenoidi in altri lieviti pigmentati ascritti ai generi *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* e *Sporobolomyces*. Nonostante ciò, diversi autori si sono cimentati nella produzione di pigmenti con questi lieviti attraverso l'applicazione di disegni sperimentali multifattoriali per la ricerca delle condizioni colturali che ottimizzano la produzione di carotenoidi su substrati a basso costo (Buzzini et al., 2005; Saenge et al., 2011). Altri autori, considerato che la quantità di β -carotene naturalmente prodotta da questi lieviti è relativamente ridotta, hanno proceduto con la ricerca di mutanti iperproduttori di carotenoidi (Bhosale e Gadre, 2001).

Studi effettuati nel nostro laboratorio hanno portato a selezionare, tra 18 lieviti carotenogenici appartenenti ai generi sopra menzionati, il ceppo C2.5t1 ascritto alla specie *Rhodotorula glutinis* (Taccari et al., 2013), come miglior produttore di carotenoidi su terreno contenente glicerolo come unica fonte di carbonio (Cutzu et al., 2013a).

Su glicerolo C2.5t1 produce quantità di carotenoidi totali comparabili con quelle prodotte da altri lieviti pigmentati in differenti condizioni colturali (Buzzini, 2000;

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Buzzini et al., 2007; Buzzini et al., 2010; Cutzu et al., 2013a; Frengova et al., 2003; Maldonade et al., 2008; Tinoi et al., 2005; Valduga et al., 2009). La mutagenesi UV del ceppo di *R. glutinis* C2.5t1, finalizzata all'ottenimento di mutanti sovraproduttori di carotenoidi ha generato, tra gli altri, due mutanti primari che differiscono dal parentale per quantità e qualità di pigmenti prodotti. In particolare, uno dei due mutanti si caratterizza per un incremento significativo nella produzione di β -carotene rispetto al parentale. L'altro, al contrario, non sintetizza molecole pigmentate, probabilmente per un blocco della via biosintetica a monte del licopene ed è quindi un mutante albino (Cutzu et al., 2013a).

Allo scopo di valutare se il parentale C2.5t1 e i due mutanti possono essere utilizzati come modello biologico per lo studio della via carotenogenica in *R. glutinis* i tre ceppi sono stati comparati, oltre che per quanto la riguarda la cinetica di produzione di carotenoidi, anche in relazione alla cinetica di crescita, all'ultrastruttura cellulare, e alla produzione di biomassa e di acidi grassi.

2.2 Materiali e Metodi:

2.2.1 Lieviti

Sono stati impiegati il ceppo C2.5t1 di *R. glutinis*, gentilmente concesso dal Prof. Maurizio Ciani dell'Università Politecnica delle Marche (Ancona) e due suoi mutanti primari ottenuti nel Laboratorio di Microbiologia dell'Università di Sassari: il 400A15, iperproduttore di carotenoidi, e il 200A6 incapace di produrre carotenoidi e privo di pigmentazione (albino) (Cutzu et al., 2013 a).

Sono stati impiegati i terreni colturali di seguito riportati. YEPGLY [1% estratto di lievito (Oxoid, Hampshire, UK), 2% bacto-peptone (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), 2% glicerolo (87% soluzione acquosa, Merck, Darmstadt, Germany) con aggiunta di agar (Oxoid) al 2% quando necessario] per la coltivazione e la conservazione dei lieviti a breve termine (4°C). YEPDGLY (1% estratto di lievito (Oxoid, Hampshire, UK), 2% bacto-peptone (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), 20% glicerolo) per la conservazione dei lieviti a lungo termine a - 80°C.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

La coltivazione dei lieviti è avvenuta in condizioni aerobiche in beute flangiate da un 1000 ml contenenti ciascuna 200 ml di YEPGLY, alla temperatura di 30°C, e in agitazione (180 rev min⁻¹, incubatore Infors HT, New York, NY, USA). I campioni sono stati prelevati, in duplicato, a intervalli regolari di tempo per valutare la densità ottica (OD) a 600 nm (uno spettrofotometro Genesys 20 Visible, Thermo Scientific Waltham, MA, USA) e il peso secco (Dry Weight, DW).

2.2.2 Analisi citofluorimetrica

Per la citometria a flusso è stato utilizzato un dispositivo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) dotato di un laser a ioni di argon 15 mW raffreddato ad aria (emissione, 488 nm) e di un diodo a laser rosso (635 nm). Tutte le soluzioni utilizzate sono state filtrate (0,2 µm) immediatamente prima dell'uso, per rimuovere eventuali contaminazione da particelle. I valori di forward scatter (FSC) e side scatter (SSC) sono stati elaborati graficamente e analizzati con il software WinMDI (versione 2.9). La media dei valori e i segnali di fluorescenza di FSC e SSC sono stati calcolati utilizzando lo stesso software.

I campioni di cellule da analizzare sono stati prelevati e diluiti (almeno 1:2.000 v/v) con tampone fosfato (PBS, pH 7,0). A 995 µl di campione sono stati aggiunti 5 µl microlitri di soluzione stock di ioduro di propidio (PI) (2 mg/ml in acqua distillata) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per ottenere una concentrazione finale di PI pari a 10 µg/ml. Il PI è stato eccitato a 488 nm e la fluorescenza emessa è stata misurata in FL2 (585/42 band pass filter).

2.2.3 Estrazione dei carotenoidi, identificazione e quantificazione

Le cellule sono state raccolte per centrifugazione a 11,000 g per 7 min, e liofilizzate. A 150 mg di biomassa secca sono stati aggiunti 150 mg di sabbia (0,5 mm di diametro, precedentemente lavata con una soluzione di HCl 50% per 2 ore e lavata con acqua distillata fino raggiungimento del pH 7) e le cellule sono state macinate in un mortaio. Dopo l'aggiunta di 3 ml di dimetilsolfossido (DMSO) la biomassa è stata incubata a 40°C al buio, per 10 min. La fase di DMSO contenente i carotenoidi è stata recuperata

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

per centrifugazione a 3500 g per 5 min. Il pellet è stato risospeso in 2 ml di DMSO per estrarre i carotenoidi rimanenti e trattato come sopra indicato. Quindi 2 ml di acetone, 2 ml di soluzione di NaCl (20% w / v) e 2 ml di etere di petrolio (60-80°C) sono stati aggiunti ai 5 ml di DMSO contenente il carotenoidi. La soluzione è stata vortexata e mantenuta al buio, fino alla formazione della fase superiore di etere di petrolio che è stata raccolta. È stato aggiunto etere di petrolio, raccogliendo ogni volta la fase superiore contenente i pigmenti, fino alla completa estrazione dei carotenoidi dal DMSO. Gli estratti sono stati combinati ed evaporati sotto atmosfera inerte per evitare la degradazione dei carotenoidi. Per la Thin Layer Chromatography il residuo è stato caricato su una lastra di silica gel 10x20 cm, 0,25 cm di spessore (HPTLC Silica gel 60, MERCK, Germany). Come fase mobile è stata utilizzata una soluzione di etere di petrolio 60-80°C (Absolve, Portugal) e acetone (Valente e Ribeiro, Portugal), (90:10 v/v). Le bande sono state raschiate e risospese in 1,5 ml di acetone, centrifugate e sottoposte a HPLC. Per l'analisi spettrofotometrica i residui sono stati risospesi in etere di petrolio.

Per l'analisi HPLC il residuo è stato risospeso in acetone e iniettato in HPLC, HP-1100 (Hewlett Packard, Waldrom, Germany), usando una colonna l-Bondapack C18 (250/4.0 mm) (VDS-optilab, Berlin, Germany) con un detector UV/VIS ($\lambda = 450$ nm) (Hewlett Packard, series 1100, Waldronn, Germany). Come fase mobile è stata usata una soluzione di metanolo (con acqua al 0.2 %) e acetonitrile (75:25). I pigmenti sono stati eluiti in 16 min, a 1 ml min^{-1} , e identificati per confronto con l'analisi cromatografica su strato sottile (Park et al., 2007). Il β -carotene è stato identificato confrontando il tempo di ritenzione del carotenoide con quello del composto standard (Sigma, 97% di purezza). Il β -carotene standard è stato utilizzato anche per ottenere una curva di calibrazione da utilizzare per la quantificazione del β -carotene prodotto dalle cellule.

2.2.4 Estrazione, metilazione e quantificazione degli acidi grassi

Per ottenere gli esteri metilici a 100 mg di biomassa liofilizzata sono stati aggiunti 2 ml di una soluzione di metanolo : cloruro di acetile (19:1 v/v), a 80°C per 1 ora per

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

permettere la conversione di acido grasso in estere metilico dell'acido grasso (FAME). Sono stati aggiunti 0,2 ml di una soluzione standard di acido docosaesaenoico (DHA) 127,2 mg/25 ml. Sono stati aggiunti 1 ml di acqua distillata e 1 ml di esano. La fase superiore contenente i FAME è stata filtrata con un filtro di cotone e solfato di sodio anidro. La soluzione è stata iniettata in gas- cromatografo (Varian 3800, USA) dotato di rivelatore a ionizzazione di fiamma. La separazione è stata eseguita con una colonna capillare di silice fusa 30 m di lunghezza, diametro interno 0,32 millimetri e 0,32 millimetri di spessore di pellicola usando elio come gas di trasporto alla portata di 3,5 ml min⁻¹. L'identificazione dei picchi e il calcolo del fattore di risposta sono stati eseguiti utilizzando lo standard (NU-CHECK-PREP, USA). I campioni sono stati prelevati in duplicato e ogni campione è stato iniettato due volte. La quantificazione degli acidi grassi è stata effettuata in termini di percentuale sulla base della determinazione delle aree in accordo con l'equazione

$$\% \text{ di acido grasso} = A \times Fr \div At \times 100$$

dove A è l'area del picco dell'acido grasso, Fr fattore di risposta dell'acido grasso, AxFr è l'area corretta del picco, At è la somma delle aree corrette di tutti gli acidi grassi del campione.

2.3 Risultati

2.3.1 Crescita, complessità cellulare e integrità della membrana plasmatica

Il ceppo parentale C2.5t1 e i mutanti 400A15 e 200A6 sono stati inoculati in terreno YEPGLY e coltivati in agitazione a 30°C per 96 ore.

Le cinetiche di crescita, monitorate in termini di incremento della densità ottica (OD_{600nm}) e del peso secco delle colture, erano comparabili nei tre ceppi (Fig. 1) mentre alcune differenze sono state rilevate per quanto riguarda la dimensione e la complessità cellulare. Infatti mentre il mutante 200A6 e il ceppo parentale C2.5t1 aumentavano il segnale FSC e SSC nel corso della fase esponenziale di crescita, nel ceppo iperproduttore di β-carotene 400A15 questi segnali diminuivano nel corso della

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

stessa fase (Fig. 2). FSC e SSC mantenevano invece valori comparabili nei tre ceppi nel corso della fase stazionaria.

L'analisi della permeabilità della membrana cellulare, condotta sempre per via citofluorimetrica su cellule trattate con ioduro di propidio (PI), indicava che le cellule permeabili al PI si mantenevano al di sotto del 10% nel corso della crescita. Tuttavia questa analisi confermava le differenze tra i tre ceppi. Infatti, nel corso della fase esponenziale nel parentale C2.5t1 e nel mutante albino 200A6 si osservava un decremento della permeabilità della membrana, che invece aumentava mutante 400A15. Nel corso della fase stazionaria i tre ceppi presentavano un incremento della percentuale di cellule con membrana permeabilizzata, ma nel 400A15 la percentuale era lievemente maggiore (Fig. 3).

2.3.2 Produzione di carotenoidi

L'analisi di TLC dei carotenoidi prodotti dopo 72 ore di crescita in YEPGLY dimostrava differenze significative tra il ceppo parentale C2.5t1 e il mutante 400A15 (Fig. 4). Le bande corrispondenti ai diversi pigmenti sono state raschiate dalla lastra e sottoposte a HPLC. La banda corrispondente al pigmento Yellow1, presente nel 400A15 e corrispondente alla banda WT del C2.5t1, è stata identificata, per comparazione con lo standard, come β -carotene. Le bande WT2 e WT4, che eluivano come un unico picco, sono state identificate come un misto di torulene e torularodina. Poiché il torulene è meno polare della torularodina (Perrier et al., 1995) si può affermare che la banda WT2 corrisponda al torulene e WT4 corrisponda alla torularodina. Le bande WT3 e Yellow 2 non sono state identificate. Questi risultati sono supportati dalle analisi spettrofotometriche degli estratti totali (Fig. 5). L'analisi spettrofotometrica dei carotenoidi estratti suggerisce infatti che la maggior produzione di β -carotene nel 400A15 sia, almeno in parte, dovuta alla ridotta capacità di produrre gli altri due pigmenti normalmente prodotti da *R. glutinis*: il torulene e la torularodina (Fig. 5). La produzione di β -carotene è stata inoltre monitorata nel corso della fermentazione nel parentale C2.5t1 e nel mutante 400A15 ma non nel mutante albino, data la sua

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

incapacità di produrre molecole pigmentate. Osservando la cinetica di produzione del β -carotene (Fig. 6) si evidenziavano differenze significative tra i due ceppi. Il mutante 400A15 aumentava esponenzialmente l'accumulo di β -carotene fino alle 72 ore di crescita, dopo le quali diminuiva la quantità di pigmento prodotto. Il parentale C2.5t1 produceva la quantità massima di β -carotene alle 40 ore di fermentazione dopo le quali la quantità di β -carotene rimaneva pressoché costante. Oltre alla diversa cinetica di produzione, i due ceppi differivano significativamente anche per la quantità di β -carotene prodotto. Infatti il mutante 400A15 produceva fino a 0,585 mg β -carotene/g di peso secco mentre il parentale produceva 0,081 mg β -carotene /g di peso secco. Si osservava quindi un incremento della quantità di β -carotene prodotto di circa 7 volte rispetto al parentale.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

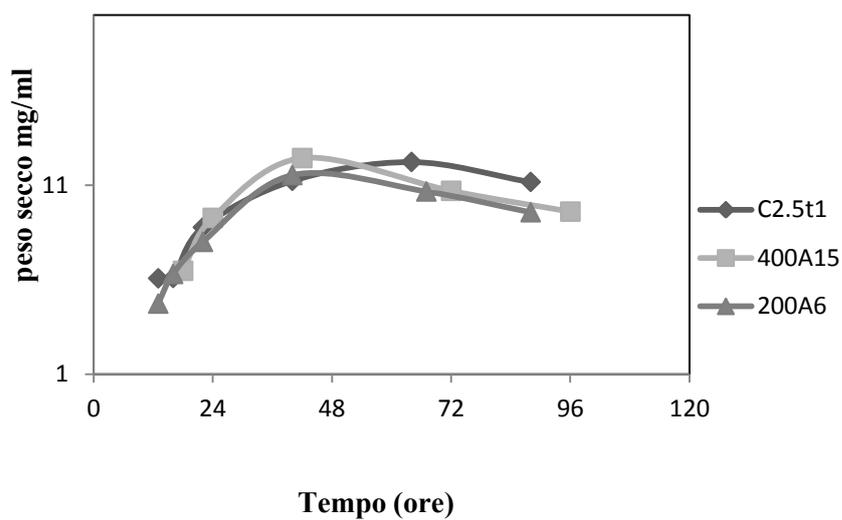
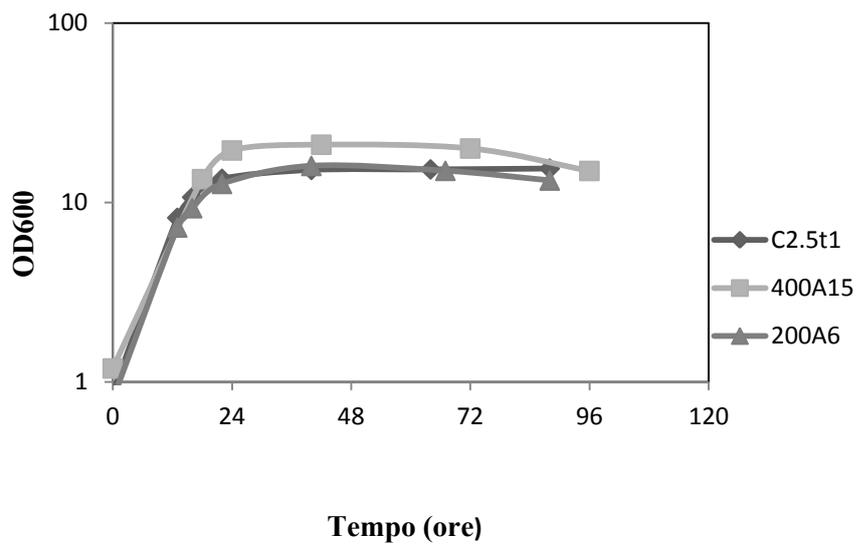


Figura 1. Curve di crescita del ceppo parentale C2.5t1 e dei suoi mutanti 400A15 e 200A6 in YEPGLY. I dati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

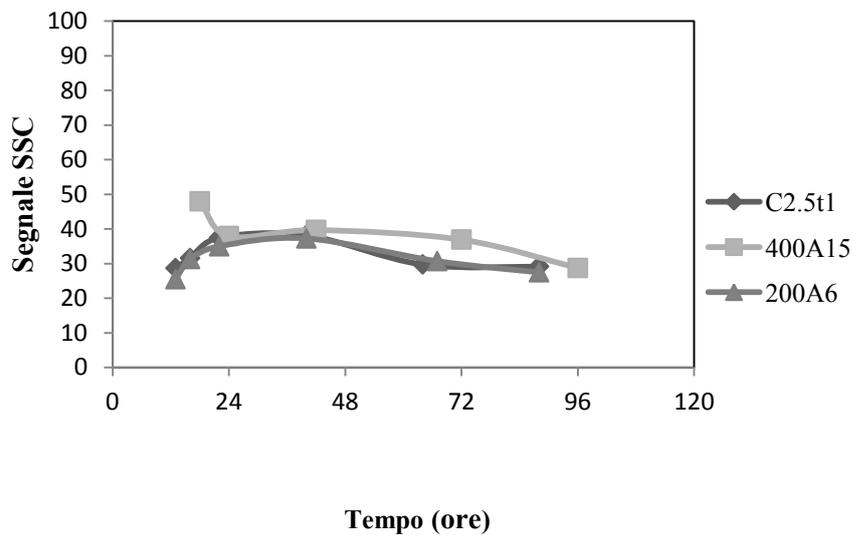
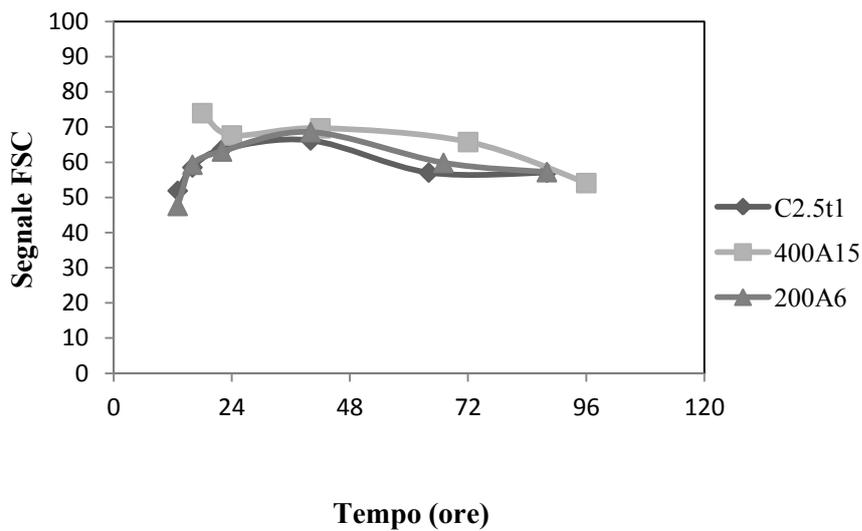


Figura 2. Segnale FSC e segnale SSC del ceppo parentale C2.5t1 e dei suoi mutanti 400A15 e 200A6 in YEPDGLY. I risultati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

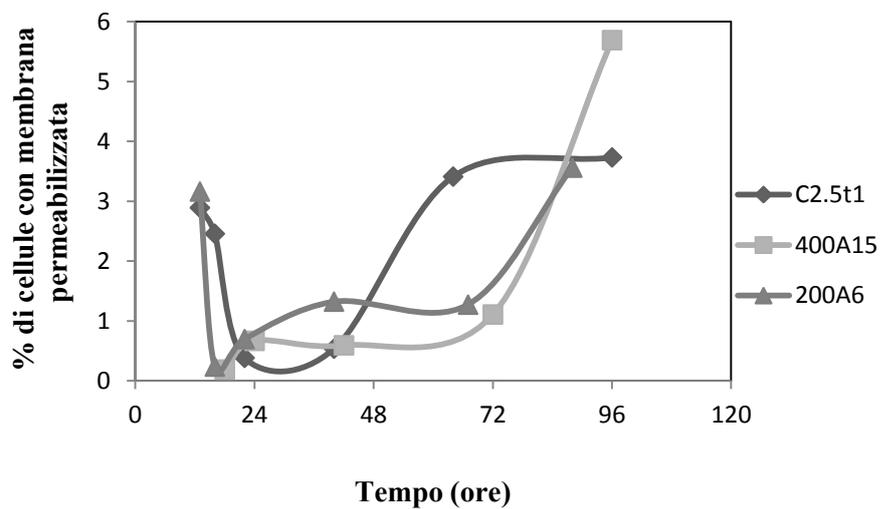


Figura 3. Permeabilità al PI nel ceppo parentale C2.5t1 e nei mutanti 400A15 e 200A6. I risultati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

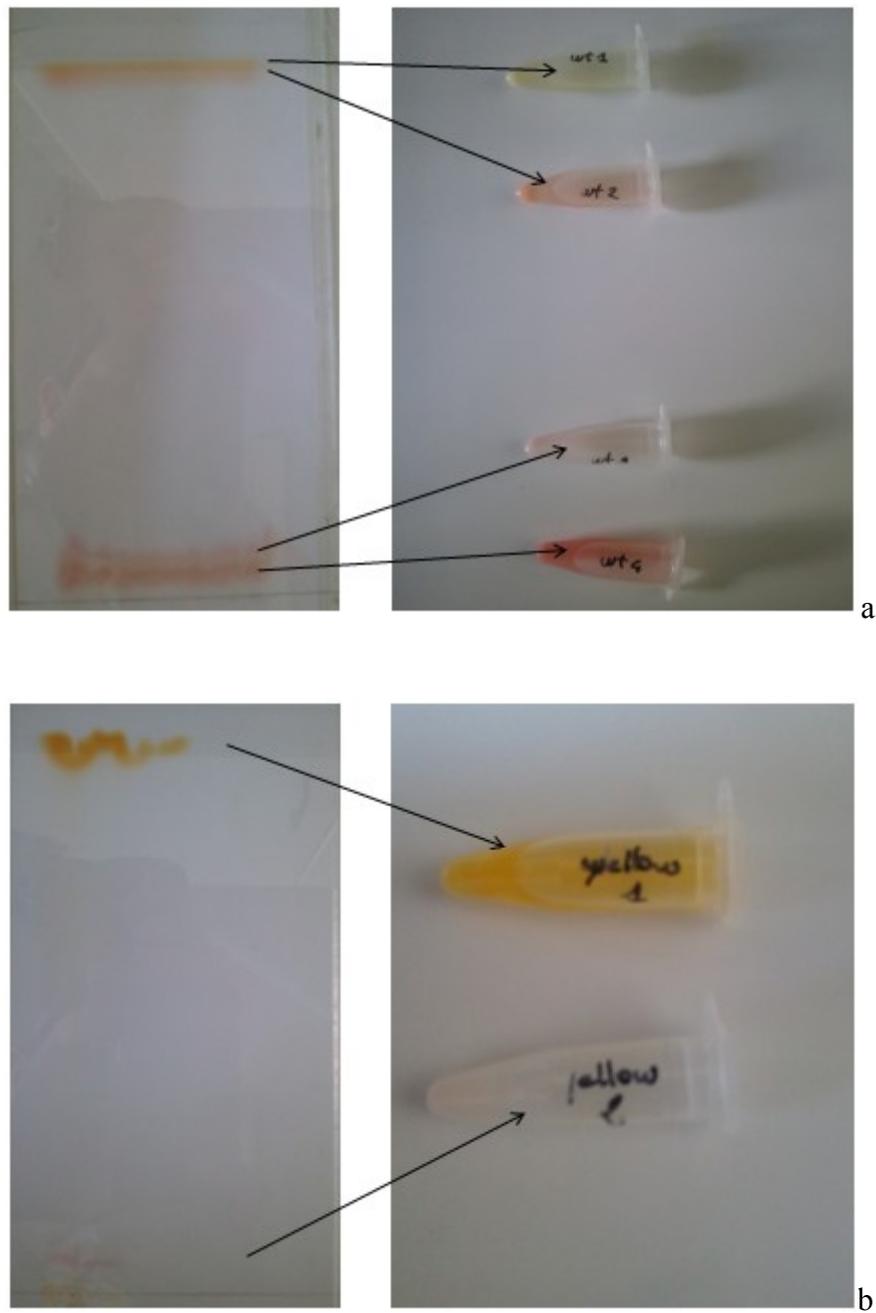


Figura 4: Thin Layer Chromatography dei pigmenti prodotti dal ceppo parentale C2.5t1 (a) e dal mutante 400A15 (b).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

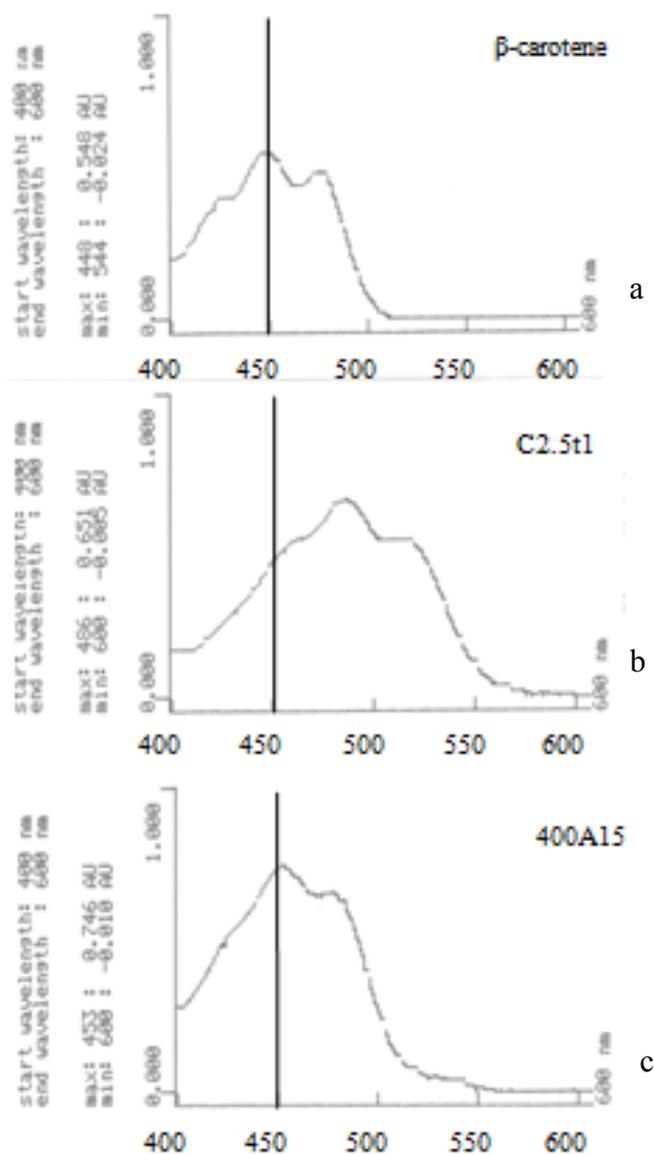


Figura 5. Analisi della composizione dei pigmenti. Scansione degli estratti a lunghezze d'onda comprese tra 400 e 600_{nm}. In a. β -carotene puro; b) C2.5t1; c) 400A15. La linea indica il picco di assorbimento del β -carotene (450_{nm}).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

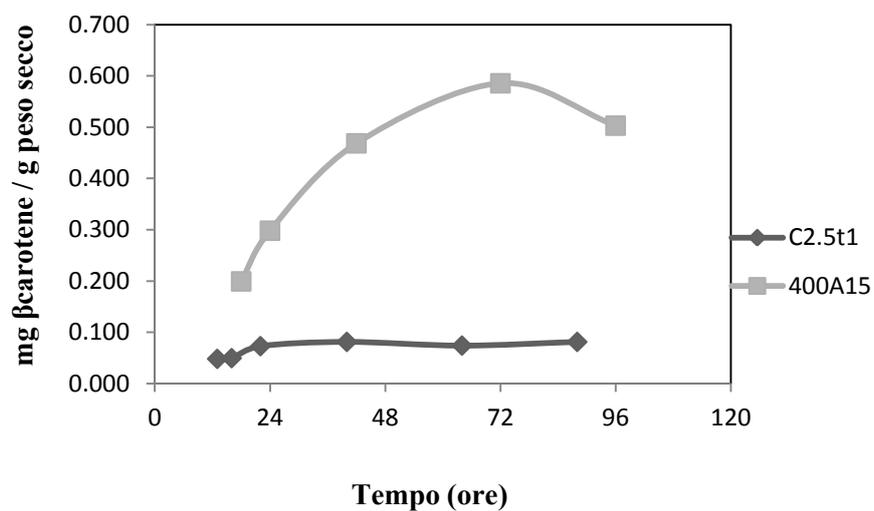


Figura 6. Quantificazione via HPLC del β -carotene nel parentale C2.5t1 e nel mutante 400A15.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

2.3.3 Produzione di acidi grassi

La produzione di acidi grassi è stata monitorata attraverso l'identificazione e la quantificazione dei loro esteri metilici (FAME) per gas-cromatografia. La composizione degli acidi grassi rilevata è in accordo con quanto riportato da altri autori (Perrier 1995; Easterling, 2009). Le percentuali di produzione degli acidi grassi per ogni ceppo sono mostrate in tabella 2 e le cinetiche di produzione nel corso della crescita sono riportate in figura 7. L'utilizzo del metodo Bligh e Dyer (1959) non ha consentito di ottenere quantità di lipidi totali rilevabili mettendo in evidenza che i tre ceppi producono quantità ridotte di lipidi.

Tabella 2. Produzione di acidi grassi nel ceppo parentale C2.5t1 e nei mutanti 400A15 e 200A6 in YEPGLY. I dati sono espressi come % del singolo acido grasso sul totale degli acidi grassi. E' riportata la media di due repliche indipendenti.

Acido Grasso	C2.5t1					
	13 ore	16 ore	22 ore	40 ore	64 ore	88 ore
16:0	14,2	10,2	9,3	11,4	9,1	7,54
18:0	42,6	41,4	42,0	47,7	43,1	41,41
18:1w9	30,7	34,6	37,1	31,6	38,1	40,92
18:3w6	12,5	13,8	11,7	9,3	9,7	10,1
Acido Grasso	200A6					
	13 ore	16 ore	22 ore	40 ore	64 ore	88 ore
16:0	11,6	10,3	11,8	11,3	9,6	10,1
18:0	31,9	43,5	39,4	36,9	36,5	41,6
18:1w9	38,7	33,4	36,0	40,6	41,9	46,0
18:3w6	17,8	12,9	12,7	11,2	12,0	13,4
Acido Grasso	400A15					
		18 ore	24 ore	42 ore	72 ore	96 ore
16:0		10,4	13,2	6,6	9,1	4,6
18:0		33,7	34,7	17,3	37,7	18,9
18:1w9		37,5	36,7	18,3	39,8	19,9
18:3w6		18,3	15,4	7,7	13,4	6,7

16:0 acido esadecanoico; 18:0 acido octadecanoico; 18:1w9 acido cis-9-octadecanoico; 18:3w6 acido cis- 9,12,15-octadecanoico.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

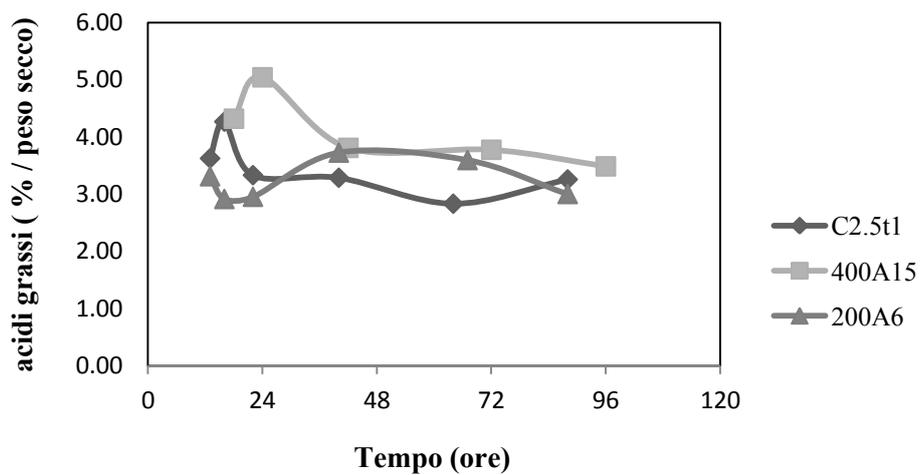


Figura 7. Produzione di acidi grassi. I dati sono espressi come valori medi di due repliche indipendenti.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

2.4 Discussione

Per valutare se il ceppo parentale C2.5t1 e i due mutanti 400A15 e 200A6 potessero essere impiegati come modelli biologici per lo studio della via carotenogenica in *R. glutinis*, si è proceduto con la caratterizzazione di alcuni parametri, almeno in parte connessi con la produzione di carotenoidi.

Infatti, nonostante la selezione dei tre ceppi fosse avvenuta sulla base della loro pigmentazione, e quindi di mutazioni presumibilmente a carico di geni della via carotenogenica, si è deciso di verificare se le mutazioni indotte, oltre a perturbare in maniera significativa la via biosintetica dei carotenoidi, compromettessero il mantenimento dell'omeostasi cellulare e/o influissero sulla fisiologia cellulare.

I risultati ottenuti indicano che il ceppo parentale C2.5t1 e i due mutanti 400A15 e 200A6 non differiscono in maniera significativa per quanto riguarda la produzione di biomassa. Pertanto è possibile affermare che le mutazioni indotte non influiscono sulla densità cellulare massima ottenibile nelle condizioni colturali testate.

Nel caso del mutante albino 200A6 questi risultati sono corroborati da quelli dell'analisi citofluorimetrica condotta mediante misurazione di forward scatter (FSC) e side scatter (SSC) e del segnale di FL2 in cellule colorate con il PI. Il FSC, la cui intensità del segnale aumenta linearmente con il quadrato del diametro delle cellule, e il SSC, che fornisce una misura indiretta del grado di complessità cellulare (Cunningham e Buonacorsi, 1992), infatti erano comparabili nell'albino e nel parentale nel corso della crescita. Il mutante 400A15 si differenziava per questi due parametri dagli altri due ceppi nel corso della fase esponenziale, ma non in quella stazionaria. In particolare, nel corso della fase esponenziale il volume e la complessità cellulare aumentavano nel parentale e nel mutante albino e diminuivano nel 400A15. Secondo Andrade et al. (2012) una diminuzione dei segnali di FSC e SSC è attesa nel caso di lieviti in attiva crescita. Infatti, cellule appena nate hanno un segnale FSC e SSC minore rispetto a cellule mature. Ne deriva quindi che il segnale medio relativo ai due parametri decresce nel tempo per l'aumento delle nuove cellule. Tuttavia, il fatto che la velocità di crescita del mutante 400A15 fosse comparabile con quella del parentale durante la crescita su YEPGLY (dati non mostrati) porta ad escludere che, almeno nel caso presentato, la

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

differente intensità dei segnali di FSC e SSC del mutante fosse da ascrivere ad una sua differente cinetica di crescita.

Il mutante 400A15 differiva dagli altri due ceppi anche per la permeabilità al PI. La maggiore permeabilità al PI mostrata da questo ceppo sembra compatibile con il maggiore accumulo di β -carotene. Infatti è lecito attendersi che elevate produzioni di questo carotenoide, che si localizza nelle membrane, possano perturbarle e contribuire ad aumentarne la permeabilità al colorante PI.

Indubbiamente il mutante 400A15 accumula quantità di β -carotene significativamente superiori rispetto al parentale. Questa maggiore produzione di β -carotene si accompagna ad un decremento nella produzione di torulene (Cutzu et al., 2013a). In particolare è stato osservato che il C2.5t1 produce 25,14 % di β -carotene, 40,78 % di torulene e 34,08 % torularodina mentre il mutante 400A15 produce il 73% circa di β -carotene e il 27% di torulene a scapito della torularodina (Cutzu et al., 2013a), come confermato dalla TLC.

La valutazione del contenuto lipidico ha evidenziato che i tre ceppi non accumulano lipidi, contrariamente a quanto atteso, dato che *R. glutinis* viene considerata una specie oleaginosa (Perrier 1995). L'accumulo di lipidi avviene in forma di triacilgliceroli, e i tre ceppi utilizzati in questo studio raggiungono un massimo di produzione di acidi grassi del 3-5 % del peso secco cellulare. Considerato che un lievito viene definito tale se almeno il 20 % del suo peso secco è costituito da lipidi (Ratledge, 1977) è evidente che il ceppo parentale C2.5t1 e conseguentemente i suoi mutanti, non possano essere definiti oleaginosi.

Questa analisi era stata effettuata partendo dal presupposto che la via carotenogenica compete con la via biosintetica dei lipidi per l'utilizzo del precursore comune acetil-CoA. L'assenza di differenze significative nel contenuto lipidico tra i tre ceppi suggerisce che le differenze osservate nell'accumulo di carotenoidi siano imputabili a mutazioni a carico di bersagli molecolari della via carotenogenica, più che ad una deviazione del flusso del carbonio verso la biosintesi lipidica (nel caso del mutante albino 200A6) o dei carotenoidi (nel caso del mutante iperproduttore di β -carotene 400A15).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

In conclusione, i tre ceppi sono comparabili per quanto riguarda la cinetica di crescita e la composizione lipidica. Le differenze evidenziate dall'analisi citofluorimetrica sono verosimilmente ascrivibili alla diversa quantità e qualità dei carotenoidi prodotti. Nel loro complesso questi risultati suggeriscono che i tre ceppi possono essere impiegati come modello biologico per lo studio della carotenogenesi in *R. glutinis* e indicano il mutante 400A15 come un ceppo promettente per la produzione di β -carotene.

2.5 Bibliografia

- Andrade R, Leal R, Roseiro J, Reis A, da Silva TL. (2012). Monitoring *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch fermentations growing under carbon and nitrogen limitation by flow cytometry. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(3):1175-1184.
- Bligh EG e Dyer WJ. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37,911-917.
- Bhosale PB, Gadre RV. 2001. Production of beta-carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55 (4):423-427.
- Buzzini P. 2000. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole Carbohydrate source. *J Ind Microbiol Biotechnol* 24:41-45
- Buzzini P, Martini A, Gaetani M, Turchetti B, Pagnoni UM, Davoli P. 2005. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. *Enzyme Microb Technol.* 36(5-6): 687-692.
- Buzzini P, Innocenti M, Turchetti B, Libkind D, van Broeck M, Mulinacci N. 2007. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Can J Microbiol.* 53(8):1024-1031.
- Buzzini P, Goretti M, Branda E, Turchetti B. 2010. Basidiomycetous yeasts for production of carotenoids. In: Flickinger MC (ed) *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology.* 1. 469-481. Wiley, New York,
- Cunningham A e Buonnacorsi, CA. 1992. Narrow-angle forward light scattering from individual algal cells: implications for size and shape discrimination in flow cytometry. *J. Plankton Res.* 14, 223-234.
- Cutzu R, Coi A, Rosso F, Bardi L, Ciani M, Budroni M, Zara G, Zara S, Mannazzu I. 2013a. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. *World J Microbiol Biotechnol.* 29(6):1009-1017.
- Cutzu R, Clemente A, Reis A, Nobre B, Mannazzu I, Roseiro J, Lopes da Silva T. 2013b. Assessment of β -carotene content, cell physiology and morphology of the yellow yeast *Rhodotorula glutinis* mutant 400A15 using flow cytometry. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40(8):865-875.
- Easterling ER., French WT, Hernandez R, Licha M. 2009. The effect of glycerol as a sole and

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

- secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour Technol.* 100(1):356-361.
- Frengova GI, Emilina SD, Beshkova DM. *Z Naturforsch C.* 2003. Carotenoid production by lactose-negative yeasts co-cultivated with lactic acid bacteria in whey ultrafiltrate. 58(7-8):562-567.
- Maldonado IR, Rodriguez-Amaya DB, Scamparini ARP . 2008. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chem.* 107:145–150
- Park PK, Kim EY, Chu KH. 2007. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology.* 53 148–152.
- Perrier V, Dubreucq E, Galzy P. 1995. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch Microbiol.* 164(3):173-179.
- Ratledge C., Rehm, H.J., Reed, G.1977. In: *Microbial Lipids in Biotechnology.* 7. 133–197 (ed) VCH, Germany.
- Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT , Bourtoom T . 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry.* 46 210–218.
- Schmidt-Dannert C, Umeno D, Arnold FH. 2000. Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat Biotechnol.*18(7):750-753.
- Schmidt-Dannert 2000. Engineering novel carotenoids in microorganisms. *C. Curr Opin Biotechnol.* 11(3):255-261.
- Tinoi J, Rakariyatham N, Deming RL. 2006. Utilization of mustard waste isolates for improve production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 33(4):309-314.
- Valduga E, Valério A, Treichel H, Furigo Júnior A, Di Luccio M. 2009. Kinetic and stoichiometric parameters in the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in synthetic and agroindustrial media. *Appl Biochem Biotechnol.* 157(1):61-69.
- Visser H, van Ooyen AJJ, Verdoes JC. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Yeast Research* 4 (3), 221–231.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3. ANALISI PROTEOMICA COMPARATIVA DEL PARENTALE C2.5T1 E DEI MUTANTI 400A15 E 200A6

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3.1 Introduzione

Il lievito *Rhodotorula glutinis* C2.5t1 è stato selezionato per la produzione di carotenoidi (Cutzu et al., 2013a) e il suo mutante primario 400A15 eccelle nella capacità di produrre β -carotene, carotenoide dal forte interesse industriale e commerciale. Allo stato attuale delle conoscenze l'ottimizzazione della produzione di β -carotene col mutante 400A15 può essere conseguita esclusivamente agendo sulle variabili di processo, dal momento che la via carotenogenica di *R. glutinis* non è stata caratterizzata. Per analogia con quanto osservato in animali, funghi, piante e alcuni batteri (Stephen, 2006) si suppone che la carotenogenesi inizi con la condensazione di tre molecole di acetyl-CoA a formare una molecola di 3-idrossimetil-3-glutaril-CoA che viene ridotta ad acido mevalonico (MVA). Il mevalonato in seguito a fosforilazione diviene mevalonil-pirofosfato che, per decarbossilazione, diventa isopentenil-pirofosfato (IPP), in equilibrio dinamico col suo isomero 3,3-dimetilallil-pirofosfato (DMAPP). Queste due molecole contenenti 5 atomi di carbonio sono note come unità isopreniche e per condensazioni sequenziali originano una pletera di molecole organiche note globalmente come isoprenoidi, di cui i carotenoidi rappresentano un sottogruppo. In seguito a tre condensazioni si ha la formazione di geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP) a 20 atomi di carbonio.

A questo punto entra in gioco la prima reazione tipica della carotenogenesi e degli organismi carotenogenici: l'accoppiamento testa a testa di due molecole di GGPP a formare il fitoene, una molecola incolore con 40 atomi di carbonio e dotata di nove doppi legami di cui tre coniugati. Questa reazione è catalizzata dalla fitoene sintasi, un enzima monomero di 35-39 kDa, associato alla membrana, dipendente da cationi bivalenti e conservato in diversi organismi, dai batteri alle piante (codificato dai geni *crtB* e *psy*, rispettivamente) (Siero et al., 2003). Successivamente il fitoene viene sottoposto ad una reazione di desaturazione da parte della fitoene deidrogenasi. L'introduzione di un ulteriore doppio legame porta alla sintesi del fitofluene. Le fitoene deidrogenasi sono enzimi associati alle membrane dal peso molecolare di 53–69 kDa e l'isoforma più pesante (62–69kDa) è di origine fungina. Le fitoene deidrogenasi fungine sono codificate dal gene *crtI* e catalizzano quattro deidrogenazioni

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

sequenziali fino alla formazione del licopene, carotenoide aciclico dotato di 13 doppi legami di cui 11 coniugati (Siero et al., 2003).

La carotenogenesi prosegue con la ciclizzazione delle porzioni isopreniche terminali del licopene da parte della licopene ciclasi. Nella maggior parte dei microrganismi le licopene ciclasi portano alla formazione di anelli β o ϵ a una o ad entrambe le estremità della molecola. Esistono diversi tipi di licopene ciclasi originatisi per coevoluzione: negli eubatteri, archea e funghi l'enzima è codificato dal gene *crtY* ed ha un peso molecolare di 43 kDa (Siero et al., 2003). In *Xanthophyllomyces dendrorhous* la licopene ciclasi, codificata da *crtYB* (Verdoes et al., 1999), è un enzima bifunzionale: ha attività fitoene sintasica all'estremità carbossi-terminale e licopene ciclasica in quella ammino-terminale. Enzimi simili a questo sono stati rinvenuti in altri organismi come *Mucor circinelloides*, *Neurospora crassa* e *Phycomyces blakeslecanus* nei quali sono codificati rispettivamente dai geni *carRP*, *al-2* e *carRA* (Siero et al., 2003).

Al fine di isolare ed identificare gli enzimi coinvolti nella via carotenogenica di *R. glutinis*, il ceppo parentale C2.5t1, e i suoi due mutanti primari 400A15 e 200A6 sono stati oggetto di analisi proteomica comparativa. Infatti, come ipotizzato nel capitolo 2, le differenze nella quantità e qualità di pigmenti prodotti dai tre ceppi potrebbero essere dovute a mutazioni a carico di geni della via biosintetica. Queste mutazioni potrebbero determinare differenze nel profilo proteico e condurre all'identificazione degli enzimi del pathway carotenogenico consentendo una migliore comprensione della regolazione di questa via biosintetica in *R. glutinis*.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Terreni e condizioni culturali

I ceppi *R. glutinis* C2.5t1, 400A15, 200A6 sono stati coltivati in YEPGLY (2% glicerolo, 1% estratto di lievito, 2% peptone) a 30°C in agitazione e prelevati dopo 70 ore.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3.2.2 Analisi proteomica

L'analisi proteomica è stata eseguita come di seguito indicato, presso il Laboratorio di Proteomica di Porto Conte Ricerche, Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna (Tramariglio, Alghero).

3.2.2.1 Estrazione delle proteine

Le proteine sono state estratte da 1×10^9 cellule tramite incubazione a 95°C per 20 minuti in agitazione (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Amburgo, Germania) in tampone di estrazione (1% SDS, 20 mM Tris-HCl pH 8.8), seguita da distruzione meccanica, combinata a cicli di congelamento-scongelo, effettuata con l'ausilio di un omogeneizzatore meccanico TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germania). Gli estratti proteici sono stati sottoposti a precipitazione con il 2D-Clean up Kit (GE Healthcare). La quantificazione delle proteine è stata effettuata mediante l'EZQ™ Protein Quantitation Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

3.2.2.2 Elettroforesi bidimensionale

Per l'analisi DIGE, la marcatura è stata effettuata incubando 50 μg di proteine di ciascun campione con 400 pmol di CyDye DIGE Fluors 3 e 5 (GE Healthcare/Amersham, Little Chalfont, Regno Unito) per 30 minuti in ghiaccio al buio. In parallelo, una miscela di tutti i campioni di ogni singolo esperimento è stata marcata con CyDye DIGE Fluor 2 (sempre 400 pmol di cianina per 50 μg di proteine) ed utilizzata come standard interno. La reazione è stata bloccata incubando ciascun campione con 1 μL di Lisina 10 mM per 10 minuti.

I campioni sono stati quindi miscelati in base alle combinazioni previste dallo schema DIGE, come dettagliato nei risultati. Alla miscela sono stati aggiunti ditiotreitolo (DTT) ed anfoline (con range di pH 3-11 non lineare), entrambi ad una concentrazione finale dell'1% p/v, ed in seguito la soluzione è stata portata ad un volume finale di 450 μL (200 μL nel caso delle *strip* da 11 cm) con la DeStreak Rehydration Solution (contenente Urea; Glicerolo; CHAPS; GE Healthcare). Le IPGstrip da 24 cm (GE Healthcare) o da 11 cm (Bio-Rad), con range di pH

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3-11 non lineare, utilizzate per la prima dimensione sono state quindi reidratate con il campione mediante reidratazione passiva *overnight*. L'isoelettrofocalizzazione è stata condotta utilizzando l'IPGphor3 (GE Healthcare).

Prima della seconda dimensione, le IPGstrip sono state riequilibrare per immersione (15 minuti, lenta agitazione) in una soluzione riducente di DTT 2% p/v in tampone di equilibratura (Urea 6 M, Tris-HCl pH 8,8 0,50 mM; Glicerolo 30% v/v; SDS 2% p/v). In seguito all'allontanamento dell'eccesso della soluzione riducente, le IPGstrip sono state sottoposte a due passaggi consecutivi, di 8 minuti circa ciascuno, di alchilazione in una soluzione alchilante contenente iodoacetamide (IAA) 2,5% p/v in tampone di equilibratura. Le *strips* contenenti i campioni marcati con le cianine sono state protette dalla luce per tutta la durata della reidratazione in modo da non comprometterne la fluorescenza.

Per la seconda dimensione sono stati utilizzati gel di poliacrilamide a concentrazione fissa 12,5% per le *strips* da 24 cm e in gradiente 4-20% per le *strip* da 11 cm. La corsa elettroforetica è stata effettuata *overnight* alla temperatura costante di 25°C, impostando una potenza pari ad 1 W per gel, utilizzando la Ettan DALTTwelve (GE Healthcare) per le *strip* da 24 cm e la Criterion Dodeca Cell (Bio-Rad) per le *strips* da 11 cm.

Le immagini dei gel sono state acquisite mediante Typhoon Trio+ Image Scanner (GE Healthcare) ed analizzate con il software DeCyder (v.7.0, GE Healthcare), utilizzando i moduli BVA (Biological Variation Analysis) e EDA (Extended Data Analysis).

Per l'escissione degli *spots* di interesse, 600 µg di proteine per ciascun ceppo sono state separate tramite 2-D PAGE su *strips* da 24 cm (GE Healthcare) per la prima dimensione e su gel a concentrazione fissa di poliacrilammide (12,5%) per la seconda dimensione, seguendo un protocollo identico a quello adottato per la 2-D DIGE eccetto la marcatura con cianine fluorescenti. In seguito a colorazione con blue di Coomassie, gli *spots* di interesse sono stati sottoposti a idrolisi *in situ* con tripsina secondo un protocollo standard (Shevchenko *et al.*, 2006).

3.2.2.3 Spettrometria di massa

L'analisi delle miscele peptidiche tramite spettrometria di massa è stata effettuata utilizzando

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

lo spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ-Orbitrap Velos accoppiato con il sistema nanoUPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific, San Jose, USA) o, in alternativa, lo spettrometro di massa XCT Ultra 6340 ion trap interfacciato con un sistema HPLC 1200 ed un “chip cube” (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), secondo procedure riportate rispettivamente da Tanca *et al.* (2013) ed Addis *et al.* (2012).

3.2.2.4 Analisi dei dati di spettrometria di massa

L’identificazione delle proteine è stata effettuata mediante la piattaforma bioinformatica Proteome Discoverer (v.1.4, Thermo Scientific), utilizzando il motore di ricerca integrato Sequest-HT con i parametri descritti di seguito (un secondo valore è riportato tra parentesi qualora l’analisi dei dati ottenuti con lo spettrometro di massa Agilent richiedesse parametri differenti rispetto all’analisi dei dati Orbitrap): enzima: tripsina; massimo numero di siti di taglio saltati: 2; tolleranza sulla massa dello ione precursore: 10 (250) ppm; tolleranza sulla massa dello ione frammento: 0.02 (0.5) Da; modificazioni statiche: carbamidometilazione della cisteina; modificazioni dinamiche: conversione della glutammina N-terminale in acido piroglutammico e ossidazione della metionina. La significatività dell’identificazione è stata determinata mediante il *tool* “Fixed Value Peptide Validator” presente nella *suite* di Proteome Discoverer, utilizzando i parametri di *default*, e sono state considerate soltanto le identificazioni ad alta confidenza. Inoltre, i peptidi con valore di *rank* superiori ad 1 non sono stati considerati nell’analisi. Di seguito sono riportati i nomi e le caratteristiche dei sette differenti database proteici utilizzati per l’identificazione. Sono stati utilizzati sia database recentemente pubblicati e ricavati da sequenze genomiche di specie affini (nello specifico, *Rhodospiridium toruloides*), sia database generati a partire da dati di sequenziamento genomico (specificamente, quelli ottenuti in seguito al sequenziamento parziale del ceppo C2.5T1, effettuato con tecnologia Illumina HiScanSQ presso i laboratori di Porto Conte Ricerche), sia database pubblici filtrati in base ad informazioni tassonomiche o funzionali. In particolare, per quanto riguarda il database “Rhodotorula-6FT”, le sequenze genomiche sono state processate secondo la strategia della *six-frame translation* (tramite lo script `translateWholeGenomeMultiChromosome.pl` disponibile nel sito

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

<http://proteomics.ucsd.edu/Downloads>), in modo da favorire la presenza di sequenze proteiche non identificabili utilizzando i classici algoritmi di *gene finding*, sulla base di un approccio proteogenomico in senso stretto (Armengaud et al., 2013). Per quanto riguarda invece il database “UniProtKB-beta-carotene”, è stata effettuata una ricerca preliminare tra le *entries* del database UniProtKB diretta agli enzimi putativamente coinvolti nei diversi stadi della via carotenogenica, a partire dall’ acetil-CoA C-acetiltransferasi fino alla licopene ciclasi, indipendentemente dall’organismo di provenienza; dall’insieme delle proteine presenti in database che soddisfacessero il criterio di ricerca è stato generato un file *fasta*, utilizzato successivamente come database per l’identificazione proteica.

Tabella 1. Database utilizzati per l’identificazione proteica a partire dai dati di spettrometria di massa.

Nome	Origine	Processamento	N° di sequenze
Rhodosporidium	Zhu <i>et al.</i> , 2012	annotazione NCBI/UniProtKB/KEGG	8157
Rhodotorula-TrEMBL	sequenze genomiche ottenute <i>in house</i> sul ceppo C2.5T1	annotazione sul UniProtKB/TrEMBL	24387
Rhodotorula-KOG	sequenze genomiche ottenute <i>in house</i> sul ceppo C2.5T1	annotazione KOG sul	24387
Rhodotorula-6FT	sequenze genomiche ottenute <i>in house</i> sul ceppo C2.5T1	<i>six-frame translation</i> sul	40608
UniProtKB-beta-carotene	UniProtKB (v.2013_11)	selezione enzimi della via carotenogenica	24048
UniProtKB-fungi	UniProtKB (v.2013_11)	selezione proteine fungine	2147770
UniProtKB-bacteria	UniProtKB (v.2013_11)	selezione proteine batteriche	37057423

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3.3 Risultati

3.3.1 Analisi differenziale 2D-DIGE su replicati tecnici

Dopo aver messo a punto le procedure di estrazione e precipitazione delle proteine e valutato la qualità delle mappe proteiche bidimensionali (dati non mostrati), è stato condotto un esperimento preliminare di 2D-DIGE su 3 replicati tecnici (stesso estratto proteico caricato in differenti gel) per ciascun ceppo, con lo scopo di valutare la capacità di tale approccio di individuare proteine differenzialmente espresse tra i tre ceppi di interesse.

La tecnologia DIGE (Difference In Gel Electrophoresis) permette di superare alcuni limiti dell'elettroforesi bidimensionale classica, ossia l'intrinseca differenza tra gel dovuta alla variazione nella polimerizzazione della poliacrilammide, e la richiesta di molti replicati del gel per ogni campione. Tramite l'approccio DIGE è possibile analizzare fino a tre campioni contemporaneamente sullo stesso gel grazie ad una marcatura preventiva delle proteine tramite coloranti fluorescenti, solitamente cianine (Ünlü et al., 1997). Nel classico disegno sperimentale di un esperimento dimarcatura minima, lo standard interno (solitamente costituito dal *pool* degli estratti proteici di tutti i campioni dell'esperimento) è marcato con la cianina Cy2 (blu, nell'immagine a falsi colori), e viene fatto migrare nello stesso gel con gli altri due campioni da confrontare, marcati in modo intercambiabile con la cianina Cy3 (verde) e la cianina Cy5 (rosso) (per "pool" si intende il pool di tutti i campioni dell'esperimento, utilizzato come standard interno). Lo standard interno è quindi caricato in tutti i gel contenenti campioni da confrontare tra loro, in modo da massimizzare l'efficacia dell'analisi differenziale. Lo schema sperimentale seguito per l'esperimento preliminare 2D-DIGE con i replicati tecnici dei tre ceppi di interesse è mostrato in Tabella 2. Poiché un esperimento comprendente 5 gel permette di analizzare 10 campioni, e i tre replicati tecnici per tre ceppi assommavano a 9 campioni totali, nel gel 5 è stato inserito un quarto replicato sovrannumerario del ceppo parentale C2.5t1.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Tabella 2. Disegno sperimentale dell'esperimento preliminare 2D-DIGE con replicati tecnici dei tre ceppi.

Gel n°	Cy2	Cy3	Cy5
1	pool	C2.5t1	400A15
2	pool	200A6	C2.5t1
3	pool	200A6	400A15
4	pool	C2.5t1	400A15
5	pool	200A6	C2.5t1

In seguito a marcatura fluorescente, i campioni sono stati miscelati, caricati su *strip* da 11 cm, e sottoposti a 2-D DIGE. Le mappe ottenute sono state quindi sottoposte ad analisi differenziale con il software DeCyder per valutare differenze di espressione tra i tre ceppi (C2.5t1 vs 400A15, C2.5t1 vs 200A6 e 400A15 vs 200A6). Gli *spot* che nel confronto tra due ceppi mostravano una variazione del livello di espressione superiore ad 1,5 ed un p-value inferiore a 0,05 (test t) sono stati considerati come differenziali. In Figura 1 sono mostrate tre immagini in sovrapposizione rappresentative dei confronti tra i tre ceppi; gli *spot* differenziali sono cerchiati in blu. In particolare, il confronto delle mappe proteomiche dei tre ceppi evidenziava una regione contenente proteine maggiormente espresse dal parentale C2.5t1 e dal mutante 400A15 rispetto al mutante albino 200A6.

I dati relativi all'intensità degli *spot* differenziali sono stati quindi utilizzati per condurre una Principal Component Analysis (PCA) ed una Hierarchical Cluster Analysis, i cui risultati sono mostrati in Figura 2. In base ai risultati di tali analisi, si può osservare come i replicati tecnici degli stessi ceppi clusterizzino perfettamente in tre gruppi distinti; inoltre, il mutante 400A15 si pone in posizione opposta rispetto al mutante albino 200A6, con il parentale C2.5t1 in posizione intermedia; infine, nel complesso i profili proteici del parentale C2.5t1 e del mutante 400A15 appaiono piuttosto simili tra loro e notevolmente differenti da quello del mutante albino 200A6.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

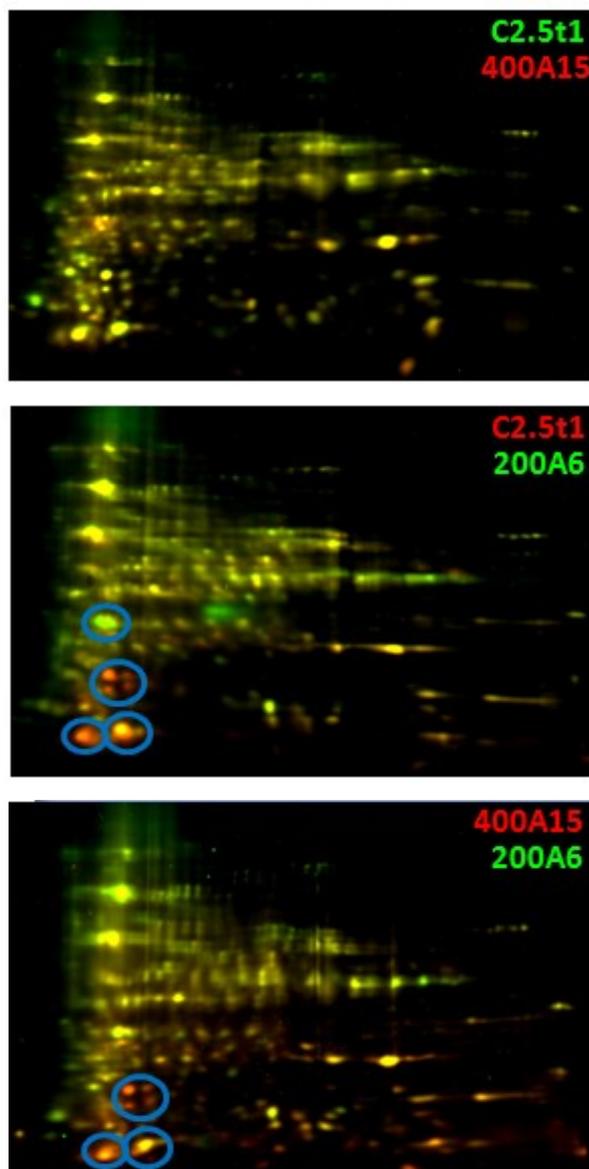


Figura 1. Immagini in sovrapposizione rappresentative dei confronti tra i tre ceppi, ottenute tramite analisi 2D-DIGE di replicati tecnici; gli *spot* differenziali sono cerchiati in blu.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

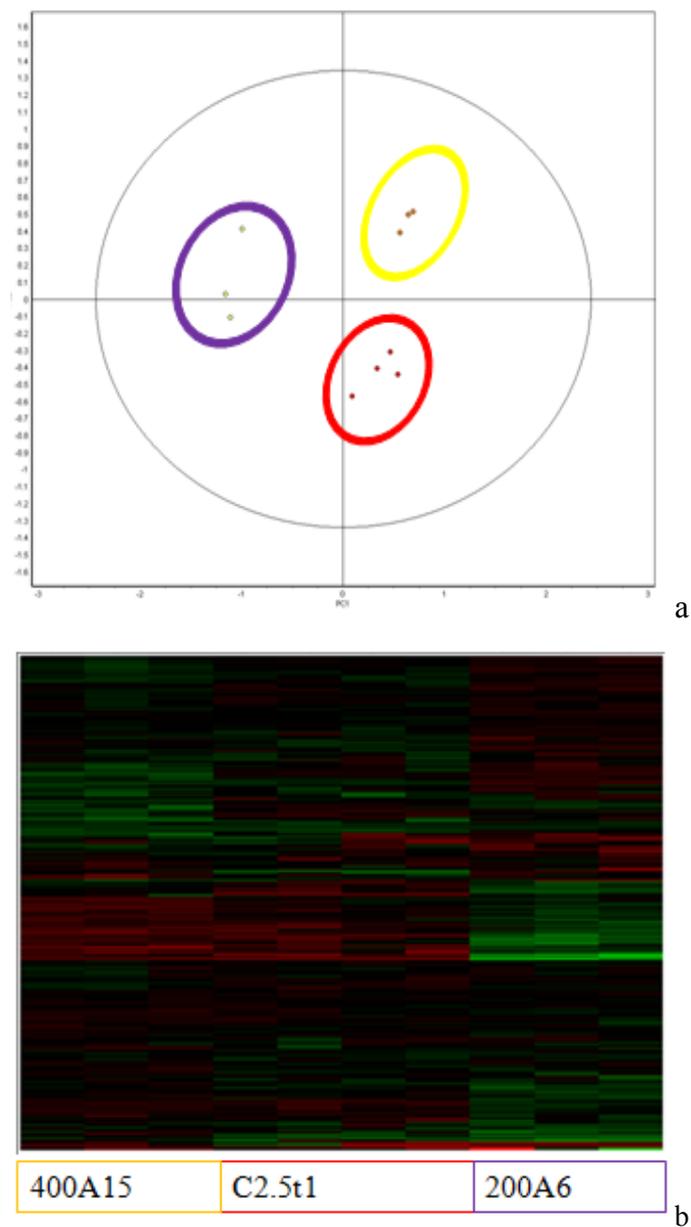


Figura 2. Raffigurazione dei risultati della Principal Component Analysis (a) e della Hierarchical Cluster Analysis (b). I cluster sono raffigurati in rosso per il ceppo C2.5t1, in giallo per il ceppo 400A15 e in viola per il ceppo 200A6.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3.3.2 Analisi differenziale 2D-DIGE su replicati biologici

Una volta verificata la capacità dell'approccio proteomico 2D-DIGE di discriminare efficacemente tra i tre ceppi, si è proceduto con un secondo esperimento 2D-DIGE in cui sono stati comparati gli estratti proteici ottenuti da tre replicati biologici (vale a dire 3 colture indipendenti) per ciascun ceppo, utilizzando *strip* e gel di dimensioni maggiori per aumentare la risoluzione dell'analisi. Lo schema sperimentale seguito è mostrato in Tabella 3. Anche in questo caso, poiché un esperimento comprendente 5 gel permette di analizzare 10 campioni, e i tre replicati biologici per tre ceppi assommavano a 9 campioni totali, nel gel 5 è stato inserito un quarto campione del ceppo mutante albino 200A6, ottenuto facendo il *pool* dei tre replicati biologici dello stesso ceppo.

Tabella 3. Disegno sperimentale dell'esperimento 2D-DIGE con replicati biologici dei tre ceppi.

Gel n°	Cy2	Cy3	Cy5
1	pool	C2.5t1 repl. 1	200A6 repl. 1
2	pool	400A15 repl. 1	C2.5t1 repl. 2
3	pool	200A6 repl. 2	400A15 repl. 2
4	pool	C2.5t1 repl. 3	200A6 repl. 3
5	pool	200A6 pool	400A15 repl. 3

In seguito a marcatura fluorescente, i campioni sono stati miscelati, caricati su *strips* da 24 cm, e sottoposti a 2-D DIGE. Le mappe ottenute sono state quindi sottoposte ad analisi differenziale con il software DeCyder per valutare differenze di espressione tra i tre ceppi (C2.5t1 vs 400A15, C2.5t1 vs 200A6 e 400A15 vs 200A6). Gli *spot* che nel confronto tra due ceppi mostravano una variazione del livello di espressione superiore ad 2 ed un p-value inferiore a 0,01 (test t) sono stati considerati come differenziali. Le soglie di relative alla variazione del livello di espressione e al p-value utilizzate in questo secondo esperimento differiscono da quelle adottate nel primo esperimento alla luce della maggiore diversità riscontrata tra i campioni e della maggiore risoluzione dell'esperimento (mappe da 24 cm e non da 11 cm). In Figura 3 sono mostrate tre immagini in sovrapposizione rappresentative dei

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

confronti tra i tre ceppi; i 38 *spot* differenziali sono cerchiati in blu. I risultati di questo esperimento hanno confermato in linea generale quelli ottenuti nell'esperimento preliminare, evidenziando una notevole somiglianza tra il ceppo parentale C2.5t1 e il mutante 400A15, al pari di una concordanza generale negli *spot* differenziali tra mutante albino 200A6 e gli altri due ceppi (ma con un andamento più marcatamente differenziale nel confronto con il mutante 400A15 rispetto al parentale).

I 38 *spots* differenziali sono stati quindi raggruppati in base a quattro andamenti (*trend*) principali, in relazione ai livelli di espressione delle proteine in ciascun ceppo rispetto ai restanti due. Come mostrato in Figura 4, il *trend* 1 comprende gli *spot* maggiormente intensi nel parentale e con intensità via via decrescente dal mutante 400A15 al mutante albino 200A6, il *trend* 2 comprende gli *spot* ad intensità medio-alta nel parentale, alta nel 400A15 e bassa nel mutante albino, il *trend* 3 comprende gli *spot* maggiormente intensi nel mutante 400A15 rispetto agli altri due ceppi, mentre il *trend* 4 comprende gli *spot* maggiormente intensi nel mutante albino 200A6 rispetto agli altri due ceppi. La Principal Component Analysis e la Hierarchical Cluster Analysis (Fig. 5) hanno confermato la differenziazione tra ceppi e la maggiore similarità di C2.5t1 e 400A15 rispetto al 200A6.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

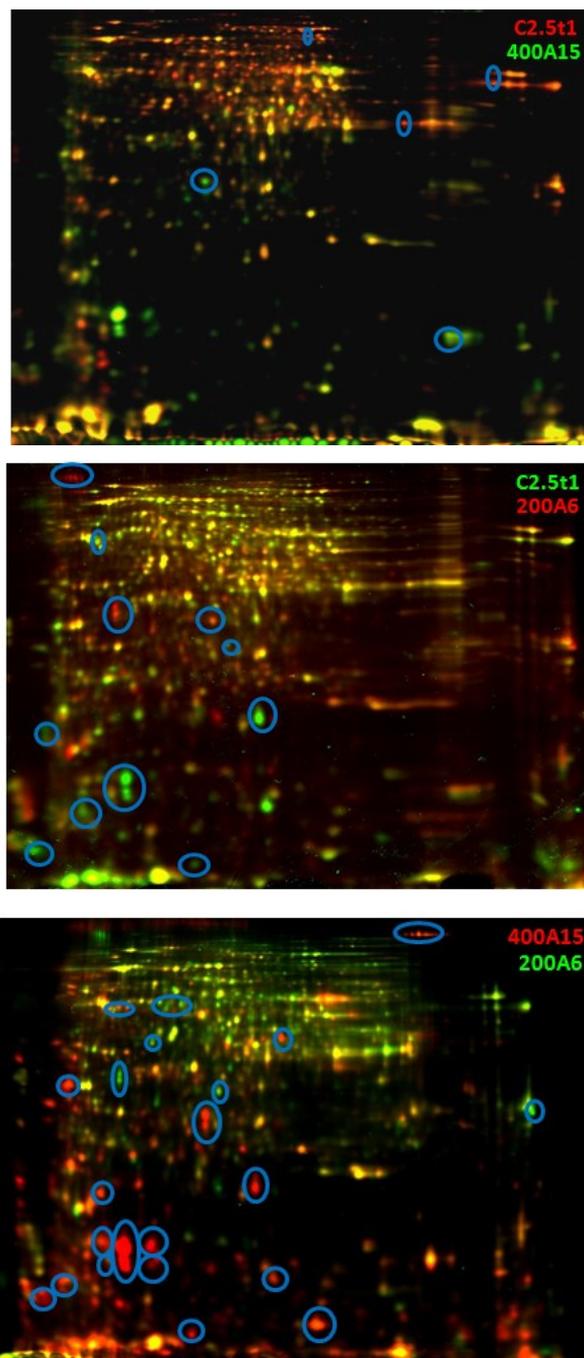


Figura 3. Immagini in sovrapposizione rappresentative dei confronti tra i tre ceppi, ottenute tramite analisi 2D-DIGE di replicati biologici; gli *spot* differenziali sono cerchiati in blu.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

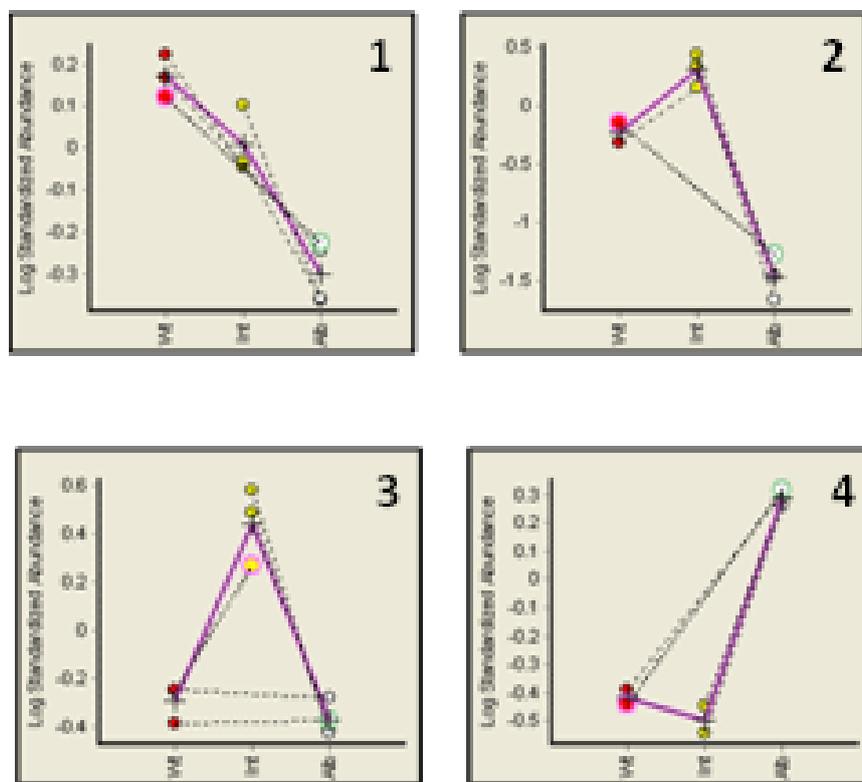


Figura 4. Principali *trend* di espressione degli *spot* differenzialmente espressi secondo l'analisi 2-D DIGE

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

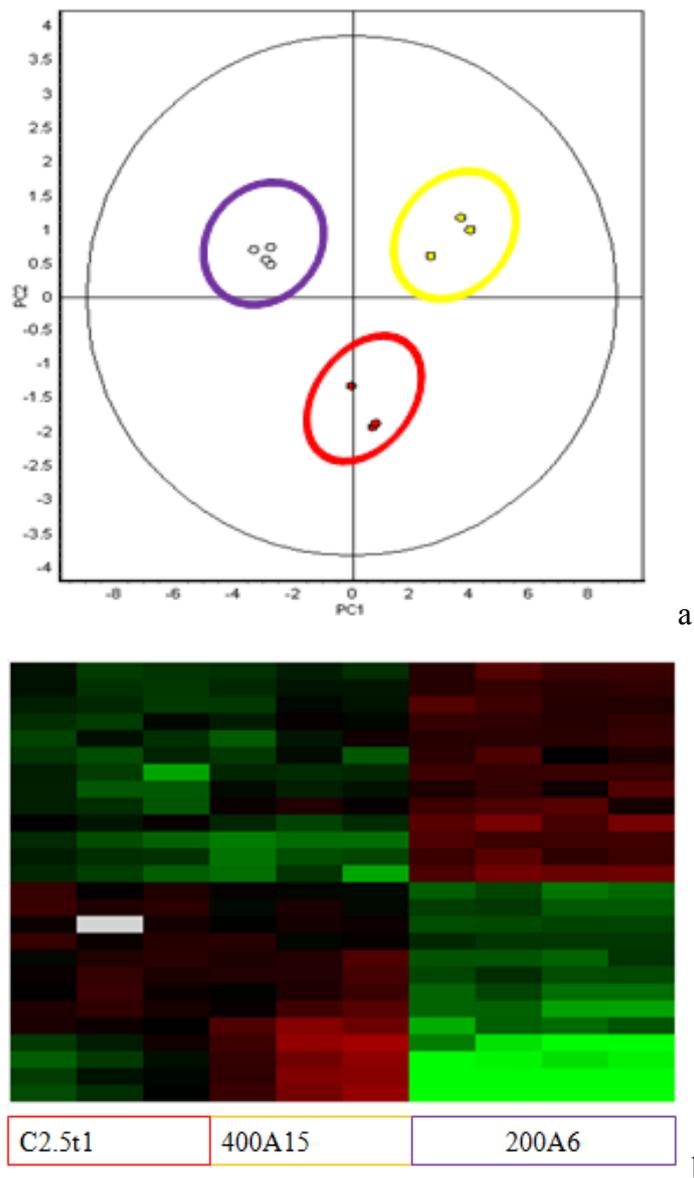


Figura 5. Raffigurazione dei risultati della Principal Component Analysis (a) e della Hierarchical Cluster Analysis (b). I cluster sono raffigurati in rosso per il ceppo C2.5t1, in giallo per il ceppo 400A15, ed in viola per il ceppo 200A6.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3.3.3 Identificazione in spettrometria di massa degli *spot* differenziali

In vista dell'identificazione in spettrometria di massa, si è proceduto alla generazione di gel preparativi (uno contenente il proteoma del ceppo parentale e l'altro quello del ceppo 400A15) dai quali sono stati escissi gli *spot* evidenziati come differenziali in base all'analisi DeCyder. Questi sono stati quindi sottoposti a digestione in gel con tripsina, e le miscele peptidiche così ottenute sono state analizzate tramite spettrometria di massa tandem.

Data la quasi assoluta assenza di sequenze di *R. glutinis* (ed in generale di microrganismi del genere *Rhodotorula*) nei principali database pubblici disponibili, si è proceduto con la costruzione e l'implementazione di vari tipi di database nel tentativo di massimizzare la capacità di identificazione delle proteine dei ceppi in esame. Sono stati impiegati parallelamente sette diversi database, sfruttando sia i risultati di un sequenziamento parziale del ceppo parentale C2.5t1 (con vari tipi di annotazione e processamento), sia le sequenze del genoma di *Rhodospiridium toruloides*, forma perfetta di *R. glutinis*, recentemente pubblicate, sia delle selezioni su base tassonomica di sequenze microbiche depositate ed annotate su UniProtKB; infine, è stato anche allestito un ultimo database specifico selezionando tutte le sequenze appartenenti ad enzimi della via carotenogenica (indipendentemente dall'organismo di appartenenza) presenti su UniProtKB.

Per quanto riguarda i *trend* descritti in precedenza, per l'identificazione in spettrometria di massa sono stati selezionati gli *spot* appartenenti ai *trend* 1, 2 e 3, in quanto maggiormente indiziati di contenere proteine (o frammenti di esse) putativamente correlate con la produzione di carotenoidi, e quindi in linea con lo scopo di questo lavoro.

3.3.3.1 Identificazioni riguardanti il *trend* 1

I cinque *spot* associati al *trend* 1 escissi ed analizzati in spettrometria di massa sono indicati nelle mappe in Figura 6. La lista completa delle identificazioni (ottenuta in seguito a selezione basata sulla presenza di annotazione funzionale e su un valore di confidenza >99% relativa all'identificazione peptidica) relative agli *spot* associati al *trend* 1 è invece presentata in Tabella 4. Complessivamente sono riportate 65 proteine associate a 72 sequenze peptidiche.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

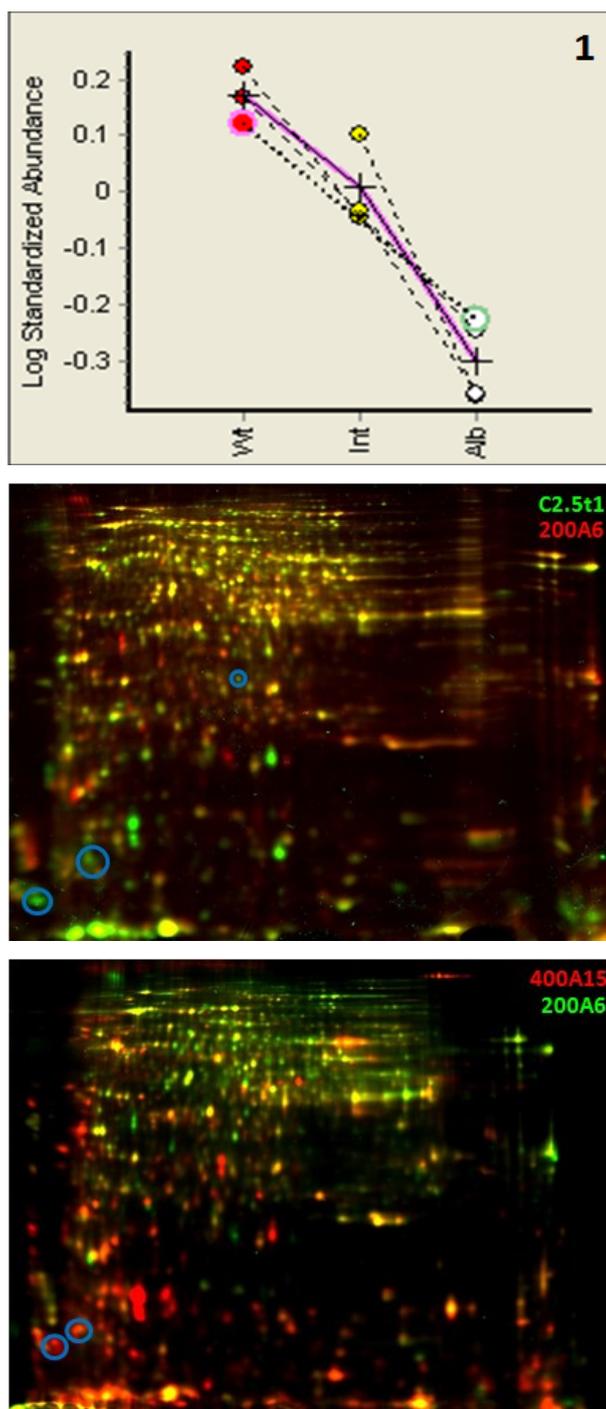


Figura 6. Immagine rappresentativa del *trend* 1 e indicazione degli *spot* differenziali appartenenti a tale *trend* analizzati in spettrometria di massa (cerchiati in blu).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Tabella 4. Lista delle identificazioni proteiche relative agli *spots* associati al *trend 1*.

Proteina	Organismo	Peptidi
40S ribosomal protein s14	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	2
ADP,ATP carrier protein	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	2
Argininosuccinate synthase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	2
Ca ²⁺ -binding actin-bundling protein	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	2
DEAD-domain-containing protein	<i>Wallemia sebi</i>	2
Isocitrate dehydrogenase (NADP⁺), mitochondrial	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	2
Small nuclear ribonucleoprotein D3	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	2
2',3-cyclic-nucleotide 2-phosphodiesterase	<i>Shewanella denitrificans</i>	1
Fructose-bisphosphate aldolase		1
40S ribosomal protein s19	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
40S ribosomal protein s20	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
40S ribosomal protein S6	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Aldehyde dehydrogenase		1
60S ribosomal protein l33		1
Acylglycerone-phosphate reductase, putative	<i>Cryptococcus gattii</i>	1
Agmatinase	<i>Verrucomicrobiae bacterium</i>	1
Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein	<i>Pelosinus fermentans</i>	1
Aldo-keto reductase	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	1
Alfa-L-rhamnosidase	<i>Treponema azotonutricium</i>	1
Arginine--tRNA ligase	<i>Conexibacter woesei</i>	1
ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1
ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	<i>Bacteriovorax sp.</i>	1
Carboxyl-terminal protease	<i>Thermovirga lienii</i>	1
CoA-binding domain-containing protein	<i>Acidovorax sp.</i>	1
DNA-directed RNA polymerase	<i>Propionibacterium sp.</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
ECF subfamily RNA polymerase sigma-24 factor	<i>Cupriavidus basilensis</i>	1
Enoyl-CoA hydratase/isomerase	<i>Marinobacter adhaerens</i>	1
Exopolyphosphatase	<i>Thioflavicoccus mobilis</i>	1
Fructose-bisphosphate aldolase, class II	<i>Providencia rustigianii</i>	1
Fructose-bisphosphate aldolase, class II	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Glucan 1,4-beta-glucosidase	<i>uncultured bacterium</i>	1
Glycosyl hydrolase family 76	<i>Colletotrichum graminicola</i>	1
Glycosyltransferase group 2 family protein	<i>Bacteroides sp.</i>	1
Glycyl-radical enzyme activating family protein	<i>Clostridium difficile</i>	1
Haloacid dehalogenase domain protein hydrolase		1
Histidinol-phosphate aminotransferase	<i>Collimonas fungivorans</i>	1
Large subunit ribosomal protein L31e	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Methyltransferase	<i>Lactococcus lactis</i>	1
Methyltransferase type 11	<i>Salinispora tropica</i>	1
Mitochondrial processing peptidase beta subunit	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Peptidase M1 membrane alanine aminopeptidase	<i>Desulfovibrio africanus</i>	1
Peptidase, M16 (Pitriylsin) family	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	1
PF14078 domain protein	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1
Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	<i>Clostridium difficile</i>	1
Phosphomevalonate kinase	<i>Ajellomyces capsulata</i>	1
Probable chemoreceptor glutamine deamidase	<i>Thermobrachium celere</i>	1
CheD		
PTS system, mannitol-specific IIC component	<i>Propionibacterium humerusii</i>	1
Putative heme-binding protein	<i>Solibacter usitatus</i>	1
Putative phage integrase	<i>Pandoraea sp.</i>	1
Putative ribokinase	<i>Frankia alni</i>	1
Putative transcriptional regulator	<i>Nocardia farcinica</i>	1
Pyridoxine 5'-phosphate synthase	<i>Prochlorococcus marinus</i>	1
RNA methyltransferase, TrmH family, group 3	<i>Neorickettsia sennetsu</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
RNP-1 like RNA-binding protein	<i>Leptonema illini</i>	1
S4 domain protein	<i>Clostridium hylemonae</i>	1
Sed5-binding protein 3, putative (Sec24-related protein 3, putative) (Lethal with sec13 protein 1, putative)	<i>Candida dubliniensis</i>	1
SIR2-like domain-containing protein	<i>Variovorax paradoxus</i>	1
Superfamily II DNA and RNA helicase	<i>Hahella chejuensis</i>	1
Surface antigen	<i>Psychrobacter sp.</i>	1
Transketolase, pyridine binding domain protein	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	1
Transposase	<i>Azospirillum brasilense</i>	1
Type I restriction-modification system S subunit (Fragment)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
Vacuolar protein sorting-associated protein 17	<i>Penicillium marneffeii</i>	1
WD40/YVTN repeat-like-containing domain contain protein 87 1231		1
Xylose and arabinose reductase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1

In verde le proteine variamente coinvolte nella produzione dell'acetil-CoA e in rosso le proteine coinvolte nella carotenogenesi.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3.3.3.2 Identificazioni riguardanti il *trend 2*

I 14 *spot* associati al *trend 2* escissi ed analizzati in spettrometria di massa sono indicati nelle mappe in Figura 7. La lista completa delle identificazioni (ottenuta in seguito a selezione basata sulla presenza di annotazione funzionale e su un valore di confidenza >99% relativa all'identificazione peptidica) relative agli *spot* associati al *trend 2* è invece presentata in Tabella 5. Complessivamente sono riportate 368 proteine associate a 443 sequenze peptidiche.

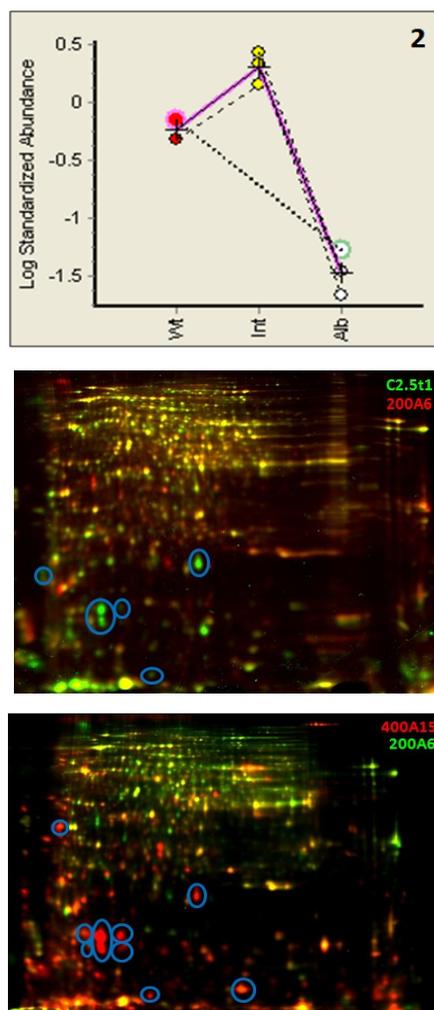


Figura 7. Immagine rappresentativa del *trend 2* e indicazione degli *spot* differenziali appartenenti a tale *trend* analizzati in spettrometria di massa (cerchiati in blu).

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Tabella 5. Lista delle identificazioni proteiche relative agli *spot* associati al *trend 2*.

Proteina	Organismo	Peptidi
ATP synthase subunit beta	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	9
40S ribosomal protein s18	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	6
Actin	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	6
Putative translation initiation factor 5A	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	6
40S ribosomal protein S14	<i>Verticillium dahliae</i>	5
40S ribosomal protein S14	<i>Taphrina deformans</i>	5
Actin	<i>Puccinia graminis</i>	5
40S ribosomal protein s13	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	4
Alpha tubulin	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	4
37S ribosomal protein S24, similar to 40S ribosomal protein S24		3
40S ribosomal protein s14	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	3
60S ribosomal protein l24	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	3
Beta-tubulin 2 (Fragment)	<i>Spiromyces minutus</i>	3
DNA damage checkpoint protein rad24		3
Heat shock 70kDa protein 1/8	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	3
Histone H2B	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	3
Protein of chaperonin Cpn60 family	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	3
Tubulin beta	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	3
3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	2
40S ribosomal protein S12	<i>Mixia osmundae</i>	2
40S ribosomal protein S15	<i>Dacryopinax sp.</i>	2
40S ribosomal protein s20	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	2
40S ribosomal protein s7	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	2
4896.SPBC8D2.18c-1 Adenosylhomocysteinase		2
Blue-light-inducible Bli-3 protein	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	2
Chloride channel protein	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	2
Elongation factor Tu	<i>Koribacter versatilis</i>	2

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Fructose-bisphosphate aldolase		2
GTP-binding nuclear protein Ran	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	2
Heat shock protein 70 (Fragment)	<i>Pneumocystis carinii</i>	2
Large subunit ribosomal protein L14e	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	2
Oxidoreductase		2
Rab family GTPase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	2
Ras GTPase-activating protein	<i>Pseudozyma antarctica</i>	2
[Protein-PII] uridylyltransferase	<i>Brevundimonas subvibrioides</i>	1
14-3-3 protein		1
23S rRNA (Uracil-5-)-methyltransferase RumA	<i>Enterococcus durans</i>	1
26S proteasome non-atpase regulatory subunit 11	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	<i>Novosphingobium lindaniclasticum</i>	1
30S ribosomal protein S7	<i>Firmicutes bacterium</i>	1
3-carboxy-cis,cis-muconate lactonizing enzyme	<i>Nostoc sp.</i>	1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
40S ribosomal protein S0	<i>Rhodotorula glutinis</i>	1
40S ribosomal protein S11	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	1
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	1
50S ribosomal protein L19	<i>Caulobacter sp.</i>	1
50S ribosomal protein L29	<i>Allochromatium vinosum</i>	1
5-methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase	S- <i>Thermus sp.</i>	1
5'-nucleotidase, C-terminal domain protein	<i>Prevotella veroralis</i>	1
60S ribosomal protein l11	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
60S ribosomal protein L20	<i>Rhodotorula glutinis</i>	1
60S ribosomal protein l21	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
60S ribosomal protein L26	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
60S ribosomal protein l35	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
6-phosphogluconate decarboxylating	dehydrogenase, <i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
6-phosphogluconolactonase		1
ABC transporter related	<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	1
ABC transporter related	<i>Methylobacterium sp.</i>	1
ABC transporter related protein	<i>Methylocystis sp.</i>	1
ABC transporter related protein	<i>Ethanoligenens harbinense</i>	1
ABC transporter-related protein	<i>Shewanella loihica</i>	1
AbiBL11	<i>Bacillus cereus</i>	1
Acetolactate synthase	<i>Arthrobacter</i> <i>phenanthrenivorans</i>	1
Acetyl-CoA acetyltransferase	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	1
Acetyl-coenzyme A carboxylase transferase subunit beta	<i>Alicyclobacillus</i> <i>acidoterrestris</i>	1
Actin lateral binding protein	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Acyl-CoA dehydrogenase	<i>Pseudomonas sp.</i>	1
Adenylate kinase	<i>Thioflaviccoccus mobilis</i>	1
Adenylate kinase	<i>Podospora anserina</i>	1
Adenylate/guanylate cyclase with Chase sensor	<i>Microcoleus vaginatus</i>	1
ADP-glucose pyrophosphorylase	<i>Anoxybacillus sp.</i>	1
Alanine--tRNA ligase	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1
Alcohol dehydrogenase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein	<i>Pelosinus fermentans</i>	1
Aldehyde dehydrogenase	<i>Aspergillus oryzae</i>	1
Aldo-keto reductase	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	1
Alpha-amylase, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	1
Amino acid ABC transporter permease	<i>Burkholderia glumae</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Amino acid ABC transporter substrate-binding protein, PAAT family	<i>Magnetococcus sp.</i>	1
Aminoglycoside/hydroxyurea resistance kinase	antibiotic <i>Mesorhizobium ciceri</i>	1
Aminomethyltransferase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Ankyrin motif protein	<i>Wolbachia endosymbiont</i>	1
Ankyrin repeat-containing protein, putative	<i>Penicillium marneffeii</i>	1
Anti-sigma factor antagonist	<i>Marinitoga piezophila</i>	1
Argininosuccinate synthase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Aspartokinase	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1
AT-less polyketide synthase	<i>Streptomyces platensis</i>	1
ATPase, P-type (Transporting), superfamily, subfamily IC	HAD <i>Thioalkalimicrobium aerophilum</i>	1
ATPase, P-type, K/Mg/Cd/Cu/Zn/Na/Ca/Na/H-transporter	<i>Cordyceps militaris</i>	1
ATP-dependent DNA helicase (Fragment)	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	1
ATP-dependent DNA helicase RecG	<i>Flavobacteria bacterium</i>	1
ATP-dependent DNA ligase domain protein	<i>Brevundimonas diminuta</i>	1
ATP-dependent RNA helicase DOB1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1
BAR adaptor protein Hob3		1
Benzoylformate decarboxylase	<i>Oceanicola granulosus</i>	1
Bifunctional protein GlmU	<i>Bdellovibrio exovorius</i>	1
Biopolymer transport protein	<i>Treponema azotonutricium</i>	1
Bll2237 protein	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1
Calmodulin-binding protein kinase	<i>Arthrotrichs dactyloides</i>	1
Capsular exopolysaccharide family	<i>Coralimargarita sp.</i>	1
Capsular exopolysaccharide family	<i>Thiothrix nivea</i>	1
Carbohydrate kinase superfamily protein	<i>Propionibacterium avidum</i>	1
Catalytic activity: adenosine 3' (EC 3.1.3.7)		1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
CBS domain containing protein	<i>Frankia sp.</i>	1
CCAAT-box-binding transcription factor	<i>Metarhizium acridum</i>	1
Cell division protein ftsA	<i>Bartonella birtlesii</i>	1
Cell envelope-related transcriptional attenuator	<i>Streptomyces violaceusniger</i>	1
Cellobiose PTS, EIIC	<i>Lactobacillus ruminis</i>	1
Chaperone protein DnaK	<i>Frankia sp.</i>	1
Chemotaxis protein cheA	<i>Clostridium tetani</i>	1
Chemotaxis protein CheA	<i>Erwinia amylovora</i>	1
Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	<i>Delftia acidovorans</i>	1
Cob(I)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	<i>Sporomusa ovata</i>	1
Cobaltochelataze	<i>Desulfotomaculum kuznetsovii</i>	1
Conjugative transfer protein TraG	<i>Rickettsia endosymbiont</i>	1
Conserved domain protein	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	1
Conserved hypothetical ATP-dependent protease	<i>Shewanella frigidimarina</i>	1
Copper-transporting ATPase	<i>Trichophyton equinum</i>	1
CRISPR-associated helicase, Cas3 family	<i>Oscillatoria acuminata</i>	1
Cys/Met metabolism pyridoxal-phosphate-dependent enzyme	<i>Kordia algicida</i>	1
Cytidylate kinase	<i>Oxalobacter formigenes</i>	1
Cytochrome P450 phenylacetate hydroxylase	<i>Aspergillus kawachii</i>	1
D-galactarate dehydratase	<i>Yersinia frederiksenii</i>	1
DGQHR domain protein	<i>Cyanothece sp.</i>	1
Dihydroxyacetone kinase	<i>Burkholderia thailandensis</i>	1
Dimethylaniline monooxygenase 2	<i>Marssonina brunnea</i>	1
Diphosphate-fructose-6-phosphate phosphotransferase	1- <i>Dysgonomonas gadei</i>	1
DL-methionine transporter ATP-binding subunit	<i>Pseudomonas sp.</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
DNA adenine methylase Dam	<i>Citrobacter freundii</i>	1
DNA damage checkpoint protein rad24	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
DNA methylase N-4/N-6 domain protein	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i>	1
DNA mismatch repair protein MutS	<i>Labrenzia aggregata</i>	1
DNA primase	<i>Myxococcus fulvus</i>	1
DNA replication helicase dna2	<i>Coprinopsis cinerea</i>	1
DNA-directed RNA polymerase	<i>Eutypa lata</i>	1
DNA-directed RNA polymerase subunit	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
DUF3140 family protein	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Duf89 domain protein	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
DUTP pyrophosphatase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Efflux pump antibiotic resistance protein, putative	<i>Talaromyces stipitatus</i>	1
Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	<i>Marichromatium purpuratum</i>	1
Elongation factor 1-beta	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	1
Elongation factor P	<i>Prevotella sp.</i>	1
Elongation factor Tu	<i>Mycoplasma hyorhina</i>	1
Endonuclease MutS2	<i>Clostridium saccharolyticum</i>	1
Endonuclease MutS2	<i>Prevotella marshii</i>	1
Enolase	<i>Sphingomonas wittichii</i>	1
Enolase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
Enolase (Fragment)	<i>Borrelia burgdorferi</i>	1
Epoxide hydrolase domain protein	<i>Frankia sp.</i>	1
Equisetin synthetase, putative	<i>Penicillium digitatum</i>	1
Extracellular ligand-binding receptor	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>	1
Ferredoxin--nitrite reductase	<i>Natranaerobius thermophilus</i>	1
Fis family transcriptional regulator	<i>Pseudomonas putida</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
GAS2 domain protein	<i>Aspergillus clavatus</i>	1
Glutamate--tRNA ligase	<i>Barnesiella intestinhominis</i>	1
Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit D	<i>Patulibacter sp.</i>	1
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase		1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	<i>Corioloopsis gallica</i>	1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2		1
Glycerate 2-kinase	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	1
Glycolate oxidase	<i>Deinococcus geothermalis</i>	1
Glycosyl hydrolase family 2 sugar binding domain protein	<i>Faecalibacterium sp.</i>	1
Glycosyl transferase group 1	<i>Frankia sp.</i>	1
Glycosyl transferase group 1	<i>Gordonia bronchialis</i>	1
Glycosyltransferase family 39 protein	<i>Hypocrea virens</i>	1
Golgi SNAP receptor complex member 1	<i>Podospora anserina</i>	1
Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing protein	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
HAMP domain protein	<i>Desulfosporosinus sp.</i>	1
Helicase c2	<i>Opitutus terrae</i>	1
Helicase PriA essential for oriC/DnaA-independent DNA replication	<i>Sphingobium japonicum</i>	1
Histidinol dehydrogenase		1
Histidinol dehydrogenase		1
Histidinol-phosphate aminotransferase family protein	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	1
Histone H2B		1
Holo-[acyl-carrier-protein] synthase	<i>Mycoplasma sp.</i>	1
Homocysteine hydrolase (Fragment)	<i>Cyberlindnera mississippiensis</i>	1
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>Elizabethkingia anophelis</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	<i>Singulisphaera acidiphila</i>	1
Inositol monophosphatase/fructose-1,6-bisphosphatase family protein	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1
Integral membrane sensor signal transduction histidine kinase	<i>beta proteobacterium</i>	1
Integrase	<i>Bifidobacterium longum</i>	1
Iron-regulated ABC transporter permease protein SufD	<i>Microcoleus sp.</i>	1
Iron-regulated colicin receptor	<i>Wolinella succinogenes</i>	1
Isocitrate dehydrogenase	<i>Halomonas sp.</i>	1
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	<i>Geomyces destructans</i>	1
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	1
Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	1
Isoleucine--tRNA ligase	<i>Thermotoga petrophila</i>	1
Isovaleryl-CoA dehydrogenase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Kinesin family member 5	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Lambda family phage tail tape measure protein	<i>Escherichia coli</i>	1
Leucine rich repeat protein	<i>Alistipes sp.</i>	1
LPXTG-motif cell wall anchor domain protein	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
LPXTG-motif cell wall anchor domain-containing protein (Fragment)	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1
Lysine--tRNA ligase	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	1
Lysophospholipase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
LysR family transcriptional regulator	<i>Acidovorax sp.</i>	1
Major ampullate spidroin 1	<i>Azospirillum amazonense</i>	1
Mechanosensitive ion channel MscS	<i>Arthrospira platensis</i>	1
Metallo-beta-lactamase domain protein	<i>Peptostreptococcaceae bacterium</i>	1

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Methyl-accepting chemotaxis protein	<i>Clostridium botulinum</i>	1
Methyl-accepting chemotaxis protein	<i>Xanthomonas fragariae</i>	1
Mitochondrial NADH kinase	<i>Grosmannia clavigera</i>	1
Multi-sensor hybrid histidine kinase	<i>Koribacter versatilis</i>	1
Muskelin		1
N(6)-adenine-specific DNA methyltransferase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	<i>Azospirillum sp.</i>	1
NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 4	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (Carboxylating)	<i>Desulfotomaculum reducens</i>	1
Nitrate/sulfonate/bicarbonate ABC transporter permease protein	<i>Microbacterium sp.</i>	1
Non-ribosomal peptide synthase	<i>Anabaena variabilis</i>	1
Nucleolar protein 12	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
NUDIX hydrolase	<i>Thermaerobacter marianensis</i>	1
Outer membrane efflux protein	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	1
Outer membrane protein	<i>Burkholderiales bacterium</i>	1
Outer membrane protein/peptidoglycan-associated (Lipo)protein	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	1
Oxidoreductase	<i>Streptomyces sp.</i>	1
Pentatricopeptide repeat domain-containing protein	<i>Marssonina brunnea</i>	1
Peptidase C1-like family	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	1
Peptidase M17, leucyl aminopeptidase	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	1
Peptidase M23	<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	1
Peptide ABC transporter periplasmic peptide-	<i>Oceanimonas doudoroffii</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
binding protein		
Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	<i>Methylophaga thiooxydans</i>	1
Periplasmic sensor hybrid histidine kinase	<i>Burkholderia cepacia</i>	1
Peroxiredoxin 5, atypical 2-Cys peroxiredoxin	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Peroxisomal biogenesis factor		1
Phosphate acyltransferase	<i>Rhodovulum sp.</i>	1
Phosphate binding protein (Secreted protein)	<i>Frankia sp.</i>	1
Phosphoglucomutase		1
Phosphoglucosamine mutase	<i>Azospirillum amazonense</i>	1
Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase / IMP cyclohydrolase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Phosphotransferase system IIC component ptsC1	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	1
PHP domain protein	<i>Denitrovibrio acetiphilus</i>	1
Phytoene synthase-related protein	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	1
PhzA	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1
Pmt6 protein mannosyltransferase	<i>Candida orthopsilosis</i>	1
Podospora anserina S mat+ genomic DNA chromosome 3, supercontig 1	<i>Podospora anserina</i>	1
Polyketide synthase	<i>Bacillus subtilis</i>	1
PqiB family protein	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
Primary replicative DNA helicase	<i>Chromohalobacter salexigens</i>	1
Prolyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	1
Propionyl-CoA carboxylase	<i>Frankia sp.</i>	1
Protein kinase	<i>Ajellomyces capsulata</i>	1
Protein SlyX homolog	<i>Methylomonas methanica</i>	1
Protein-(Glutamine-N5) methyltransferase	<i>Gardnerella vaginalis</i>	1
Pseudouridine synthase	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	1
Pseudouridine synthase	<i>Leptospira biflexa</i>	1
Psp2p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
PspC family transcriptional regulator	<i>Streptococcus mitis</i>	1
PTS system, glucose-specific IIBC component	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1
PTS system, mannitol-specific IIC component	<i>Propionibacterium humerusii</i>	1
Putative aaa family atpase protein	<i>Eutypa lata</i>	1
Putative ABC transporter, ATP-binding protein with duplicated ATPase domains	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	1
Putative beta-glucosidase	<i>Wallemia sebi</i>	1
Putative DNA-binding protein	<i>Bacteroides sp.</i>	1
Putative enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase II	<i>Streptococcus anginosus</i>	1
Putative heme-binding protein	<i>Solibacter usitatus</i>	1
Putative HTH-type transcriptional regulator yulB	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	1
Putative integral membrane protein	<i>Campylobacter hominis</i>	1
Putative kinesin heavy chain protein	<i>Eutypa lata</i>	1
Putative lipoprotein	<i>Myxococcus xanthus</i>	1
Putative lycopene cyclase	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	1
Putative neuronal calcium sensor Ncs1	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Putative oxidoreductase with molybdenum-binding domain	<i>Mesorhizobium metallidurans</i>	1
Putative P450 monooxygenase	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	1
Putative phosphomevalonate kinase	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	1
Putative pyruvate, phosphate dikinase regulatory protein	<i>Bartonella bovis</i>	1
Putative sensor histidine kinase	<i>Flavobacteria bacterium</i>	1
Putative serine/threonine protein kinase	<i>Streptomyces sp.</i>	1
Putative signal transduction histidine kinase	<i>Sphingobium chlorophenicum</i>	1
Putative transcriptional regulator, MarR type	<i>Staphylococcus carnosus</i>	1
Putative transcriptional regulator, TetR family	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	1
Putative UDP-NAc-glucosamine:2-	<i>Streptomyces lividus</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
deoxystreptamine 4-glycosyltransferase		
Pyruvate carboxylase	<i>Puccinia triticina</i>	1
Pyruvate dehydrogenase (Lipoamide)	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	1
Pyruvate kinase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
RAS small monomeric GTPase Rab6	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Related to carbonic anhydrase	<i>Ustilago hordei</i>	1
Replicative DNA helicase	<i>Polynucleobacter necessarius</i>	1
RfbL protein	<i>Methylophaga lonarensis</i>	1
Rhamnulokinase	<i>Cronobacter dublinensis</i>	1
Rhodanese-related sulfurtransferase	<i>Clostridium termitidis</i>	1
Riboflavin synthase, alpha subunit	<i>Prevotella oris</i>	1
Ribonuclease HII	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	1
Ribose-5-phosphate isomerase A	<i>Candidatus Nitrospira</i>	1
Ribosomal protein L11 methyltransferase	<i>Eubacterium sp.</i>	1
Ribosomal protein, putative	<i>Cryptococcus gattii</i>	1
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	<i>Acetobacteraceae bacterium</i>	1
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase E	<i>Afipia sp.</i>	1
Ribulose biphosphate carboxylase large chain	<i>Pseudanabaena sp.</i>	1
RNA polymerase sigma factor	<i>Cyanothece sp.</i>	1
S4 domain protein	<i>Clostridium hylemonae</i>	1
S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase- isomerase	<i>Pelosinus fermentans</i>	1
Sarcosine oxidase, alpha subunit family	<i>Sinorhizobium medicae</i>	1
Sensor histidine kinase	<i>Dehalobacter sp.</i>	1
Serine/threonine protein kinase	<i>Pseudomonas sp.</i>	1
Serine/threonine-protein phosphatase	<i>Rhizopus delemar</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Short-chain dehydrogenase	<i>Aeromonas veronii</i>	1
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	<i>Thalassospira profundimaris</i>	1
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	<i>Rhodothermus marinus</i>	1
Signal peptidase I	<i>Dorea sp.</i>	1
Site-specific recombinases, DNA invertase Pin homologs	<i>Roseburia intestinalis</i>	1
Sodium/potassium-transporting ATPase, alpha subunit	<i>Azoarcus sp.</i>	1
Succinate dehydrogenase or fumarate reductase, flavoprotein subunit	<i>Tannerella sp.</i>	1
Sugar diacid utilization regulator	<i>Herbaspirillum sp.</i>	1
Sugar hydrolase	<i>Streptomyces collinus</i>	1
Sulfate adenyltransferase, large subunit	<i>Corynebacterium sp.</i>	1
Sulfurtransferase	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	1
Surface antigen	<i>Psychrobacter sp.</i>	1
Synaptobrevin-like protein Syb11, putative	<i>Penicillium marneffeii</i>	1
Tail length tape measure protein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
Tat pathway signal sequence domain protein	<i>Dialister invisus</i>	1
TBC domain-containing protein	<i>Ajellomyces dermatitidis</i>	1
Tetratricopeptide TPR_4	<i>Haliangium ochraceum</i>	1
Thiamine-monophosphate kinase	<i>Sphingobium sp.</i>	1
Thioredoxin	<i>Streptomyces tsukubaensis</i>	1
Thioredoxin peroxidase Tpx1	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	1
Thioredoxin, TRX family protein	<i>Psychroflexus gondwanensis</i>	1
TonB-dependent receptor plug	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	1
TraB pilus assembly family protein	<i>Yersinia bercovieri</i>	1
Transcription elongation factor GreA	<i>Atopobium vaginae</i>	1
Transcription elongation factor NusA	<i>Osedax symbiont</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Transcriptional antiterminator	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	1
Transcriptional regulator	<i>Pseudomonas sp.</i>	1
Transcriptional regulator, AsnC family	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	1
Transcriptional regulator, DeoR family	<i>Sulfurihydrogenibium sp.</i>	1
Transcriptional regulator, LacI family	<i>Stackebrandtia nassauensis</i>	1
Transcriptional regulator, LacI family protein	<i>Erythrobacter sp.</i>	1
Transcriptional regulator, LysR family protein	<i>Burkholderia gladioli</i>	1
Transcriptional regulator, MerR family	<i>Methylobacterium extorquens</i>	1
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	1
Translation initiation factor eIF-4A	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	1
Translation initiation factor IF-2	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1
Translation machinery-associated protein 22	<i>Spathaspora passalidarum</i>	1
Transmembrane protein 16K	<i>Magnaporthe oryzae</i>	1
Transposase	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	1
Trichodiene synthase	<i>Myrothecium roridum</i>	1
Triosephosphate isomerase	<i>Saprospira grandis</i>	1
tRNA	N6-adenosine <i>Campylobacter hominis</i>	1
threonylcarbamoyltransferase		
tRNA pseudouridine synthase A	<i>Clostridium sp.</i>	1
tRNA(Ile)-lysidine synthase	<i>Pediococcus claussenii</i>	1
Tubulin beta chain	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
Tubulin beta chain (Fragment)	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	1
Twitching motility protein	<i>Lautropia mirabilis</i>	1
Two-component response regulator for zraP	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	1
Type II secretion system protein K	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1
Type IV fimbrial assembly, ATPase PilB	<i>Clostridiaceae bacterium</i>	1
Type IV pilus secretin PilQ	<i>Neisseria sp.</i>	1
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm1	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Ubiquinone biosynthesis protein coq9		1
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	<i>Pseudozyma antarctica</i>	1
Ubiquitin fusion degradation protein Ufd1	<i>Ajellomyces capsulata</i>	1
UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase	<i>Chryseobacterium sp.</i>	1
UDP-N-acetylmuramoylpentapeptide-lysine N(6)-alanyltransferase	<i>Streptococcus thermophilus</i>	1
UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	<i>Bifidobacterium dentium</i>	1
Uncharacterized high-glucose-regulated protein	<i>Pseudozyma antarctica</i>	1
Uncharacterized iron-regulated protein-like protein	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	1
Uncharacterized protein containing a von Willebrand factor type A (VWA) domain	<i>Microcoleus sp.</i>	1
Urease	<i>Aspergillus niger</i>	1
UvrABC system protein B	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1
UvrABC system protein C	<i>Parvularcula bermudensis</i>	1
UvrD/Rep helicase family protein	<i>Roseburia hominis</i>	1
YahG	<i>Enterobacter cloacae</i>	1
YCII-like protein	<i>Koribacter versatilis</i>	1
Yst0336-like domain protein	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
zinc finger, RING-type protein		1

In verde le proteine variamente coinvolte nella produzione dell'acetil-CoA, in blu le proteine coinvolte nella glicolisi e in rosso le proteine coinvolte nella carotenogenesi.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3.3.3.3 Identificazioni riguardanti il *trend 3*

Gli 11 *spot* associati al *trend 3* escissi ed analizzati in spettrometria di massa sono indicati nelle mappe in Figura 8. La lista completa delle identificazioni (ottenuta in seguito a selezione basata sulla presenza di annotazione funzionale e su un valore di confidenza >99% relativa all'identificazione peptidica) relative agli *spot* associati al *trend 3* è invece presentata in Tabella 6. Complessivamente sono riportate 401 proteine associate a 445 sequenze peptidiche.

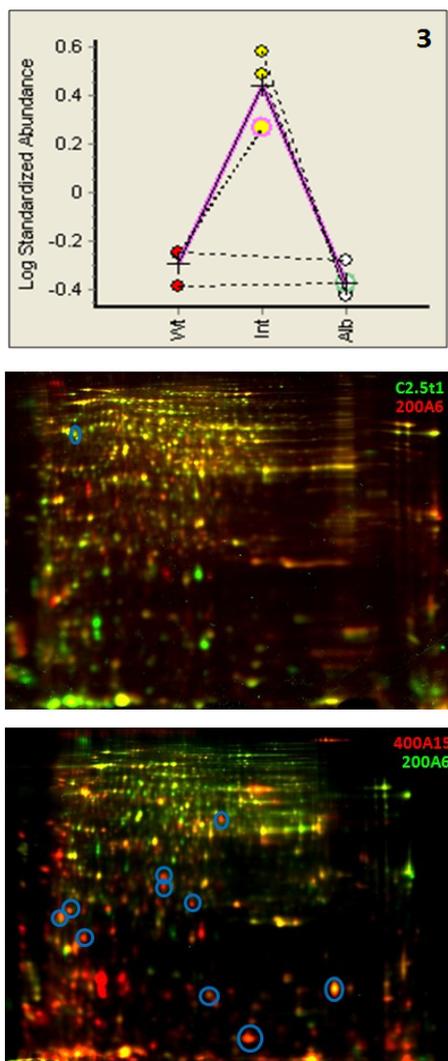


Figura 8. Immagine rappresentativa del *trend 3* e indicazione degli *spot* differenziali appartenenti a tale *trend* analizzati in spettrometria di massa (cerchiati in blu).

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Tabella 6. Lista delle identificazioni proteiche relative agli *spots* associati al *trend 3*.

Proteina	Organismo	Peptidi
ATP synthase subunit beta	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	8
ATP synthase subunit beta	<i>Mixia osmundae</i>	6
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	6
Putative subunit of the heterotrimeric G protein	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	6
Blue-light-inducible Bli-3 protein	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	5
Putative ADP/ATP carrier of the mitochondrial inner membrane	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4
Phosphoglyceromutase		3
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	3
Putative acetate kinase	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3
ATP synthase subunit beta	<i>Desulfotomaculum reducens</i>	2
ATP synthase subunit beta	<i>Mesorhizobium alhagi</i>	2
ATP synthase subunit beta	<i>Prochlorococcus marinus</i>	2
Heat shock protein S	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	2
Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	2
Putative heat shock protein 70 (Fragment)	<i>Piromyces sp.</i>	2
Putative translation initiation factor 5A	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2
Similar to hsp70		2
Translationally controlled tumor protein-like protein	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	2
(P)ppGpp synthetase, RelA/SpoT family	<i>[Eubacterium] cylindroides</i>	1
1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1
2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	<i>Hoeflea phototrophica</i>	1
2-isopropylmalate synthase	<i>Leptospirillum sp.</i>	1
3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	<i>Candidatus</i>	1

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
	<i>Kinetoplastibacterium</i>	
3-oxoacyl-(Acyl carrier protein) synthase III	<i>Providencia alcalifaciens</i>	1
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	<i>Bacillus cereus</i>	1
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASII	<i>Formosa sp.</i>	1
40S ribosomal protein s0		1
40S ribosomal protein s25	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
40S ribosomal protein s4	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
40s ribosomal protein s5	<i>Arthroderma otae</i>	1
40S ribosomal protein S7	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	1
40S ribosomal protein s7	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding domain-containing protein	<i>Clostridium saccharolyticum</i>	1
4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	<i>Synechococcus sp.</i>	1
4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	<i>Streptomyces aurantiacus</i>	1
50S ribosomal protein L3	<i>Thauera sp.</i>	1
50S ribosomal protein L31	<i>Clostridium celatum</i>	1
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase	<i>Listeriaceae bacterium</i>	1
6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1
60S ribosomal protein L20	<i>Rhodotorula glutinis</i>	1
60S ribosomal protein L6	<i>Phanerochaete carnososa</i>	1
ABC transporter related protein	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	1
ABC-2 type transporter	<i>Thermovibrio ammonificans</i>	1
ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease component	<i>Aequorivita sublithicola</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system, permease component	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	1
Acetyl-CoA acetyltransferase	<i>Corynebacterium striatum</i>	1
Acetyl-CoA C-acetyltransferase	<i>Leptospira borgpetersenii</i>	1
Acetylornithine aminotransferase	<i>Coprococcus eutactus</i>	1
Acyl-[acyl-carrier-protein]--UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase	<i>Psychromonas ingrahamii</i>	1
Acyl-CoA dehydrogenase domain protein	<i>Meiothermus silvanus</i>	1
Acyl-CoA dehydrogenase-like protein	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i>	1
Acyl-protein synthetase	<i>Photobacterium aquimaris</i>	1
Adenine-specific DNA methylase	<i>Microscilla marina</i>	1
Adenylate kinase	<i>Sphingomonas sp.</i>	1
Adenylate kinase	<i>Thermincola potens</i>	1
Adenylate/guanylate cyclase family protein	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1
Adenylosuccinate synthetase	<i>Anaplasma centrale</i>	1
Aldehyde dehydrogenase	<i>Desulfotignum phosphitoxidans</i>	1
Aldehyde dehydrogenase		1
Aldo/keto reductase	<i>Burkholderia sp.</i>	1
Aldo/keto reductase family protein	<i>Sphingomonas sp.</i>	1
Aldo-keto reductase	<i>Streptomyces mobaraensis</i>	1
Aliphatic sulfonate ABC transporter ATP-binding protein	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1
Alpha,alpha-trehalase, glycoside hydrolase family 37 protein 97 792		1
Alpha/beta hydrolase family protein	<i>Leptospira sp.</i>	1
Alpha/beta hydrolase fold protein	<i>Marinomonas mediterranea</i>	1
Alpha-2-macroglobulin domain protein	<i>Pelobacter propionicus</i>	1
Alpha-glucosidase	<i>Intrasporangium calvum</i>	1

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Amid-like NADH oxidoreductase 65 470		1
Amine oxidase	<i>Wallemia sebi</i>	1
Amino acid adenylation	<i>Anabaena variabilis</i>	1
Aminotransferase	<i>Nocardioides sp.</i>	1
Aminotransferase class I and II	<i>Thermus thermophilus</i>	1
Amp-dependent synthetase ligase	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1
Anion transporter ATPase	<i>Mycobacterium sp.</i>	1
Ankyrin repeat containing protein yar1	<i>Ophiostoma piceae</i>	1
Ankyrin repeat protein	<i>uncultured bacterium</i>	1
Ankyrin repeat-containing protein	<i>Glarea lozoyensis</i>	1
Anthranilate synthase component 1	<i>Helicobacter pylori</i>	1
APA family basic amino acid/polyamine antiporter	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	1
AraC family transcriptional regulator	<i>Burkholderia sp.</i>	1
Arginine decarboxylase	<i>Caminibacter mediatlanticus</i>	1
Arginine--tRNA ligase	<i>Bacteroidetes bacterium</i>	1
Argininosuccinate synthase	<i>Liberibacter crescens</i>	1
ATP synthase gamma chain	<i>Mycoplasma anatis</i>	1
ATP synthase subunit beta	<i>Desulfotomaculum acetoxidans</i>	1
ATP synthase subunit beta	<i>Thermodesulfovibrio yellowstonii</i>	1
ATPase/histidine kinase/DNA gyrase B/HSP90 domain protein	<i>Capnocytophaga sputigena</i>	1
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	<i>Ruminococcus sp.</i>	1
ATP-dependent Clp protease, protease subunit 65 269		1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
ATP-dependent DNA helicase RecG	<i>Firmicutes bacterium</i>	1
ATP-dependent RNA helicase DBP4	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	1
ATP-dependent RNA helicase mss116	<i>Metarhizium acridum</i>	1
ATP-dependent RNA helicase, DEAD box family	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	1
Autophagy-related protein 11	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	1
Bacterial SNF2 helicase associated	<i>Streptococcus macacae</i>	1
Bacteriophage replication protein A	<i>Methylobacillus flagellatus</i>	1
BAR adaptor protein Hob3 66 262		1
Beta-N-acetylhexosaminidase	<i>Exiguobacterium sp.</i>	1
Binuclear zinc transcription factor	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1
BNR/Asp-box repeat protein	<i>Dermacoccus sp.</i>	1
C2H2 transcription factor (AmdA), putative	<i>Penicillium marneffeii</i>	1
Calcium-translocating P-type ATPase, PMCA-type	<i>Bacillus cereus</i>	1
CAP-Gly domain-containing protein	<i>Marssonina brunnea</i>	1
Carbonic anhydrase	<i>Aspergillus kawachii</i>	1
Carboxypeptidase Y inhibitor		1
Cation diffusion facilitator family transporter	<i>Enterococcus sulfureus</i>	1
Chromatin remodelling complex ATPase chain ISW1	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	1
Citrate synthase	<i>Turicella otitidis</i>	1
ClpP/crotonase	<i>Glarea lozoyensis</i>	1
CoA-substrate-specific enzyme activase	<i>Elusimicrobium minutum</i>	1
Coatomer subunit beta	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	1
Cobalamin synthesis protein/P47K family protein	<i>Herbaspirillum sp.</i>	1
Competence protein F	<i>Caulobacter crescentus</i>	1
CorJ	<i>Corallocooccus coralloides</i>	1
CRISPR system CASCADE complex protein	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
CasB		
CRISPR-associated helicase Cas3	<i>Roseomonas cervicalis</i>	1
CRISPR-associated helicase, Cas3 family	<i>Oscillatoria acuminata</i>	1
CRISPR-associated protein Cas6	<i>Deferribacter desulfuricans</i>	1
Cse1 family CRISPR-associated protein	<i>Lactobacillus pasteurii</i>	1
Cya	<i>Congregibacter litoralis</i>	1
Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Cytochrome c	<i>Azospira oryzae</i>	1
Cytochrome c551 peroxidase	<i>Sulfurovum sp.</i>	1
D-2-hydroxyacid dehydrogenase (Fragment)	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<i>Roseibium sp.</i>	1
Deoxyribose-phosphate aldolase	<i>Oceanicola granulosis</i>	1
Diguanylate cyclase	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	1
Diguanylate cyclase (GGDEF) domain-containing protein	<i>Novosphingobium sp.</i>	1
Diguanylate cyclase/phosphodiesterase with PAS/PAC sensor(S)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	1
D-lactate dehydrogenase 2, mitochondrial precursor 68 589		1
DNA gyrase subunit A	<i>Prochlorococcus marinus</i>	1
DNA helicase	<i>Erythrobacter sp.</i>	1
DNA mismatch repair protein MLH3 68 946		1
DNA mismatch repair protein MutS	<i>Brevundimonas sp.</i>	1
DNA photolyase FAD-binding protein	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i>	1
DNA polymerase	<i>Verticillium dahliae</i>	1
DNA polymerase	<i>Agaricus bisporus</i>	1
DNA repair protein RAD50 (Fragment)	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	1
DNA/RNA helicase, DEAD/DEAH box		1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
type 68 1812		
DNA/RNA helicase, superfamily II	<i>Clostridium sp.</i>	1
DNA-directed RNA polymerase	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	1
DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	<i>gamma proteobacterium</i>	1
Drug resistance transporter, EmrB/QacA subfamily	<i>Saccharomonospora glauca</i>	1
dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	<i>Exophiala dermatitidis</i>	1
Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase	<i>Marssonina brunnea</i>	1
EAL domain-containing protein	<i>Sulfurospirillum barnesii</i>	1
Efflux ABC transporter, permease protein	<i>Tannerella forsythia</i>	1
Electron transfer flavoprotein subunit alpha	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	1
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	<i>Rhizopus delemar</i>	1
Exodeoxyribonuclease 7 small subunit	<i>Thermobifida fusca</i>	1
Exodeoxyribonuclease V alpha chain	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1
Exonuclease SbcC	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1
Exopolyphosphatase-like enzyme	<i>Desulfosporosinus orientis</i>	1
Exopolysaccharide biosynthesis polyprenyl glycosylphosphotransferase	<i>Coprococcus catus</i>	1
FACT complex component Spt16 70 963		1
FAD linked oxidase	<i>Azoarcus sp.</i>	1
Ferric reductase transmembrane component 3	<i>Verticillium albo-atrum</i>	1
Flagellar assembly protein FliH	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	1
Flagellar biosynthesis protein FlhA	<i>Clostridium botulinum</i>	1
Formate dehydrogenase	<i>Candida tropicalis</i>	1
Formyltetrahydrofolate synthetase (Fragment)		1
FtsX-like permease family protein (Fragment)	<i>Clostridium difficile</i>	1
Fungal specific transcription factor domain	<i>Grosmannia clavigera</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
containing protein		
GAF modulated sigma54 specific transcriptional regulator, Fis family	<i>Methylotenera mobilis</i>	1
Galactokinase	<i>Treponema saccharophilum</i>	1
Galactokinase	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	1
Gamma-glutamyl phosphate reductase	<i>Sinorhizobium medicae</i>	1
Geranyltranstransferase (Farnesyl-diphosphate synthase)	<i>Bacillus bataviensis</i>	1
GHKL domain protein	<i>Clostridium sp.</i>	1
Glutamate dehydrogenase	<i>Salmonella enterica</i>	1
Glutamate dehydrogenase	<i>Marivirga tractuosa</i>	1
Glutathione S-transferase domain protein	<i>Acidovorax delafieldii</i>	1
Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	<i>Coprobacillus sp.</i>	1
Glycine-rich RNA-binding protein 8	<i>uncultured Desulfobacterium</i>	1
Glycoside hydrolase family 31	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	1
Glycosyl transferase	<i>Sphingobium sp.</i>	1
Glycosyl transferase, group 1 family protein	<i>Candidatus Poribacteria</i>	1
Glycosyltransferase, group 1 family protein	<i>Prevotella saccharolytica</i>	1
GntR family transcriptional regulator	<i>Halomonas sp.</i>	1
GroES-like protein	<i>Helicobacter pullorum</i>	1
GTP cyclohydrolase 1	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	1
Hat2 protein	<i>Candida orthopsilosis</i>	1
heat shock protein Hsp90		1
Heavy metal efflux pump, CzcA family protein	<i>Helicobacter pylori</i>	1
Helix-turn-helix domain protein	<i>Mucilaginibacter paludis</i>	1
Helix-turn-helix type 11 domain-containing protein	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	1
Hemolysin-type calcium-binding region:RTX N-	<i>Synechococcus sp.</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
terminal domain		
High-affinity nickel-transport family protein	<i>Sorangium cellulosum</i>	1
Holo-[acyl-carrier-protein] synthase	<i>Mycoplasma sp.</i>	1
HPrNtr	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	1
Hrp1p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
HtrA2 peptidase	<i>Acidovorax avenae</i>	1
HxlR family transcriptional regulator	<i>Arthrobacter sp.</i>	1
Leucine rich repeat protein	<i>Spraguea lophii</i>	1
Lipoprotein releasing system transmembrane protein	<i>Salinisphaera shabanensis</i>	1
Lycopene beta-cyclase	<i>Medicago truncatula</i>	1
Lycopene beta-cyclase 5 (Fragment)	<i>Ipomoea batatas</i>	1
M6 family metalloprotease domain protein	<i>Prevotella sp.</i>	1
Major outer membrane protein (Fragment)	<i>Chlamydia trachomatis</i>	1
Malate synthase		1
Malic enzyme, NAD binding domain protein	<i>Turicibacter sanguinis</i>	1
Maltooligosyl trehalose synthase	<i>Azotobacter vinelandii</i>	1
Maltose permease	<i>Sphaerulina musiva</i>	1
Mannosyl-glycoprotein acetylglucosaminidase	endo-beta-N- <i>Prevotella sp.</i>	1
Membrane-associated phospholipid phosphatase	<i>Xanthomonas perforans</i>	1
Metal dependent phosphohydrolase	<i>Syntrophobotulus glycolicus</i>	1
Metal-dependent hydrolase	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1
Methyl-accepting chemotaxis protein	<i>Rhodovulum sp.</i>	1
Methyl-accepting chemotaxis protein	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
Methylthioribose-1-phosphate isomerase	<i>Beijerinckia indica</i>	1
Methyltransferase type 11	<i>Sulfurospirillum deleyianum</i>	1
MFS transporter, putative	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1
MicA protein	<i>Planktothrix prolifica</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Mitochondrial inner membrane protease, subunit IMP1	<i>Pseudozyma antarctica</i>	1
Mitochondrial intermediate peptidase	<i>Magnaporthe oryzae</i>	1
Molybdenum cofactor guanylyltransferase	<i>Paracoccus aminophilus</i>	1
Mrr restriction system protein	<i>Campylobacter showae</i>	1
N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	<i>Planctomyces maris</i>	1
NAD dependent epimerase/dehydratase family	<i>Synechococcus sp.</i>	1
NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 30 kDa subunit	<i>Geobacillus sp.</i>	1
NADH-quinone oxidoreductase subunit D	<i>Bergeyella zoohelcum</i>	1
NADPH-dependent glutamate synthase beta chain-like oxidoreductase	<i>Desulfitobacterium dichloroeliminans</i>	1
Negative regulator of beta-lactamase expression	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	1
Nitrile hydratase beta subunit	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	1
Nitrite and sulphite reductase 4Fe-4S region	<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	1
Nitrite reductase (Fragment)		1
Nitrite reductase large subunit	<i>Vibrio proteolyticus</i>	1
Nitroreductase	<i>Acidovorax delafieldii</i>	1
Non-ribosomal peptide synthase PNJ1108	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	1
Non-ribosomal peptide synthetase	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1
Nucleoid-associated protein TherJR_0069	<i>Thermincola potens</i>	1
O-antigen export system ATP-binding protein RfbB	<i>Clostridium sp.</i>	1
Oleoyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase	<i>Eubacterium eligens</i>	1
Oligoendopeptidase F	<i>Granulibacter bethesdensis</i>	1
O-methyltransferase family 2	<i>Microcystis aeruginosa</i>	1
OnnB		1
Outer membrane porin	<i>Cupriavidus sp.</i>	1
Oxidoreductase domain protein	<i>Beutenbergia cavernae</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Oxidoreductase domain-containing protein	<i>Rhodopirellula europaea</i>	1
PAB1 binding protein (Pbp1), putative	<i>Aspergillus clavatus</i>	1
ParB/RepB/Spo0J family partition domain protein (Fragment)	<i>Escherichia coli</i>	1
Patatin	<i>Mycobacterium gilvum</i>	1
Patatin-like phospholipase domain-containing protein	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	1
Penicillin-binding protein, transpeptidase domain protein	<i>Leptospira sp.</i>	1
Peptidase M23	<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i>	1
Peptidoglycan glycosyltransferase	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	1
Peptidoglycan glycosyltransferase	<i>Micromonospora sp.</i>	1
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Naumovozyma castellii</i>	1
Periplasmic protease	<i>Prevotella dentalis</i>	1
Permease, YjgP/YjgQ family	<i>Fusobacterium varium</i>	1
Phage portal protein, HK97 family	<i>Delftia acidovorans</i>	1
Phosphoglucosamine mutase	<i>Azospirillum amazonense</i>	1
Phosphoglucosamine mutase	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	1
Phosphoglucosamine mutase		1
Phosphomannomutase/phosphoglucomutase-like protein	<i>Ramlibacter tataouinensis</i>	1
Phosphopantetheine-binding protein (Fragment)	<i>Saccharomonospora paurometabolica</i>	1
Phosphopantothenoylcysteine decarboxylase/phosphopantothenate/cysteine ligase	<i>Desulfovibrio sp.</i>	1
Phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	<i>Burkholderia thailandensis</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Phytoene dehydrogenase-related protein	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
Phytoene synthase	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	1
Phytoene synthase	<i>Solanum lycopersicum</i>	1
Phytoene synthase	<i>Verticillium dahliae</i>	1
Phytoene synthase-related protein	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	1
Pmt6 protein mannosyltransferase	<i>Candida orthopsilosis</i>	1
Polar amino acid ABC transporter, inner membrane subunit	<i>Spirochaeta smaragdinae</i>	1
Polyketide synthase (Fragment)	<i>Streptomyces albus</i>	1
Polymorphic outer membrane protein (Fragment)	<i>Chlamydia psittaci</i>	1
Polyubiquitin		1
PQQ enzyme repeat protein	<i>Propionibacterium propionicum</i>	1
Probable kinetochore protein NDC80	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1
Probable malate:quinone oxidoreductase	<i>Shigella dysenteriae</i>	1
Probable phytoene synthase phyA	<i>Mycobacterium bovis</i>	1
Probable S-methyl-5'-thioinosine phosphorylase		1
Proline/betaine transporter	<i>Azospirillum sp.</i>	1
Prophage PSPPH06, putative reverse transcriptase/maturase	<i>Pseudomonas avellanae</i>	1
Propionyl-CoA carboxylase	<i>Frankia sp.</i>	1
Proteasome subunit beta type	<i>Schizophyllum commune</i>	1
Protein containing C-terminal region of TrgB protein	<i>Microvirga sp.</i>	1
Protein kinase WD40	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	1
Protein of chaperonin Cpn60 family	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Protein T24A6.7	<i>Clostridium butyricum</i>	1
Protein translocase subunit SecD	<i>Thermanaerovibrio</i>	1

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
	<i>acidaminovorans</i>	
Proton-coupled thiamine transporter YuaJ	<i>Clostridium sp.</i>	1
Pseudouridine synthase	<i>Methylococcus capsulatus</i>	1
Purine nucleoside phosphorylase	<i>Kazachstania africana</i>	1
Putative 4-coumarate-ligase protein	<i>Togninia minima</i>	1
Putative ABC transporter, permease protein (DUF140 domain protein)	<i>Campylobacter lari</i>	1
Putative aluminum resistance protein	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1
Putative bacteriophage membrane protein	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1
Putative Capsular polysaccharide biosynthesis glycosyltransferase CapM	<i>Candidatus Nitrospira</i>	1
Putative cation-transporting ATPase	<i>Frankia alni</i>	1
Putative chain length determinant	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1
Putative cytochrome protein	<i>Eutypa lata</i>	1
Putative diguanylate cyclase/phosphodiesterase domain 1	<i>Cronobacter dublinensis</i>	1
Putative enoyl-CoA hydratase EchA14 (Enoyl hydrase) (Unsaturated acyl-CoA hydratase) (Crotonase)	<i>Mycobacterium canettii</i>	1
Putative enzyme of poly-gamma-glutamate biosynthesis (Capsule formation)	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	1
Putative histone acetyltransferase component tra1p	<i>Dekkera bruxellensis</i>	1
Putative hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>Candidatus Nitrosopumilus</i>	1
Putative lipopolysaccharide biosynthesis protein		1
Putative low-complexity protein	<i>Xenococcus sp.</i>	1
Putative LRR containing protein	<i>Trachipleistophora hominis</i>	1
Putative lycopene beta cyclase	<i>Prochlorococcus marinus</i>	1
Putative oxidoreductase	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Putative PI3/PI4-kinase family protein C1F5.11c	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	1
Putative pilin protein Pile	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	1
Putative PTS system, cellobiose-specific IIC component	<i>Enterococcus faecalis</i>	1
Putative signal peptidase I	<i>Streptomyces bingchenggensis</i>	1
Putative transcriptional regulator, Crp/Fnr family	<i>Gloeocapsa sp.</i>	1
Putative two-component response regulator	<i>Austwickia chelonae</i>	1
Putative xanthine dehydrogenase	<i>Erythrobacter sp.</i>	1
Pyridine nucleotide-disulfide family oxidoreductase	<i>Enterococcus gilvus</i>	1
Pyruvate kinase	<i>Campylobacter concisus</i>	1
Radical SAM domain protein	<i>Desulfococcus oleovorans</i>	1
Radical SAM superfamily protein	<i>Clostridium difficile</i>	1
Ras-related protein Rab-1A	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
RecQ family helicase	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1
Related to TraI protein (Partial length)	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	1
Response regulator receiver domain protein	<i>Actinomyces johnsonii</i>	1
Response regulator receiver protein	<i>Rhodopirellula maiorica</i>	1
Response regulator receiver sensor signal transduction histidine kinase	<i>Calothrix sp.</i>	1
Reverse transcriptase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Rhamnulokinase	<i>Cronobacter dublinensis</i>	1
Ribose-5-phosphate isomerase A	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	1
Ribose-phosphate pyrophosphokinase	<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3	<i>Taphrina deformans</i>	1
Ribosomal protein L7Ae family protein	<i>Dehalobacter sp.</i>	1
Ribosomal RNA small subunit methyltransferase I	<i>Halanaerobium praevalens</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
RNA polymerase sigma-54 factor RpoN	<i>Clostridiaceae bacterium</i>	1
RNA polymerase-associated protein RapA	<i>Vibrio fluvialis</i>	1
RNA-directed DNA polymerase	<i>Xanthomonas campestris</i>	1
ROK family protein	<i>Cellvibrio gilvus</i>	1
SAC3-like protein	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	1
Sec-independent protein translocase protein TatA	<i>Bacteroides sp.</i>	1
Secreted TPR-repeat containing protein	<i>Kordia algicida</i>	1
Selenide, water dikinase	<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i>	1
Serine peptidase (Alpha/beta hydrolase superfamily) fused to N-terminal uncharacterized domain specific to cyanobacteria	<i>Prochlorococcus marinus</i>	1
Serine/threonine-protein kinase SRPK	<i>Fusarium oxysporum</i>	1
SET domain protein	<i>Aspergillus flavus</i>	1
Shikimate kinase	<i>Streptococcus oralis</i>	1
Short chain dehydrogenase	<i>Parvularcula bermudensis</i>	1
Sigma-54 dependent transcriptional regulator	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	1
Signal peptide peptidase SppA, 36K type	<i>Nakamurella multipartita</i>	1
Signal-transduction protein	<i>Moraxella catarrhalis</i>	1
Similar to small nucleolar ribonucleoprotein complex subunit	<i>Leptosphaeria maculans</i>	1
Similar to uniprot P53858 Saccharomyces cerevisiae YNL233w BNI4 bud neck involved	<i>Candida glabrata</i>	1
Site-2 protease	<i>Acidovorax citrulli</i>	1
Small nucleolar ribonucleoprotein complex subunit Utp14	<i>Marssonina brunnea</i>	1
Spa2-like protein	<i>Beauveria bassiana</i>	1
Spindle-pole body protein (Pcp1), putative	<i>Aspergillus clavatus</i>	1
Splicing factor u2af-associated protein 2	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
SQS PSY, Squalene/phytoene synthase-like protein	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	1
Squalene synthetase (Fragment)	<i>Candida maltosa</i>	1
Squalene/phytoene synthase	<i>Planococcus antarcticus</i>	1
Strain CBS138 chromosome L complete sequence	<i>Candida glabrata</i>	1
Sulfate ABC transport system, thiosulfate-binding protein	<i>Erwinia amylovora</i>	1
TBC-domain-containing protein	<i>Dichomitus squalens</i>	1
Terpene synthase family protein	<i>Methylomicrobium album</i>	1
TetR family transcriptional regulator	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	1
Tetratricopeptide repeat domain containing protein	<i>Synechococcus sp.</i>	1
Tetratricopeptide repeat protein	<i>Prevotella sp.</i>	1
Thiol:disulfide interchange protein DsbD thioredoxin 116 634	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1
Thioredoxin reductase	<i>Helicobacter pylori</i>	1
Thioredoxin-like protein	<i>Candida tenuis</i>	1
TonB-dependent copper receptor		1
TonB-linked outer membrane protein, SusC/RagA family	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	1
Topoisomerase I	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1
Toxic anion resistance family protein	<i>Paenibacillus sp.</i>	1
Toxin-antitoxin system, toxin component, PIN family	<i>Clostridium hathewayi</i>	1
Transaldolase	<i>Ashbya aceri</i>	1
Transcription elongation factor GreA	<i>Atopobium vaginae</i>	1
Transcriptional regulator	<i>Rivularia sp.</i>	1
Transcriptional regulator	<i>Azotobacter vinelandii</i>	1

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Transcriptional regulator, AraC family	<i>Halomonas elongata</i>	1
Transcriptional regulator, AraC family protein	<i>Synechococcus sp.</i>	1
Transcriptional regulator, MarR family	<i>Clostridium sp.</i>	1
Transcriptional repressor of the arabinose operon	<i>Melissococcus plutonius</i>	1
Translation initiation factor IF-2	<i>Talaromyces stipitatus</i>	1
Translation initiation factor IF-2	<i>Treponema denticola</i>	1
Translation initiation factor IF-2	<i>Glaciecola nitratireducens</i>	1
Translationally controlled tumor protein	<i>Pichia angusta</i>	1
Translationally-controlled tumor protein homolog	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
Transporter involved in surfactin self-resistance	<i>Bacillus sp.</i>	1
tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	<i>Pseudomonas sp.</i>	1
tRNA nucleotidyltransferase (CCA-adding enzyme) 116 661		1
Tryptophan--tRNA ligase	<i>Clostridium sp.</i>	1
Two-component response regulator	<i>Bacillus sp.</i>	1
Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3		1
UBX domain protein, putative	<i>Aspergillus flavus</i>	1
UDP-N-acetylglucosamine carboxyvinyltransferase	1- <i>Rickettsia amblyommii</i>	1
UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	<i>Synergistetes bacterium</i>	1
UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	1
UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	<i>Puniceispirillum marinum</i>	1
Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein yhiH	<i>uncultured Desulfobacterium</i>	1
Uroporphyrin-III C-methyltransferase	<i>Frankia symbiont</i>	1
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	<i>Schizophyllum commune</i>	1

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Proteina	Organismo	Peptidi
Virulence factor Mce family protein	<i>Gordonia bronchialis</i>	1
Virulence-associated protein vagC	<i>Pantoea sp.</i>	1

In verde le proteine variamente coinvolte nella produzione dell'acetil-CoA, in blu le proteine coinvolte nella glicolisi e in rosso le proteine coinvolte nella carotenogenesi.

3.4 Discussione

Il principale ostacolo all'identificazione proteomica di enzimi espressi da microrganismi non convenzionali (per i quali, quindi, la quantità di dati genomici disponibili è piuttosto scarsa, se non nulla) è rappresentato dalla carenza di sequenze di tali enzimi nei database utilizzati per l'analisi di dati di spettrometria di massa. Infatti, l'identificazione delle proteine avviene tramite comparazione degli spettri osservati sperimentalmente con spettri ottenuti *in silico* a partire da database contenenti le sequenze proteiche note per l'organismo analizzato, o per organismi filogeneticamente vicini o ad alto tasso di omologia di sequenza per i geni di interesse. Affinché l'identificazione superi le normali soglie di significatività ed accuratezza richieste, l'appaiamento tra spettro sperimentale e spettro *in silico* deve essere estremamente stringente. Per questo, anche una minima variazione nella serie aminoacidica tra la sequenza realmente tradotta dall'organismo analizzato e la sequenza depositata (anche se altamente omologa) può comportare la totale impossibilità di identificazione. Il miglioramento delle prestazioni dell'identificazione in omologia costituisce una delle sfide dei prossimi anni per numerosi campi di applicazione della proteomica, ad esempio in quello vegetale (Carpentier e America, 2014).

In base a tale premessa, il bassissimo numero di sequenze peptidiche (non superiore ad uno) associate alle singole identificazioni di enzimi carotenogenici presentate in questo lavoro può essere spiegato con la presenza di differenze sostanziali nella sequenza di tali geni in *R. glutinis* rispetto ad altri microrganismi (procariotici ed eucariotici) che codificano proteine con le stesse funzioni catalitiche. Da un punto di vista bioinformatico, ciò assimila la sequenza degli enzimi di *R. glutinis* ad una sorta di "puzzle" di porzioni di sequenze di *entries* proteiche differenti, rendendo impossibile il raggiungimento di un sufficiente livello di copertura di sequenza per tali proteine. In particolare, è interessante notare che nessuna delle

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

identificazioni di enzimi carotenogenici ottenute in questo lavoro sia associata a sequenze di *R. toruloides*, nonostante la notevole vicinanza tassonomica tra tale lievito e *R. glutinis* e il buon livello di completezza della sequenza genomica recentemente depositata per *R. toruloides*. Un altro fattore da considerare è certamente rappresentato dal fatto che le principali proteine che presentano una variazione di espressione tra i tre ceppi analizzati in questo studio potrebbero verosimilmente non essere correlate alla carotenogenesi: da un lato, perché variazioni fenotipiche nella produzione di pigmenti potrebbero essere dovute a meccanismi regolativi post-traduzionali o allosterici e non ad una reale variazione di espressione degli enzimi; dall'altro, perché, essendo i ceppi 400A15 e 200A6 originati da mutagenesi casuale, non è improbabile che buona parte delle variazioni di espressione rilevate in proteomica siano in realtà imputabili a mutazioni casuali non correlate con il fenotipo (vale a dire con un incremento o una assenza di produzione di carotenoidi).

Nonostante i limiti del sistema biologico e le difficoltà bioinformatiche dello studio, è stato comunque possibile identificare nei ceppi di interesse 16 sequenze peptidiche associate ad enzimi di vari organismi che hanno un ruolo nella via carotenogenica. Inoltre, sono state identificate 21 sequenze peptidiche appartenenti ad enzimi di vari organismi, tra cui *R. toruloides*, variamente coinvolti nella produzione di acetil-CoA. Per quanto preliminari, questi risultati portano comunque a formulare un'ipotesi che spieghi almeno in parte la maggior produzione di β -carotene nel mutante 400A15. Secondo tale ipotesi la maggiore espressione delle proteine associate alle sequenze identificate come diidrossiacetone chinasi, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, glicerato chinasi e piruvato chinasi sembrerebbe funzionale alla produzione di una maggiore quantità di piruvato a partire dalla fonte di carbonio utilizzata (glicerolo). D'altra parte, anche la maggior espressione delle proteine associate alle sequenze identificate come citrato sintasi, isocitrato deidrogenasi, malato sintasi, e enzima malico porterebbe ad ipotizzare una maggiore produzione di malato, seguita dalla sua conversione in piruvato. Il piruvato, per effetto della maggiore espressione delle proteine associate alle sequenze identificate come aldeide deidrogenasi, acetato chinasi e acetil-CoA C-acetiltransferasi verrebbe dirottato verso la produzione di 3-idrossimetil-3-glutaril-CoA e quindi verso la via carotenogenica (Fig. 9). A supporto di tale ipotesi le

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

proteine associate alle sequenze identificate come fosfomevalonato chinasi, fitoene sintasi, fitoene desaturasi, licopene β -ciclastasi sono maggiormente espresse nel 400A15.

Le sequenze sopra menzionate potranno essere utilizzate in futuro come base per la caratterizzazione molecolare dei geni ortologhi in *R. glutinis*. Inoltre, il *dataset* generato in questo studio potrà essere favorevolmente reinterrogato quando sarà disponibile la sequenza genomica completa di uno dei ceppi di *R. glutinis* analizzati. Il risultato atteso di una tale ri-analisi è un considerevole incremento nel numero delle identificazioni, come già dimostrato in situazioni analoghe per *R. toruloides* (Liu et al., 2009, Zhu et al., 2012).

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

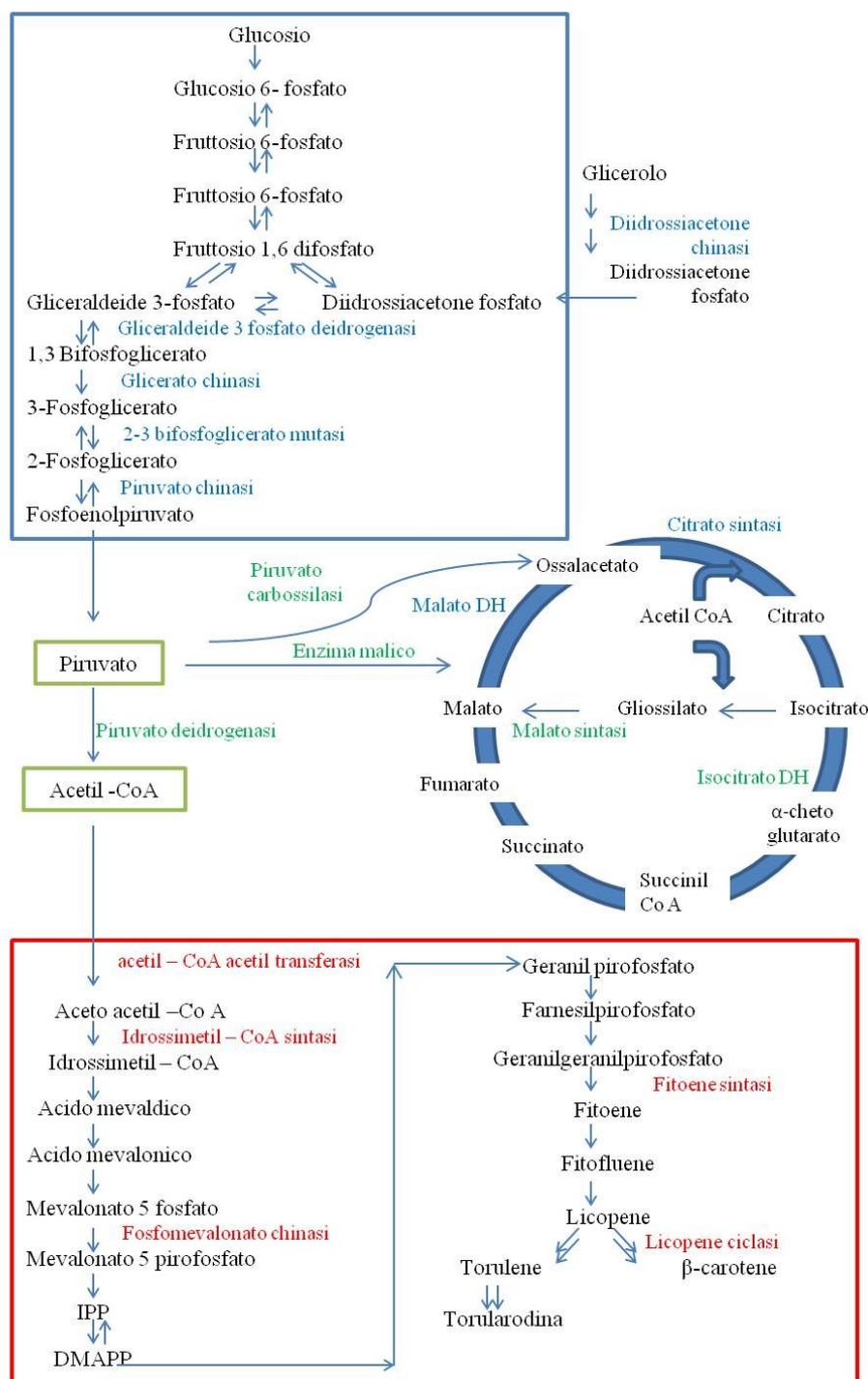


Figura 9. Ricostruzione del metabolismo centrale e della via carotenogenica in *R. glutinis* per analogia a quanto riportato per *R. toruloides* (Zhu et al.,2012). In verde le proteine variamente coinvolte nella produzione dell'acetil-CoA, in blu le proteine coinvolte nella glicolisi e in rosso le proteine coinvolte nella carotenogenesi.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

3.5 Bibliografia

- Addis MF, Pisanu S, Preziosa E, Bernardini G, Pagnozzi D, Roggio T, Uzzau S, Saroglia M, Terova G. 2012 2D DIGE/MS to investigate the impact of slaughtering techniques on *postmortem* integrity of fish filet proteins. *J Proteomics*.75:3654-3664.
- Armengaud J, Hartmann EM, Bland C. 2013. Proteogenomics for environmental microbiology. *Proteomics*. 13:2731-2742.
- Carpentier SC, America T. 2014. Proteome analysis of orphan plant species, fact or fiction? *Methods Mol Biol*. 1072:333-346.
- Liu H, Zhao X, Wang F, Li Y, Jiang X, Ye M, Zhao ZK, Zou H. (2009) Comparative proteomic analysis of *Rhodospiridium toruloides* during lipid accumulation. *Yeast*;26:553-566.
- Sieiro C, Poza M, de Miguel T, Villa TG. 2003. Genetic basis of microbial carotenogenesis. *Int.Microbi*. 6(1):11-16.
- Stephen P, 2006. In *Natural Product chemistry at a Glance*. (ed) Stanforth, Blackwell Publishing.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*.1:2856-60.
- Tanca A, Biosia G, Pagnozzi D, Addis MF, Uzzau S. 2013. Comparison of detergent-based sample preparation workflows for LTQ-Orbitrap analysis of the *Escherichia coli* proteome. *Proteomics*. 13:2597-2607.
- Ünlü M., Morgan E.M., Minden J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 19:2071–2077.
- Zhu Z, Zhang S, Liu H, Shen H, Lin X, Yang F, Zhou YJ, Jin G, Ye M, Zou H, Zhao ZK. 2012. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nat Commun*. 3:1112.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

4. MESSA A PUNTO DI UN METODO CITOFLUORIMETRICO PER LA QUANTIFICAZIONE DEL β -CAROTENE IN *RHODOTORULA GLUTINIS*.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

4.1 Introduzione

I carotenoidi presentano una struttura idrocarburica dienica centrale e nella parte terminale possono avere strutture acicliche o cicliche. Questo comporta l'alta delocalizzazione degli elettroni e permette l'assorbimento nel visibile da parte di queste molecole che risultano così colorate. L'influenza della struttura chimica dei carotenoidi sui massimi di assorbimento e la forma degli spettri è ben nota e viene sfruttata per la loro identificazione. La quantificazione dei carotenoidi avviene normalmente in seguito alla loro estrazione. Le procedure maggiormente utilizzate prevedono la rottura della parete cellulare per via meccanica e, data la loro natura liposolubile, l'estrazione dei carotenoidi dalle membrane con solventi organici quali acetone, etere di petrolio, benzene, esano, dietilere, cloroformio, etanolo e metanolo. Diversi studi hanno testato la capacità di estrazione di questi solventi. Per esempio Park et al. (2007) hanno dimostrato che in *R. glutinis* è necessaria una rottura efficiente della parete cellulare e che tra i solventi l'etere di petrolio, il dimetilsolfossido (DMSO) e l'acetone presentano una maggior resa di estrazione. Dato che i carotenoidi obbediscono alla legge di Lambert e Beer la concentrazione dei carotenoidi negli estratti cellulari può essere quantificata per via spettrofotometrica o per HPLC (Britton, 1995). Queste tecniche richiedono l'estrazione da una notevole quantità di campione, impiegano solventi organici da utilizzare in ambienti confinati e sono piuttosto laboriose. Inoltre, la possibile degradazione dei carotenoidi (per esempio la loro ossidazione) potrebbe portare alla loro sottostima. Per questo motivo lo sviluppo di metodi di quantificazione di rapida esecuzione, e che minimizzino i rischi di degradazione del campione che accompagnano l'estrazione dei pigmenti, è di grande interesse.

Alcuni autori hanno suggerito l'uso della citofluorimetria e utilizzato con successo questa tecnica per la quantificazione di carotenoidi in alghe e lieviti. In particolare nel caso della microalga *Dunaliella salina*, la quantificazione dei carotenoidi è stata effettuata per via citofluorimetrica a seguito di colorazione delle cellule con il fluorocromo Nile Red (9-diethylamina-5Hbenzo[a]phenoxirane-5-one)(NR) per aumentare la bassa fluorescenza emessa dai carotenoidi. Infatti il NR è un colorante fluorescente lipofilo e quindi è affine alla catena idrocarburica dei carotenoidi, può legarli e può essere usato come marker indiretto del

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

loro contenuto cellulare (Mendoza et al., 2008). Cooper et al. (2010) hanno valutato la fluorescenza emessa da alghe trattate con Bodipy (BP), un fluorocromo lipofilo che può interagire con la catena dieni dei carotenoidi. Per quanto riguarda i lieviti An et al. (1991) hanno riportato che il contenuto di carotenoidi correla con l'autofluorescenza di diversi ceppi di *Phaffia rhodozyma*. In accordo Ukibe et al. (2008) hanno osservato che l'intensità dell'autofluorescenza emessa da cellule di *Xanthophyllomyces dendrorhous* (forma perfetta di *P. rhodozyma*), correla con il contenuto di astaxantina.

Indubbiamente la disponibilità di un metodo citofluorimetrico per la quantificazione dei carotenoidi può essere di grande utilità, soprattutto per il monitoraggio della produzione di questi pigmenti in tempo reale nel corso delle fermentazioni.

In tale contesto, lo scopo del presente lavoro era valutare la possibilità di utilizzare la citofluorimetria per la quantificazione in tempo reale del β -carotene in *R. glutinis*.

4.2 Materiali e Metodi

4.2.1 Microrganismi e condizioni colturali

È stato impiegato il ceppo parentale C2.5t1 e il mutante iperproduttore di β -carotene 400A15 (vedi capitolo 2). Sono stati impiegati i terreni colturali di seguito riportati. YEPGLY [1 % estratto di lievito (Oxoid, Hampshire, UK), 2% bacto-peptone (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA), 2%; glicerolo (87 % soluzione acquosa, Merck, Darmstadt, Germany) con aggiunta di agar (Oxoid) al 2 % quando necessario] per la coltivazione e la conservazione dei lieviti a breve termine (4°C). YEPDGLY (1% estratto di lievito (Oxoid, Hampshire, UK), 2% bacto-peptone (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) , 20% glicerolo) per la conservazione dei lieviti a lungo termine a - 80°C .

La coltivazione del lievito è avvenuta in condizioni aerobiche in beute flangiate da un 1 L contenenti ciascuna 200 ml di YEPGLY, alla temperatura di 30°C e in agitazione (150 rev/min, in incubatore Infors HT, New York, NY, USA).

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

4.2.2 Estrazione dei carotenoidi e quantificazione per HPLC

L'estrazione dei carotenoidi e la loro quantificazione per HPLC sono avvenute come riportato nel capitolo 2.

4.2.3 Citofluorimetria

Per l'analisi di citometria a flusso è stato utilizzato un dispositivo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) equipaggiato con un raffreddamento ad aria argon-laser a ioni di 15 mW (emissione, 488 nm) e di un diodo laser rosso (635 nm). È stata registrata la fluorescenza verde (530/30 nm, filtro passa banda, canale FL1), gialla (585/42 nm, filtro passa banda, canale FL2), rosso-arancio (> 670 nm, tempo passa filtri, canale FL3) e rossa (660/16 nm, filtro passa banda, FL4 canale) delle cellule non trattate con coloranti e delle cellule trattate con NR e BP.

Per il saggio NR la sospensione di 1×10^6 cellule/ml in PBS è stata trattata con 40 $\mu\text{l/ml}$ di NR (0,0033 mg/ml in acetone) e incubata a 37°C, per 30 secondi al buio. La fluorescenza è stata rilevata nei canali FL2 e FL3. Precedentemente i valori di auto fluorescenza (AF) sono stati adeguati allo stesso valore di fluorescenza media (circa 3).

Per il saggio Bodipy^{505/512} la sospensione di 1×10^6 cellule/ml in PBS è stata trattata con 20 $\mu\text{l/ml}$ di Bodipy^{505/512} (2 mM) e incubata a 37°C, per 10 secondi al buio. La fluorescenza è stata rilevata nei canali FL1 e FL4. Precedentemente i valori AF sono stati adeguati allo stesso valore di fluorescenza media (circa 3).

Tutte le soluzioni utilizzate in citometria a flusso sono state filtrate con un filtro 0,2 μm , immediatamente prima dell'uso, per rimuovere la contaminazione particellare. Sono stati analizzati almeno 10.000 eventi a campione.

I dati sono stati analizzati con il software WinMDI (versione 2.9). Per la calibrazione periodica del citofluorimetro sono state usate periodicamente biglie di taratura (Rainbow calibration beads) (3,0-3,4 μm) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, California, USA).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

4.3 Risultati

Il ceppo parentale C2.5t1 e il mutante iperproduttore di β -carotene 400A15 sono stati coltivati su YEPGLY, a 30°C in agitazione e in beute flangiate per favorire l'ossigenazione. Sui campioni prelevati nel corso della crescita su YEPGLY sono stati valutati la produzione di biomassa (in funzione della densità ottica e del peso secco cellulare) e la produzione di β -carotene (per HPLC). Inoltre le cellule sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica. In particolare si è proceduto con la valutazione sia dell'autofluorescenza delle cellule, sia della fluorescenza emessa in seguito a trattamento con i fluorocromi NR e BP. L'autofluorescenza emessa dalle cellule è stata misurata nei quattro canali FL1 (530/30 nm), FL2 (585/42 nm), FL3 (> 670 nm) e FL4 (660/16 nm).

Mentre i valori di autofluorescenza emessi da cellule del mutante 400A15 nei canali FL1, FL2, FL3 non mostravano sostanziali cambiamenti nel corso della crescita batch, quelli rilevati nel canale FL4 aumentavano da 2,5 a 7,6 tra le 18 e le 96 ore di crescita ed erano sempre più elevati rispetto a quelli misurati nei canali FL1, FL2 e FL3. Inoltre, riportando in grafico i valori di autofluorescenza di tali cellule nei 4 canali e le quantità di β -carotene prodotto, misurate agli stessi tempi di campionamento per HPLC, si è ottenuto un andamento sovrapponibile solo con i valori di autofluorescenza misurati in FL4 (Fig. 1).

Come è possibile osservare in figura 2 anche i valori di fluorescenza delle cellule trattate con NR e BP e misurati rispettivamente nei canali FL2 e FL3 e FL1 e FL4, aumentavano nel tempo. Per valutare se i valori di autofluorescenza e fluorescenza delle cellule di 400A15, trattate coi fluorocromi, correlassero con l'effettivo contenuto di β -carotene prodotto, sono state calcolate le rispettive rette di regressione e valutati i coefficienti di determinazione R^2 . Come è possibile osservare in figura 3 solo l'autofluorescenza rilevata nel canale FL4 correlava con la quantità di β -carotene rilevato per HPLC. Per quanto riguarda le cellule di 400A15 trattate con NR e BP, le migliori correlazioni tra la fluorescenza emessa e la quantità di β -carotene prodotto si ottenevano quando la fluorescenza veniva rilevata nel canale FL2 e FL1, rispettivamente come indicato dal coefficiente R^2 (Fig. 4, 5). Quindi le migliori correlazioni con il contenuto cellulare di β -carotene si ottenevano con l'autofluorescenza

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

emessa in FL4 (AFL4), e la fluorescenza delle cellule trattate con NR in FL2 e con BP in FL1.

Per ciascuna condizione è stato possibile ottenere una retta di regressione che permette di calcolare il contenuto intracellulare di β -carotene a partire dai valori di autofluorescenza e fluorescenza rilevati.

Infatti il contenuto di β -carotene (mg/g) =

$$0,084 \times AFL4 - 0,05, \text{ con } R^2=0.93;$$

$$0,0027 \times NRFL2 - 0,0325, \text{ con } R^2=0.98;$$

$$0,00134 \times BPFL1 - 0,06822, \text{ con } R^2=0.99.$$

Per quanto riguarda i valori ottenuti usando tale approccio con il ceppo parentale C2.5t1 si è riscontrata correlazione solo tra il contenuto cellulare di β -carotene e l'autofluorescenza emessa in FL4 e non la fluorescenza delle cellule trattate con NR e con BP (Fig. 6, 7, 8).

La retta di regressione ottenuta consente di calcolare il contenuto di β -carotene applicando la formula seguente

β -carotene (mg/g)=

$$0,0037 \times AFL4 + 0,02385, \text{ con } R^2=0.98.$$

Non è stato possibile utilizzare lo stesso metodo per la quantificazione dei pigmenti torulene e torularodina data la impossibilità di reperire standard commercialmente disponibili da utilizzare per HPLC. Tuttavia sono state riscontrate correlazioni tra l'area corrispondente al picco torulene+torularodina rilevato in HPLC (che misura il contenuto di torulene e torularodina) e la fluorescenza rilevata nei canali FL2, FL3, FL4, FL2+3 (Tab. 1).

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

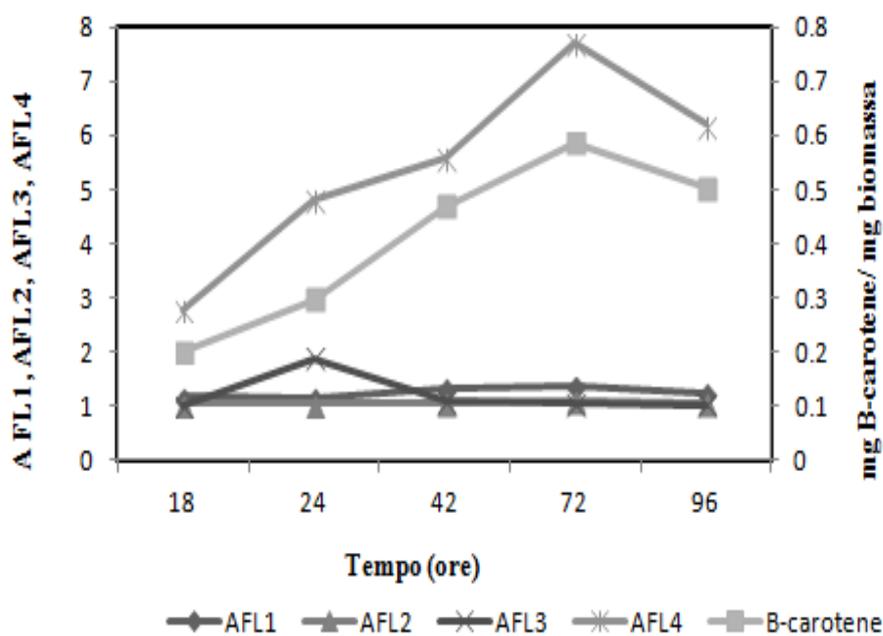
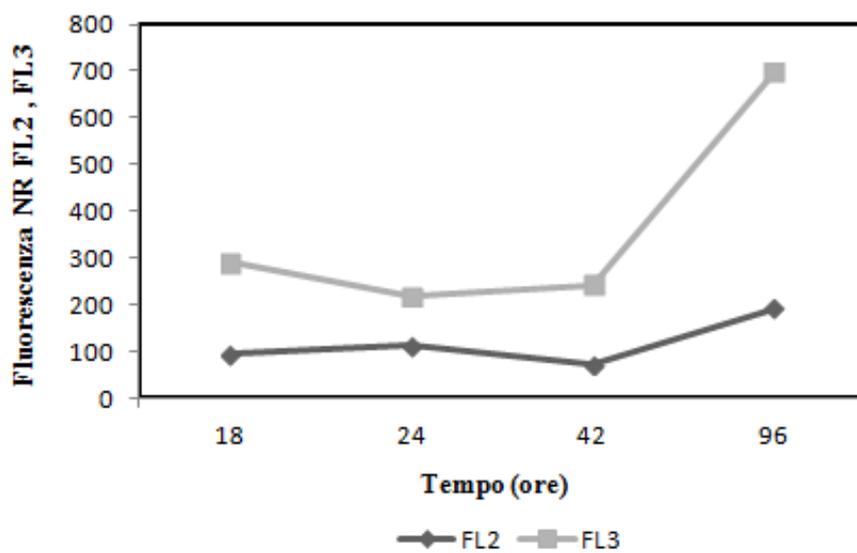


Figura 1. Autofluorescenza emessa dalle cellule di *R. glutinis* 400A15 e loro contenuto in β -carotene durante la fermentazione batch. I valori di FL1,FL2,FL3,FL4 e β -carotene presentano errore relativo inferiore al 10% (n=2).

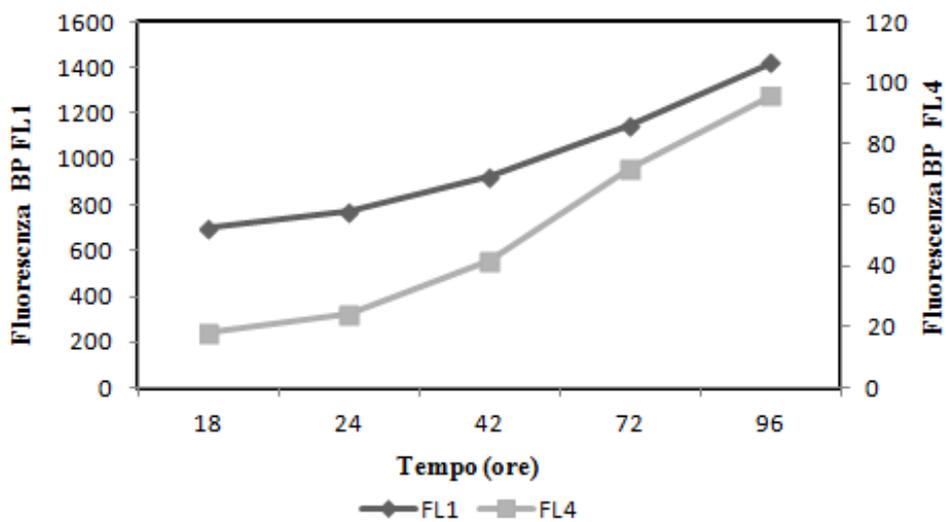
Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari



a



b

Figura 2. Fluorescenza emessa dalle cellule di 400A15 trattate con: a) NR e b) BP.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

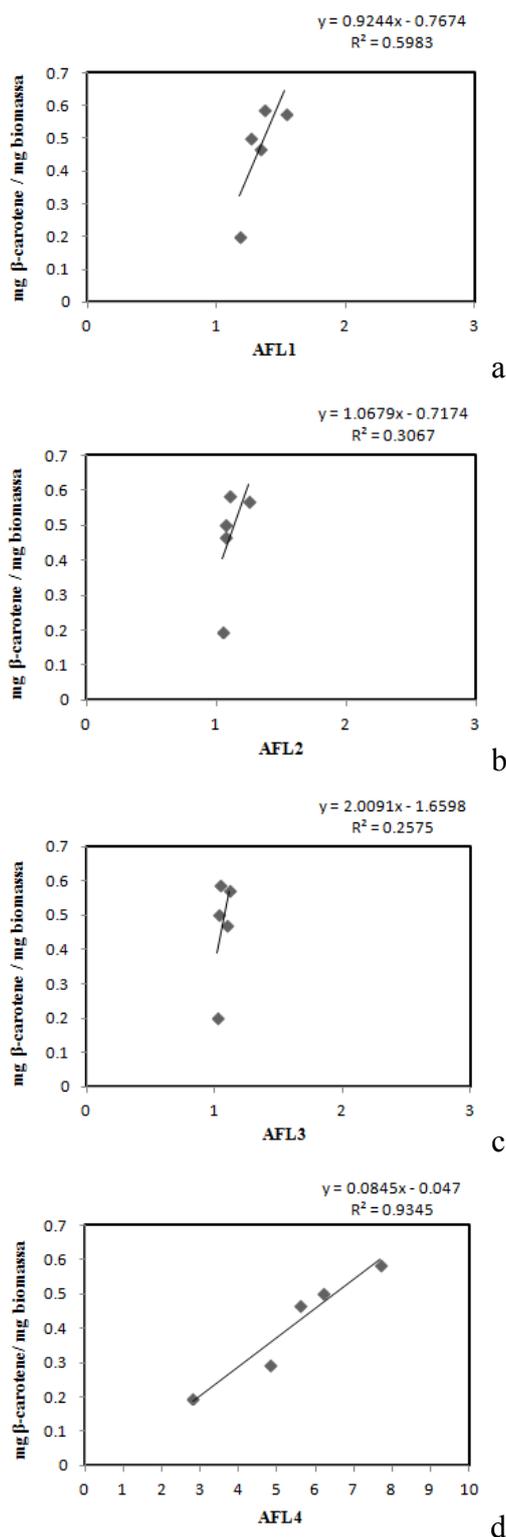
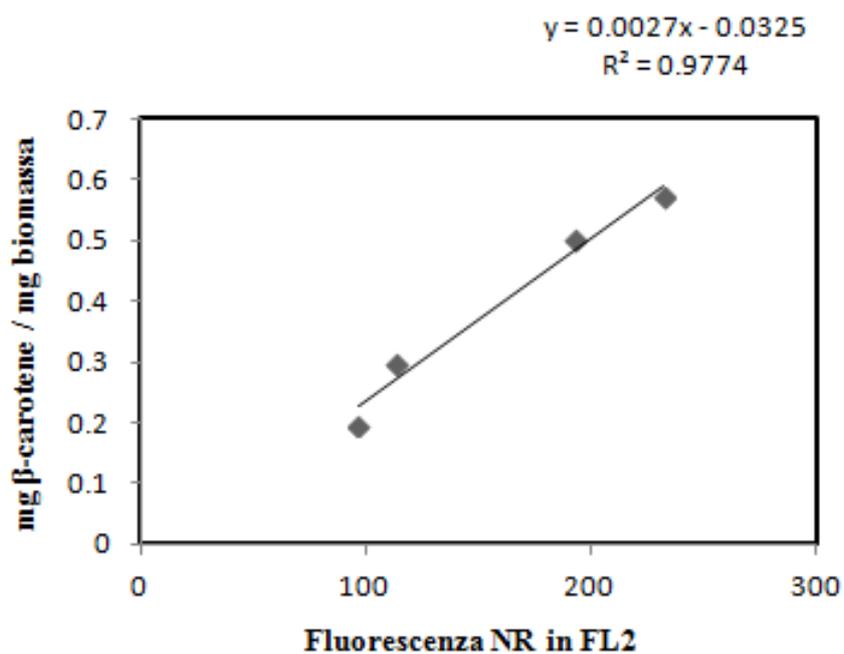


Figura 3. Correlazione tra la quantità di β -carotene prodotto (mg β -carotene/ mg biomassa) e l'autofluorescenza delle cellule di 400A15 rilevata rispettivamente: a) nel canale FL1 (AFL1); b) nel canale FL2 (AFL2); c) nel canale FL3(AFL3) e d) nel canale FL4 (AFL4).

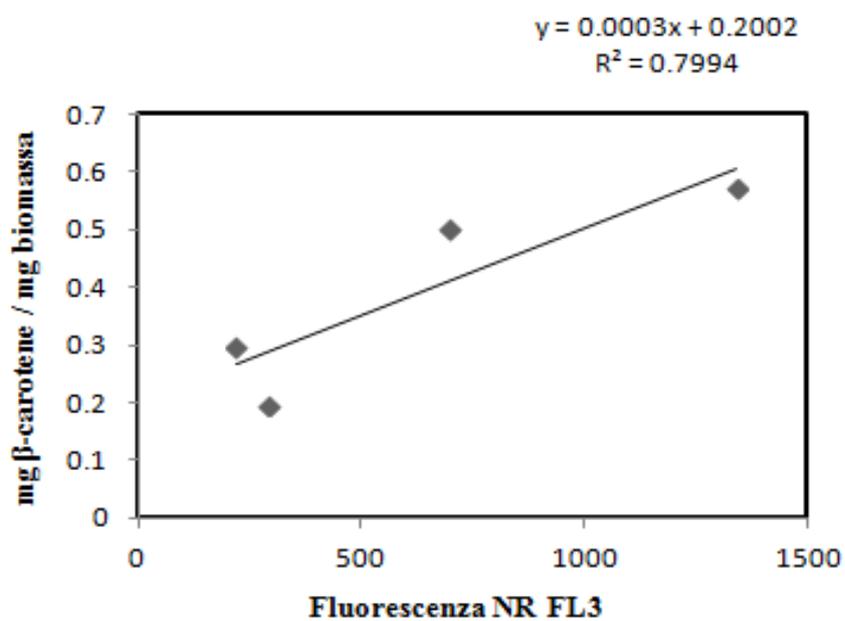
Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari



a



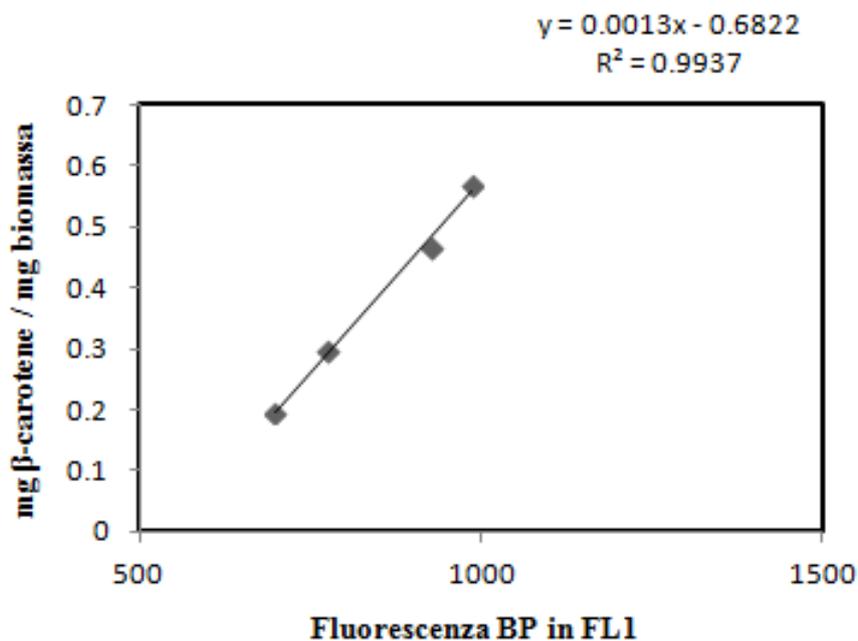
b

Figura 4. Correlazione tra la quantità di β -carotene prodotto (mg β -carotene/biomassa) e la fluorescenza delle cellule di 400A15 trattate con NR rilevata rispettivamente: a) nel canale FL2 e b) nel canale FL3.

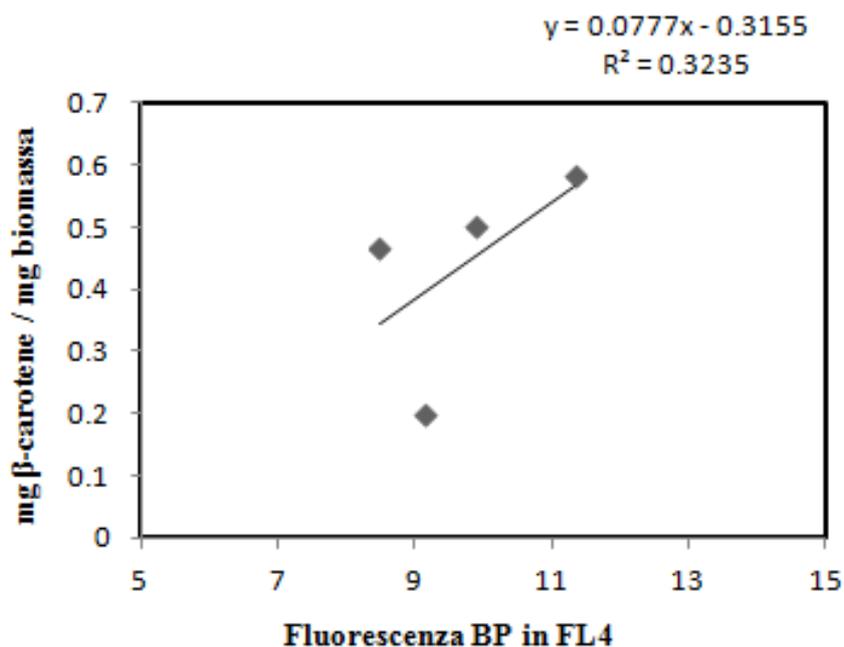
Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari



a



b

Figura 5. Correlazione tra la quantità di β -carotene prodotto (mg β -carotene/ mg biomassa) e la fluorescenza delle cellule di 400A15 trattate con BP^{505/515} rilevata rispettivamente: a) nel canale FL1 e b) nel canale FL4.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

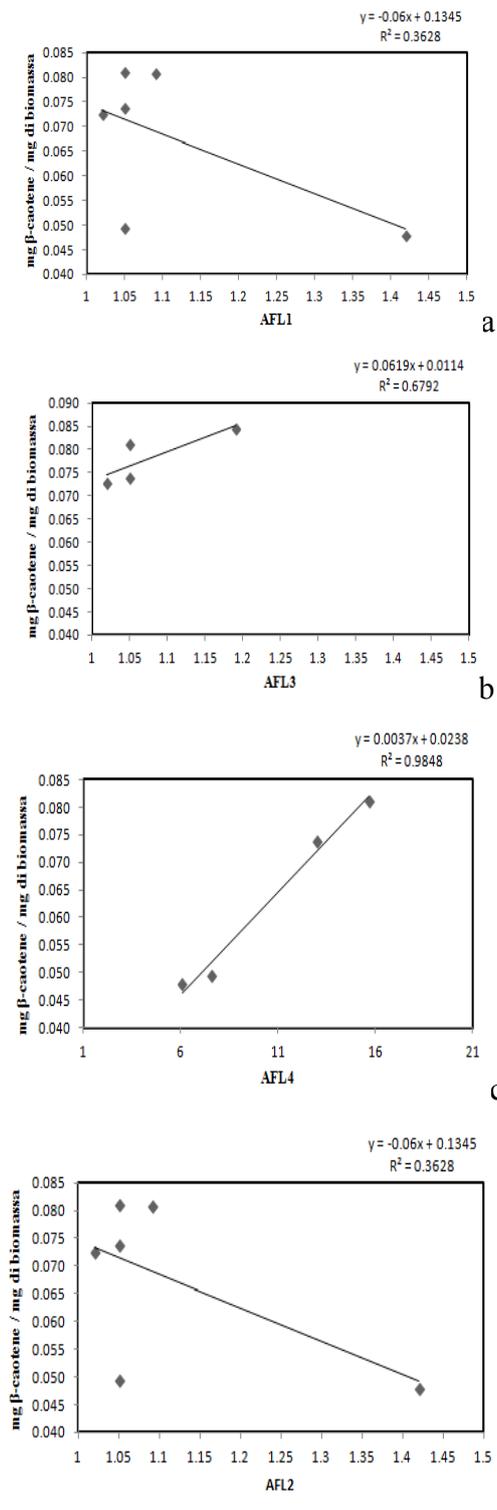
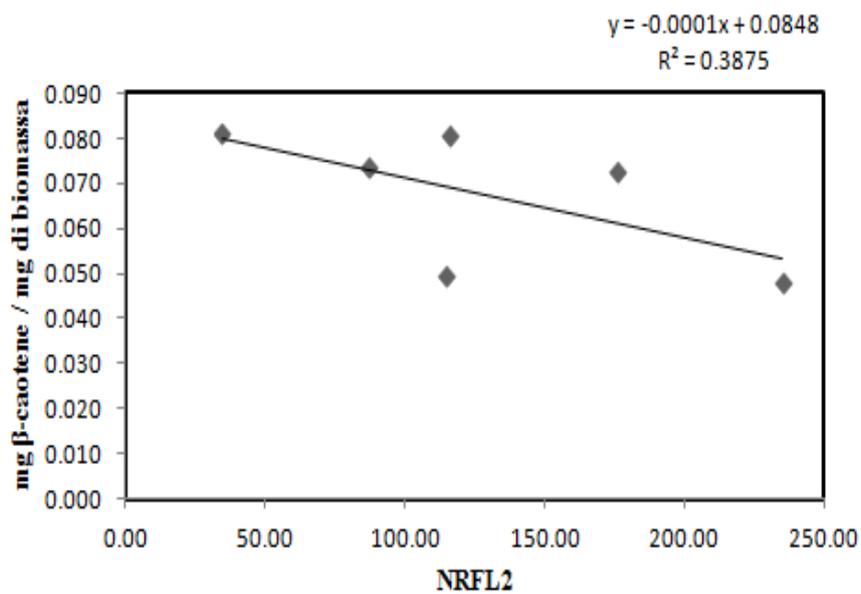


Figura 6. Correlazione tra la quantità di β -carotene prodotto (mg β -carotene/ mg biomassa) e l'autofluorescenza delle cellule di C2.5t1 rilevata rispettivamente: a) nel canale FL1 (AFL1); b) nel canale FL2 (AFL2); c) nel canale FL3(AFL3) e d) nel canale FL4 (AFL4).

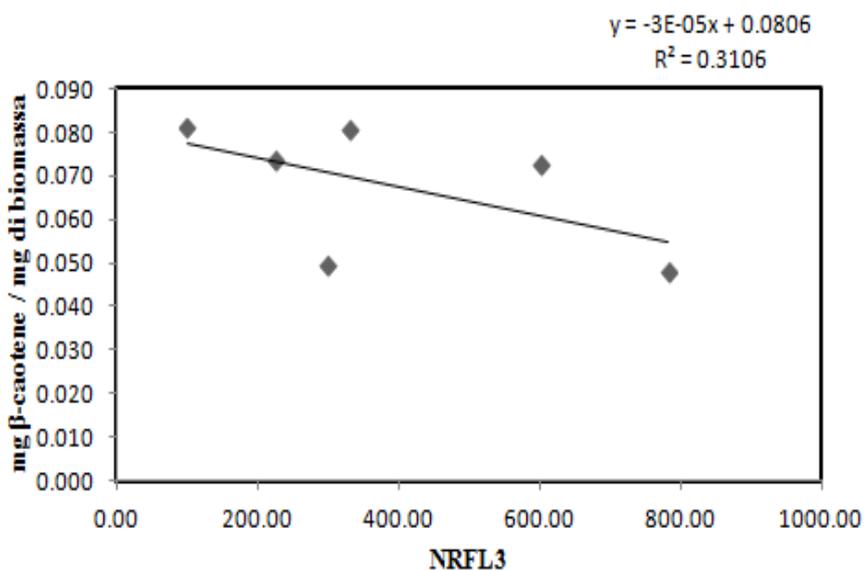
Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari



a



b

Figura 7. Correlazione tra la quantità di β -carotene prodotto (mg β -carotene/biomassa) e la fluorescenza delle cellule di C2.5t1 trattate con NR rilevata rispettivamente: a) nel canale FL2 e b) nel canale FL3.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

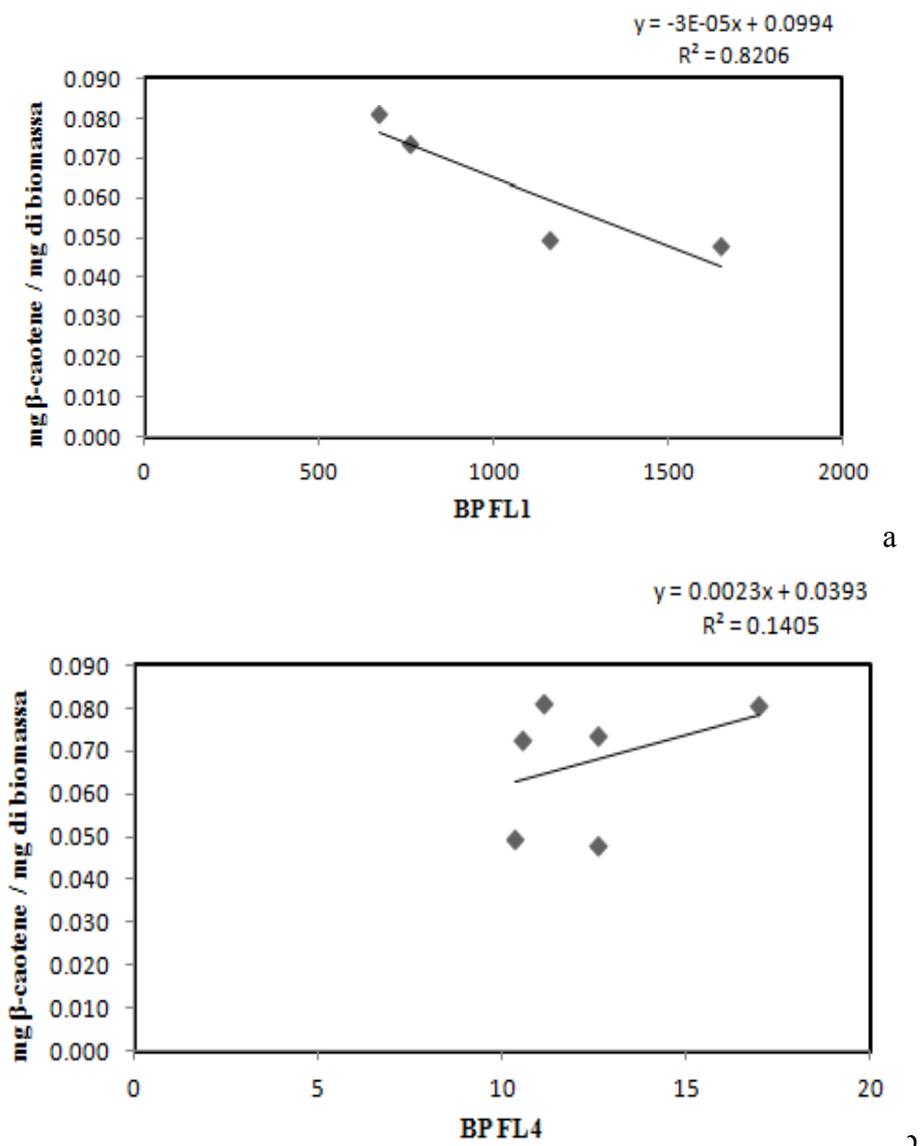


Figura 8. Correlazione tra la quantità di β -carotene prodotto (mg β -carotene/ mg biomassa) e la fluorescenza delle cellule di C2.5t1 trattate con BP rilevata rispettivamente: a) nel canale FL1 e b) nel canale FL4.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Tabella 1. Correlazione tra i risultati dell'analisi HPLC e i dati di citometria a flusso. R^2 con 4 gradi di libertà.

	Canale	Area torulene + torularodina
Nile Red	FL2	$R^2=0.90$
	FL3	$R^2=0.95$
	FL4	$R^2=0.89$
	FL2+3	$R^2=0.99$

4.4 Discussione

La citometria a flusso è una tecnica che permette di analizzare migliaia di cellule al secondo in maniera oggettiva e rapida. L'utilizzo della citofluorimetria per la rilevazione del contenuto dei carotenoidi non è abituale. Sono infatti relativamente poco numerosi i lavori in cui si riporta la possibilità di valutare la produzione di carotenoidi impiegando questa tecnica (An et al., 1991; Ukibe et al., 2008; Cooper et al., 2010) che, per altro, non era stata ancora utilizzata in *R. glutinis*.

Questo lavoro ha consentito di individuare tre modelli per la quantificazione citofluorimetrica del contenuto intracellulare di β -carotene nel ceppo 400A15 e un modello per la quantificazione del contenuto intracellulare di β -carotene nel ceppo C2.5t1. I modelli si basano sulla evidenza che l'autofluorescenza di cellule (nel caso sia di 400A15 che di C2.5t1) misurata in FL4, e la fluorescenza emessa da cellule (solo nel caso di 400A15) trattate con fluorocromi lipofili come il NR e il BP misurate rispettivamente in FL2 e FL1, correlano con la quantità di β -carotene prodotto e misurato in HPLC. Per questo, attraverso la risoluzione di equazioni lineari in cui la variabile dipendente y indica il contenuto di β -carotene e la variabile indipendente x può assumere: (i) i valori dell'autofluorescenza rilevata nel canale FL4; (ii) i valori della fluorescenza delle cellule trattate con Nile Red e rilevati nel canale FL2; (iii) i valori della fluorescenza delle cellule trattate con BP e rilevati nel canale FL1, è possibile valutare il contenuto intracellulare di β -carotene. Gli elevati valori di R^2 supportano la validità delle equazioni impiegate.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

L'utilizzo della citofluorimetria, oltre a permettere una più rapida quantificazione del β -carotene rispetto ai metodi tradizionali, consente di ottenere informazioni sulla fisiologia delle cellule in un dato momento del processo produttivo e di monitorarne lo stato fisiologico nel corso della fermentazione. Avere informazioni, in tempo reale, sul benessere cellulare e sulla produzione dei metaboliti di interesse, consente di agire immediatamente sulle variabili di processo per mantenere la coltura vitale e garantire una buona produzione del metabolita. Pertanto, l'utilizzo della citofluorimetria come metodo di quantificazione del β -carotene, accoppiata al monitoraggio dei parametri fisiologici, si rivela uno strumento utile sia per lo screening e l'ottimizzazione delle condizioni colturali, sia per studi sull'influenza di inibitori o attivatori delle vie biosintetiche.

4.5 Bibliografia

- An GJ, Bielich J, Auerbach R, Johnson EA. 1991. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow Cytometry and cell sorting. *Bio Technol.* 9, 67-73
- Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB.* 9 (15): 1551-1555.
- Cutzu R, Coi A, Rosso F, Bardi L, Ciani M, Budroni M, Zara G, Zara S, Mannazzu I. 2013a. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. *World J Microbiol Biotechnol.* 29(6):1009-1017.
- Cooper MS, Hardin WR, Petersen TW, Cattolico RA. 2010. Visualizing "green oil" in live algal cells. *J Biosci Bioeng.* 109(2):198-201
- Lopes da Silva T, Roseiro JC, Reis A. 2012. Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. *Trends Biotechnol.* 30 (4)225–232
- Mendoza H, de la Jara A, Freijanes K, Carmona L, Ramos A, Duarte V, Varela J. 2008. Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains. *Electron J. Biotechnol.* 11(4).
- Park PK, Kim EY, Chu KH. 2007. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology* 53 148–152
- Ukibe K, Katsuragi T, Tani Y, Tagagi H. 2008. Efficient screening for astaxanthin-overproduction mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow Cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.* 241-248.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

5. INDIVIDUAZIONE DELLE CONDIZIONI CHE OTTIMIZZANO LA PRODUZIONE DI CAROTENOIDI

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

5.1 Introduzione

La Response Surface Methodology (RSM) è una strategia sperimentale volta a cercare le condizioni ottimali per un sistema multivariabile (Box et al., 1978). La RSM consiste in un insieme di metodi matematici e statistici per valutare le relazioni tra un gruppo di variabili indipendenti quantitative e una o più risposte (Parampalli et al., 2007). Gli esperimenti con RSM coinvolgono un piccolo numero (generalmente da 2 a 8) di fattori o variabili continue già ritenute influenti sulla risposta. L'obiettivo, oltre a predire l'influenza di ciascun fattore considerato in maniera indipendente dagli altri fattori sulla risposta, è quello di valutare l'interazione tra i fattori all'interno del modello proposto. Inoltre genera un modello matematico che descrive accuratamente l'intero processo (Myers e Montgomery, 1995). Si può creare in questo modo un modello predittivo che permette di trovare le migliori impostazioni operative per il processo.

Per ottenere equazioni di secondo ordine utili nella RSM si utilizza tra gli altri il Central Composite Design (CCD). Questo tipo di disegno sperimentale è caratterizzato dal un punto centrale nel quale tutti i valori dei fattori valgono zero (mid-range value) e dai punti assiali (star points), equidistanti dal punto centrale, nei quali tutti i valori valgono zero tranne uno che assume il valore assiale.

Nel CCD ciascuna delle variabili ha un valore numerico minimo, medio e massimo indicati con +1, 0 e -1 rispettivamente.

La rappresentazione geometrica del modello è un cubo nel quale ogni angolo rappresenta l'interazione tra i fattori (Myers e Montgomery, 1995). La risposta quindi sarà espressa da una funzione del tipo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

dove Y è la risposta dell'esperimento; β corrisponde al parametro dell'esperimento del modello polinomiale; X è il livello fattoriale polinomiale. Tale funzione, contenente i termini lineari per tutti i fattori, i termini quadrati per tutti i fattori, i prodotti di tutte le coppie di fattori, permette di valutare l'influenza dei singoli fattori e l'interazione tra essi.

Un altro disegno sperimentale utilizzabile per studiare modelli biologici è il disegno di

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Doehlert, annoverato tra i così detti “uniform shell designs”. Questi vengono definiti così per la loro distribuzione regolare dei punti sperimentali su una superficie di gusci sferisci che conferiscono particolari proprietà. (Doehlert, 1970).

Tutti i disegni di Doehlert sono generati da un semplice regolare, una figura geometrica che contiene $k + 1$ punti, dove k è il numero di fattori. Per ogni k si origina un punto del semplice più un ulteriore punto di origine. I punti k giacciono sulla superficie di una sfera centrata all’origine e avente raggio 1. La particolarità di questo disegno è di riempire uniformemente lo spazio avendo informazioni continue pur utilizzando valori discreti (punti sperimentali). In questo modo il disegno Doehlert risulta economico all’aumentare dei fattori perché il numero degli esperimenti da condurre non aumenta notevolmente (Ferreira et al. 2007). La risposta è espressa anche in questo caso come una funzione polinomiale di secondo ordine.

L’ottimizzazione delle variabili di un processo mediante utilizzo di tecniche di analisi multivariata è considerata veloce, economica ed efficace e può essere conseguita tramite l’applicazione di disegni sperimentali multifattoriali (Ferreira et al., 2002). Con l’intento di individuare le condizioni colturali che massimizzano la produzione del β -carotene nel mutante 400A15, utilizzando come fonte di carbonio il glicerolo grezzo e il glicerolo tecnico, sono stati allestiti due disegni sperimentali volti a individuare l’influenza della fonte carboniosa (glicerolo grezzo) e di quella azotata (estratto di lievito e peptone), la disponibilità di ossigeno e il rapporto carbonio azoto sulla produzione di biomassa e di carotenoidi.

5.2 Materiali e Metodi:

5.2.1 Lievito

È stato impiegato il ceppo 400A15 iperproduttore di β -carotene. Per la coltivazione è stato impiegato terreno YEPGLY con composizione variabile secondo quanto prescritto dall’applicazione dei disegni sperimentali.

5.2.2 Disegni sperimentali

Nel caso del CCD sono stati considerati tre fattori (estratto di lievito da 0,1 al 1%; glicerolo

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

grezzo dal 2 al 10%; peptone dallo 0,2 al 2%) e due risposte (biomassa g/l e β -carotene mg/L), per un totale di 16 prove indipendenti. Ciascuna prova è stata condotta in duplicato secondo lo schema sperimentale riportato in tabella 1. La crescita è stata condotta in beute flangiate da 250 ml contenenti 50 ml di terreno colturale, in agitazione (150 rpm) alla temperatura di 30°C. L'analisi statistica è stata condotta tramite il software JMP 8.0.

Nel caso del disegno sperimentale secondo la distribuzione di Doehlert sono stati considerati 2 fattori e 4 risposte. I fattori erano la disponibilità di ossigeno in termini di k_La (variabile da $31,3 \times 10^{-3}/s$ a $4 \times 10^{-3}/s$) ottenuta variando il volume di terreno utilizzato, e il rapporto carbonio-azoto (C/N) (variabile da 11,3 al 65). Le diverse condizioni sperimentali sono riportate in tabella 2. Le risposte considerate erano: biomassa, contenuto di carotenoidi e dimensione e granularità cellulare. Ciascuna prova è stata condotta in duplicato (tabella 2). La crescita è stata condotta in beute flangiate da 1000 ml contenenti differenti volumi di terreno per garantire differenti k_La , in agitazione (180 rpm) a 30°C.

La validazione statistica delle equazioni polinomiali è stata effettuata mediante analisi della varianza (ANOVA).

5.2.3 Analisi delle risposte

Per il disegno sperimentale CCD l'estrazione e la quantificazione dei carotenoidi è stata condotta secondo il protocollo descritto da Dominguez-Bocanegra e Torres-Munoz (2004) modificato come segue: 1 ml di coltura è stato centrifugato a 14000 rpm per 3 minuti. Il pellet è stato lavato per 2 volte con 1 ml di acqua distillata e per 2 volte con 1 ml di acetone. E' stato aggiunto 1 ml di dimetilsolfossido (DMSO) precedentemente scaldato a 60°C, 1 ml di sfere di vetro (\emptyset 45 μ m) e il contenuto della provetta è stato vortexato per 5 minuti. Sono stati aggiunti 1 ml di acetone, 1 ml di etere di petrolio addizionato di 0.25% idrossitoluene butilato (BHT), 1 ml di soluzione satura di NaCl al 20% w/v. La miscela è stata vortexata brevemente e centrifugata a 3,500 g per 5 minuti. La fase superiore, contenente l'etere di petrolio e i carotenoidi in soluzione è stata prelevata e analizzata allo spettrofotometro attraverso lettura a 450 nm. La quantificazione è stata fatta tramite l'uso di una curva di taratura costruita una soluzioni standard di β -carotene.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Per il disegno sperimentale con distribuzione di Doehlert la quantificazione dei carotenoidi è stata effettuata utilizzando il metodo citofluorimetrico discusso nel capitolo 4.

L'identificazione e la quantificazione degli acidi grassi prodotti al variare della kLa e del C/N è stata condotta come descritto nel capitolo 2.

L'analisi di citometria a flusso dei parametri FSC, SSC e permeabilità al PI è stata condotta come descritto nel capitolo 4.

L'analisi del glicerolo residuo è stata condotta su campioni filtrati ($0,2 \mu m$) in HPLC (Agilent 1100, Santa Clara, CA, USA). Come colonna è stata usata una Aminex HPX-87H 300 mm \times 7.8 mm (Catalog 125-0140, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) e come eluente è stata usata una soluzione H_2SO_4 5mM.

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Tabella 1: Condizioni sperimentali secondo il CCD.

	X_1		X_2		X_3	
	GLY		YE		PEP	
	livello	(%)	livello	(%)	livello	(%)
1	-1	2	-1	0.1	-1	0.2
2	-1	2	0	0.55	0	1.1
3	+1	10	-1	0.1	-1	0.2
4	0	6	-1	0.1	0	1.1
5	-1	2	+1	1	-1	0.2
6	+1	10	0	0.55	0	1.1
7	-1	2	+1	1	+1	2
8	+1	10	+1	1	-1	0.2
9	-1	2	+1	1	-1	0.2
10	+1	10	+1	1	+1	2
11	-1	2	-1	0.1	+1	2
12	-1	2	+1	1	+1	2
13	+1	10	-1	0.1	-1	0.2
14	0	6	+1	1	0	1.1
15	0	6	0	0.55	-1	0.2
16	+1	10	-1	0.1	+1	2
17	0	6	0	0.55	0	1.1
18	-1	2	-1	0.1	+1	2
19	+1	10	+1	1	+1	2
20	-1	2	-1	0.1	-1	0.2
21	-1	2	0	0.55	0	1.1
22	0	6	0	0.55	-1	0.2
23	0	6	+1	1	0	1.1
24	+1	10	0	0.55	0	1.1
25	0	6	0	0.55	+1	2
26	0	6	0	0.55	0	1.1
27	0	6	0	0.55	+1	2
28	+1	10	+1	1	-1	0.2
29	0	6	0	0.55	0	1.1
30	+1	10	-1	0.1	+1	2
31	0	6	0	0.55	0	1.1
32	0	6	-1	0.1	0	1.1

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Tabella 2: Condizioni sperimentali secondo la distribuzione di Doehlert.

Test	Volume l ($k_L a/s$)	C/N (mol/l)
1	0,330 (5×10^{-3} /s)	11,3 (0,23)
2	0,330 (5×10^{-3} /s)	11,3(0,23)
3	0,180 ($12,5 \times 10^{-3}$ /s)	11,3(0,23)
4	0,180 ($12,5 \times 10^{-3}$ /s)	11,3 (0,23)
5	0,400 (4×10^{-3})	20,0 (0,13)
6	0,400 (4×10^{-3})	20,0 (0,13)
7	0,250 ($8,3 \times 10^{-3}$)	20,0 (0,13)
8	0,250 ($8,3 \times 10^{-3}$)	20,0 (0,13)
9	0,100 ($31,3 \times 10^{-3}$ /s)	20,0 (0,13)
10	0,100 ($31,3 \times 10^{-3}$ /s)	20,0 (0,13)
11	0,330 (5×10^{-3} /s)	65,0 (0,04)
12	0,330 (5×10^{-3} /s)	65,0 (0,04)
13	0,180 ($12,5 \times 10^{-3}$ /s)	65,0 (0,04)
14	0,180 ($12,5 \times 10^{-3}$ /s)	65,0 (0,04)

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

5.3 Risultati

5.3.1 Effetto dei fattori glicerolo grezzo, estratto di lievito e peptone sulla produzione di biomassa e carotenoidi

Estratto di lievito e peptone sono tra i fattori che influiscono sulla produzione di carotenoidi totali (Bhosale e Gadre, 2001). Quindi per individuare la composizione del terreno colturale che ottimizza la produzione di biomassa e di carotenoidi nel mutante 400A15, è stato applicato un disegno sperimentale CCD con tre fattori: glicerolo grezzo (x_1), estratto di lievito (x_2) e peptone (x_3) e due repliche del punto centrale. Sono state considerate come risposte la biomassa prodotta (g/l) e i carotenoidi totali prodotti (mg/l). Nella tabella 1 è riportata, per ciascuna condizione, la composizione dei terreni colturali. Il modello matematico ottenuto prevede che la produzione della biomassa (Y_b) segua la relazione:

$$Y_b = 17.06 + 5.83x_1 + 2.00x_2 + 4.90x_3 + 1.32x_1x_2 + 2.72x_1x_3 - 1.39x_2x_3 - 2.80x_1^2 - 0.38x_2^2 + 0.45x_3^2.$$

Mentre la produzione di carotenoidi è descritta dalla relazione:

$$Y_c = 9.60 + 1.67x_1 + 1.06x_2 + 2.57x_3 + 0.42x_1x_2 + 0.46x_1x_3 + 0.34x_2x_3 - 3.05x_1^2 + 1.22x_2^2 - 0.50x_3^2.$$

In Tabella 3 sono riportati le produzioni di biomassa e carotenoidi predette e quelle effettivamente ottenute. L'analisi di regressione (R^2 pari a 0,94 e 0,87 per biomassa e carotenoidi, rispettivamente) indica che il modello è affidabile e significativo ($P < 0.0001$) nella predizione delle due risposte sulla base della concentrazione dei tre fattori considerati.

I segni ed i valori dei coefficienti dei fattori delle equazioni modello indicano gli effetti dei fattori e delle loro interazioni sulla produzione di biomassa e carotenoidi. I tre termini lineari x_1 (glicerolo), x_2 (estratto di lievito) e x_3 (peptone), i termini di interazione x_1x_2 , x_3x_1 e x_2x_3 e il termine quadratico x_1 risultano influenti sulla produzione di biomassa ($P < 0,0001$). I termini lineari x_1 , x_2 ed x_3 ed il termine quadratico x_1 sono influenti per la produzione di carotenoidi ($P < 0,0001$).

Le equazioni polinomiali di secondo grado sono state impiegate per disegnare la superficie di risposta e le curve riportate in figura 1. I valori ottimali per le variabili selezionate sono stati

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

ottenuti risolvendo le equazioni polinomiali quadratiche. Da ciò è risultato che per poter massimizzare la produzione di carotenoidi il glicerolo grezzo deve essere usato al 7,5%, mentre l'estratto di lievito e il peptone devono essere utilizzati alle concentrazioni massime tra quelle valutate (1% e 2%, rispettivamente).

Pertanto il mutante 400A15 è stato coltivato nelle condizioni suggerite (glicerolo grezzo 7,5%; estratto di lievito 1%; peptone 2%). In queste condizioni sono stati ottenuti 14.07 ± 1.45 mg/l di carotenoidi totali. Questi risultati non sono risultati statisticamente differenti da quanto atteso (14.64 ± 1.57 mg /l) ($P < 0,05$).

5.3.2 Effetto dei fattori kLa e C/N su produzione di biomassa e carotenoidi e su dimensione, granularità cellulare e permeabilità delle membrane

La produzione di carotenoidi e di biomassa sono influenzate dalla disponibilità di ossigeno (Simonova et al., 2003) e dal rapporto carbonio/azoto (El-Banna et al., 2012). Utilizzando il disegno sperimentale con distribuzione Doehlert è stato studiato l'effetto dei fattori: coefficiente volumetrico di trasferimento dell'ossigeno (kLa) e rapporto carbonio/azoto (C/N) sulle variabili produzione di β -carotene, biomassa, percentuale di cellule permeabilizzate (Cell PI +), dimensione cellulare (FSC), e granularità cellulare (SSC) nel mutante 400A15. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 4.

La quantificazione del β -carotene è stata effettuata tramite citofluorimetria utilizzando l'equazione contenuto di β -carotene (mg/g) = $0,084 \times AFL4 - 0,05$, con $R^2=0.93$ già discussa nel capitolo 4.

La produzione di acidi grassi è stata monitorata attraverso l'identificazione e la quantificazione dei loro esteri metilici (FAME) per gas-cromatografia. Mentre la quantità totale di acidi grassi variava nelle differenti condizioni sperimentali (Fig. 2) la composizione percentuale degli acidi grassi rilevati non variava in maniera marcata (dati non mostrati) rispetto a quella già riportata in altre condizioni sperimentali (capitolo 2).

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Tabella 3. Risultati predetti e ottenuti nel disegno CCD.

	Biomassa	Biomassa predetta	Carotenoidi totali	Carotenoidi predetti
	(g/l)	(g/l)	(mg/l)	(mg/l)
1	4,20	4,24	2,69	3,18
2	7,80	8,43	6,40	4,87
3	6,90	7,83	6,85	4,77
4	14,50	14,68	10,77	9,75
5	7,90	8,40	4,32	3,78
6	21,20	20,09	7,27	8,21
7	9,30	9,97	7,45	8,68
8	18,00	17,26	6,94	7,05
9	8,80	8,40	4,71	3,78
10	23,50	29,71	14,92	13,78
11	10,40	11,39	6,07	6,71
12	11,30	9,97	8,10	8,68
13	8,00	7,82	4,90	4,77
14	18,50	18,69	10,81	11,88
15	11,20	12,61	5,22	6,53
16	23,90	25,85	10,61	10,14
17	15,60	17,07	8,36	9,60
18	11,10	11,39	8,10	6,71
19	35,10	29,71	13,8	13,78
20	5,00	4,24	2,90	3,18
21	9,10	8,43	3,70	4,87
22	13,00	12,61	5,30	6,53
23	18,00	18,69	12,50	11,88
24	19,40	20,09	7,20	8,21
25	22,60	22,41	13,30	11,67
26	17,10	17,07	11,10	9,60
27	23,70	22,41	11,00	11,67
28	17,70	17,26	6,80	7,05
29	17,30	17,07	11,00	9,60
30	27,80	25,86	8,60	10,13
31	17,40	17,07	11,10	9,60
32	16,20	14,68	7,60	9,75

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Tabella 4. Risultati del disegno sperimentale con distribuzione Doehlert

Test	Biomassa (g/l)	Cell PI + (%)	FSC	SSC	β carotene (mg/g DCW)	Glicerolo consumato (g/l)
1	17,33	2,60	60,50	46,50	0,78	42,00
2	19,90	2,80	71,20	57,50	0,79	43,4
3	24,50	1,90	55,20	44,20	0,50	55,80
4	24,30	1,20	65,00	44,90	0,66	52,40
5	14,60	0,90	55,90	46,50	0,50	46,00
6	14,60	0,90	53,00	42,80	0,52	36,80
7	14,90	0,70	50,30	43,20	0,53	38,90
8	15,10	0,50	48,00	32,50	0,41	44,20
9	17,40	1,20	48,90	42,80	0,46	42,00
10	16,70	1,30	38,30	33,60	0,35	55,30
11	6,50	0,40	41,50	37,30	0,37	19,60
12	6,30	0,40	41,40	35,90	0,37	20,10
13	4,40	0,30	40,10	29,10	0,38	15,10
14	4,90	0,30	42,30	39,50	0,36	15,10

Raffaëla Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

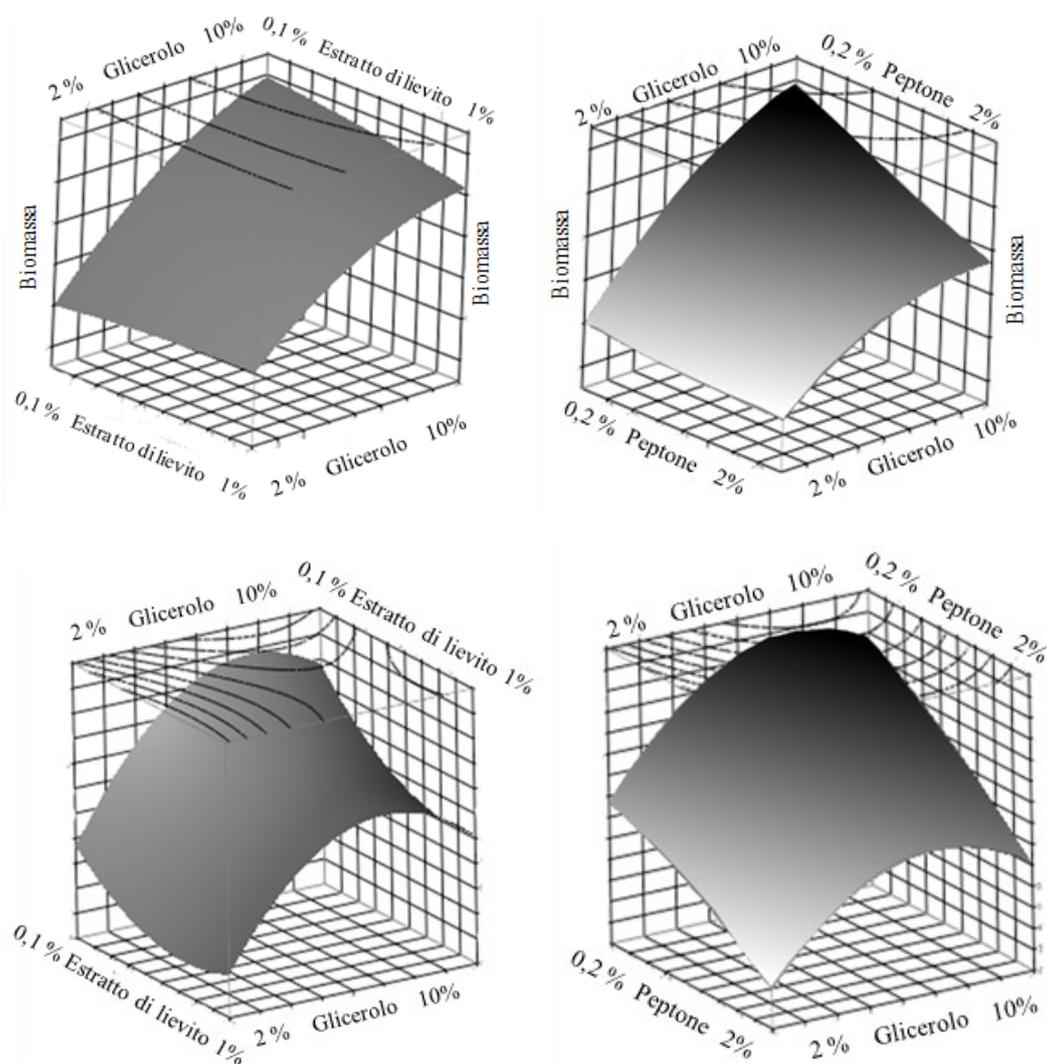


Figura 1. Response surface e contour plot per l'effetto dell'estratto di lievito, peptone e glicerolo sulla biomassa e sui carotenoidi totali.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

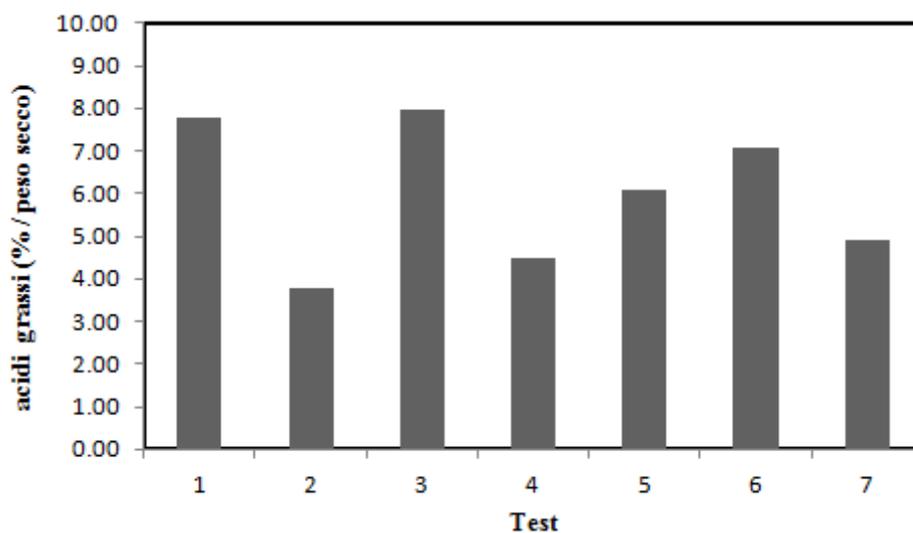


Figura 2: Produzione di acidi grassi. I valori riportati si riferiscono alle medie dei 2 replicati tecnici eseguiti in gas-cromatografia per ciascun replicato delle condizioni sperimentali (test 1-14).

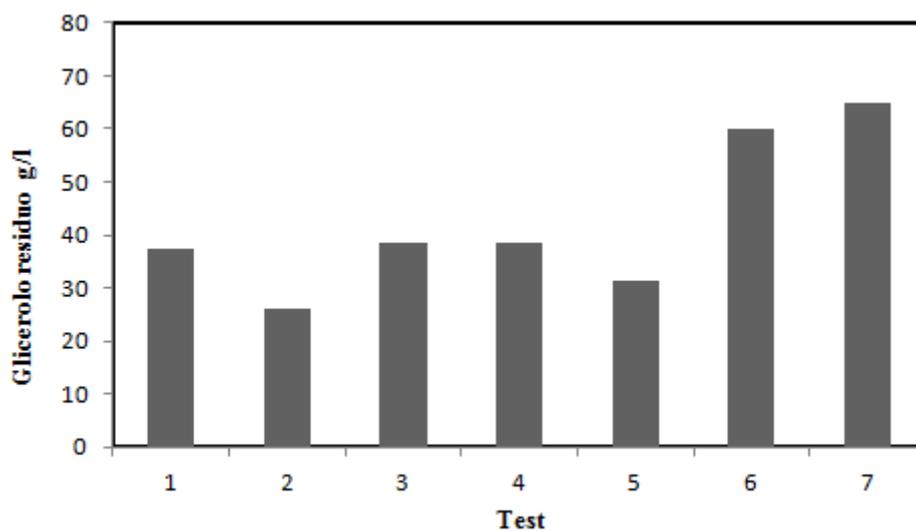


Figura 3. Glicerolo residuo calcolato per HPLC. I valori riportati si riferiscono alle medie dei replicati delle condizioni sperimentali (test 1-14).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Tabella 5. Valori di fluorescenza delle cellule trattate con Nile Red e rilevati nel canale FL2 e delle cellule trattate con Bodipy e rilevati nel canale FL1.

Test	NRFL2	BPFL1
1	31,01	396,93
2	33,02	390,84
3	35,32	425,79
4	19,98	289,63
5	29,63	491,83
6	20,52	360,12
7	29,29	311,22
8	60,44	234,15
9	29,13	301,37
10	29,94	304,53
11	245,34	254,92
12	259,4	259,4
13	318,04	318,04
14	392,02	339,51

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

5.4 Discussione

R. glutinis può assimilare glicerolo come fonte carboniosa (Easterling et al., 2009). Il glicerolo grezzo è uno dei maggiori coprodotti della conversione degli oli in biodiesel. Infatti si produce il 10% di glicerolo sulla massa di olio sottoposta a transesterificazione. L'aumento della produzione del biodiesel ha comportato di fatto un aumento di disponibilità di glicerolo grezzo e un conseguente decremento del suo prezzo di mercato (Saenge et al., 2011). Pertanto l'utilizzo del glicerolo grezzo come substrato a basso costo per la produzione di β -carotene risponde alla necessità di valorizzare un co-prodotto della industria del biodiesel e di facilitarne al contempo lo smaltimento.

Si è scelto quindi di utilizzare il glicerolo grezzo come substrato a basso costo sul quale coltivare il mutante 400A15, iperproduttore di β -carotene, per ottimizzare la produzione di tale pigmento.

Per quanto riguarda le fonti azotate Bhosale and Gadre hanno rilevato che fonti di azoto organico, rispetto a fonti inorganiche, consentono un maggior accumulo di carotenoidi (Bhosale e Gadre, 2011). El Banna et al. (2012) hanno riportato che la fonte azotata influisce sulla produzione di biomassa, di carotenoidi e sui rapporti percentuali tra i diversi carotenoidi prodotti. Pertanto nella formulazione del terreno colturale impiegato nel CCD è stato privilegiato l'uso di peptone ed estratto di lievito come fonti azotate di natura organica.

I response surface e contour plot disegnati sulla base delle equazioni quadratiche relative alla produzione di biomassa e carotenoidi indicano che il glicerolo grezzo, l'estratto di lievito e il peptone influiscono sulle due variabili. In particolare, il glicerolo grezzo e il peptone influiscono più dell'estratto di lievito sulla produzione di biomassa e carotenoidi. Perciò, dai risultati ottenuti, è possibile affermare che nelle condizioni colturali studiate, la massimizzazione della produzione di carotenoidi si ottiene in terreno colturale contenente estratto di lievito all' 1%, peptone al 2% e glicerolo grezzo al 7,5% e che concentrazioni superiori di glicerolo determinano una riduzione della produzione dei carotenoidi e un incremento della produzione di biomassa. Questa predizione è stata confermata tramite una fermentazione di controllo, condotta in triplo, nella quale 400A15 è stato inoculato in terreno colturale formulato secondo quanto suggerito dal modello (Cutzu et al., 2013a).

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

Il disegno sperimentale secondo la distribuzione di Doehlert ha permesso di capire come la composizione del terreno in termini di C/N e la disponibilità di ossigeno influiscono sulla produzione di biomassa e carotenoidi, sulla dimensione e struttura interna cellulare e sulla permeabilità della membrana.

La quantità maggiore di biomassa prodotta (24.5 g/l) è stata ottenuta per il più basso rapporto C/N studiato (11.3), alla k_{La} di 12.5×10^{-3} /s. Per questo C/N il cambiamento di k_{La} da 5×10^{-3} /s a 12.5×10^{-3} /s promuove la formazione di cellule. Infatti la biomassa prodotta aumenta del 31% (da 18.6 g/l a 24.4 g/l). Questo indica che l'ossigenazione è un parametro fondamentale per lo sviluppo delle cellule. L'utilizzo di beute flangiate e l'agitazione della coltura permettono un costante apporto di ossigeno e quindi incrementano la capacità delle cellule di utilizzare i nutrienti a disposizione. Anche per C/N pari a 20, il cambiamento di k_{La} da 4×10^{-3} /s a 31.3×10^{-3} /s induce un aumento della biomassa del 14% (da ~14.8 g/l a ~17.0 g/l). I valori di biomassa osservati per il C/N più alto, pari a 65.0, sono i più bassi (7 g/l). In queste condizioni l'aumento della disponibilità di ossigeno non si riflette in un conseguente aumento della biomassa. Probabilmente le cellule soffrendo della carenza della fonte azotata utilizzano il nutriente per il mantenimento del metabolismo basale e non per la produzione di biomassa che risulta così diminuita.

La maggior quantità di β -carotene prodotto (0.79 mg/g DCW) si è avuta con il più basso C/N (11.3) e con la minor disponibilità di ossigeno (k_{La} 5×10^{-3} /s). Per C/N pari a 11.3, l'aumento della k_{La} (da 5×10^{-3} /s a 12.5×10^{-3} /s) si riflette in un decremento del β -carotene prodotto da 0.77 a 0.60 mg /g peso secco.

Con l'aumentare del C/N a 20.0, la produzione di β -carotene diminuisce. Inoltre, l'aumentare della k_{La} riduce ulteriormente la produzione di β -carotene (test 5-6, 7-8, 9-10). Questo può essere spiegato col fatto che l'aumento della disponibilità di ossigeno, guida il flusso del carbonio verso la produzione di biomassa invece che verso la produzione di β -carotene. Per il C/N pari a 65.0 i valori di β -carotene rimangono stabili anche al variare di k_{La} .

La permeabilità della membrana cellulare era maggiore per il più basso C/N e k_{La} , condizioni in cui il lievito produce la maggior quantità di biomassa e di carotenoidi. La percentuale di cellule permeabilizzate diminuisce all'aumentare della k_{La} .

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

In queste condizioni aumenta ulteriormente la biomassa e diminuisce la concentrazione di β -carotene. Sembra quindi che la maggiore permeabilità della membrana sia da imputare ad una maggiore produzione di β -carotene come già ipotizzato nel capitolo 2. In accordo, anche per C/N maggiori, la diminuzione della permeabilità della membrana va di pari passo con la diminuzione della concentrazione di β -carotene. Dai risultati ottenuti in questi esperimenti la permeabilità della membrana non risulta essere strettamente influenzata dalla disponibilità di ossigeno (test 1–4 e 11–14).

Invece la disponibilità di ossigeno e il C/N influiscono notevolmente sulla dimensione cellulare. Infatti per C/N pari a 11.3 l'aumento della k_{La} determina una riduzione del 15% della dimensione cellulare. Anche per C/N di 20 l'aumento della k_{La} determina una diminuzione del volume cellulare. Anche in questo caso, come per la produzione di β -carotene, quando il rapporto C/N è di 65, aumenti della k_{La} non determinano un sostanziale cambiamento della dimensione cellulare. Per valori fissi di k_{La} un aumento del C/N comporta una diminuzione della dimensione cellulare. Questo risultato, se analizzato insieme ai dati di consumo del glicerolo, suggerisce che una limitazione della fonte azotata determina una riduzione del volume cellulare.

L'andamento della granularità cellulare, misurato tramite SSC, è coincidente con quello della dimensione cellulare (FSC) e mostra che le cellule che presentano maggiore complessità della struttura interna sono quelle che hanno dimensione maggiore.

Il cambiamento delle condizioni colturali applicato nei diversi test del disegno sperimentale secondo la distribuzione di Dohelert ha determinato variazioni nel contenuto in acidi grassi di 400A15 che in alcuni casi era superiore rispetto a quello rilevato nel corso della coltivazione in condizioni standard (vedi capitolo 2).

I fluorocromi Nile Red e Bodipy impiegati per la quantificazione citofluorimetrica del β -carotene sono lipofili e vengono generalmente impiegati per la quantificazione dei lipidi (Lopes da Silva et al., 2011). E' quindi lecito attendersi che cambiamenti nel contenuto lipidico cellulare rilevati in diverse condizioni colturali, o in diverse fasi della crescita, compromettano la validità della quantificazione del β -carotene.

In effetti si è osservato che campioni di cellule con contenuto lipidico diverso rispetto a quello rilevato nelle condizioni sperimentali utilizzate per costruire i modelli, e in seguito a trattamento con i fluorocromi Nile Red e Bodipy emettevano fluorescenze che

ricadevano al di fuori degli intervalli di linearità. Questo potrebbe essere conseguenza del differente contenuto lipidico in differenti condizioni colturali. I modelli che prevedono l'uso di questi fluorocromi pertanto non possono essere applicati a cellule coltivate in condizioni sperimentali diverse da quelle utilizzate per la formulazione del modello.

Perciò per la quantificazione del β -carotene si è scelto di utilizzare l'autofluorescenza rilevata nel canale FL4. In questo modo la quantificazione non è influenzata dal contenuto lipidico.

5.5 Bibliografia

- Bhosale PB e Gadre RV. 2001. Production of β -carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water. *Biores Technol* 76: 53–55.
- Bhosale PB e Gadre RV. 2011 Production of β -Carotene by a Mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 55(4), 423-427.
- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS . 1978. Statistics for experimenters. Wiley, New York
- Cutzu R, Coi A, Rosso F, Bardi L, Ciani M, Budroni M, Zara G, Zara S, Mannazzu I. 2013a. From crude glycerol to carotenoids by using a *Rhodotorula glutinis* mutant. *World J Microbiol Biotechnol*. 29(6): 1009-1017.
- Cutzu R, Clemente A, Reis A, Nobre B, Mannazzu I, Roseiro J, Lopes da Silva T. 2013b. Assessment of β -carotene content, cell physiology and morphology of the yellow yeast *Rhodotorula glutinis* mutant 400A15 using flow cytometry. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 40(8):865-875
- Doehlert DH .1970. Uniform shell designs. *Appl Stat* 19: 231–239
- Domínguez-Bocanegra AR, Torres-Muñoz JA . 2004. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 66(3): 249-52.
- El-Banna A, El-Razek A, El.Mahdy A .2012. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food Nutr Sci* 3:64–71.
- Easterling, ER, French WT, Hernandez R e Licha M. 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Biores Technol* 100, 356–361.
- Ferreira SLC, Queiroz AS, Fernandes MS, dos Santos HC. 2002. Application of factorial designs and Doehlert matrix in optimization of experimental variables associated with the preconcentration and determination of vanadium and copper in seawater by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. 57,1939–1950
- Ferreira SL, Bruns RE, da Silva EG, Dos Santos WN, Quintella CM, David JM, de Andrade JB, Breikreitz MC, Jardim IC, Neto BB. 2007. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J Chromatogr A*. 27;1158(1-2):2-14.
- Lopes da Silva T, Feijão D, Roseiro J, Reis A . 2011. Monitoring *Rhodotorula glutinis* CCM1 145 physiological response and oil production growing on xylose and

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

- glucose using multi-parameter flow Cytometry. *Biores Technol* 102:2998–3006.
- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, Xian M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34 (1):1–5
- Myers RH e Montgomery DC. 1995. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. In : Wiley, New York. (ed) Senanayake SPJN.
- Parampalli A, Eskridge K, Smith L, Meagher MM, Mowry MC Subramanian A. 2007. Development of serum-free media in CHO-DG44 cells using a central composite statistical design. *Cytotechnology*. 54. 57–68.
- Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT, Bourtoom T. 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry* 46, 210–218.
- Simova E, Frengova G, Beshkova D. 2003. Effect of aeration on the production of carotenoid pigments by *Rhodotorula rubra*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* co-cultures in whey ultrafiltrate. *Z Naturforsch C*. 58,225–229

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

6. CONCLUSIONI

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.
Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.
Università degli studi di Sassari

La caratterizzazione fisiologica di C2.5t1 e dei suoi due mutanti primari 400A15 e 200A6 ha evidenziato che essi differiscono essenzialmente per quantità e qualità dei carotenoidi prodotti e quindi suggerito che potessero costituire dei modelli biologici affidabili per lo studio della via carotenogenica, utilizzando un approccio di analisi proteomica comparativa (2D-DIGE). La 2D-DIGE ha prodotto una gran mole di informazioni, al momento di difficile utilizzo. Infatti, il genoma di *R. glutinis* è stato solo in parte sequenziato e ciò condiziona l'identificazione delle proteine individuate. Tuttavia, l'utilizzo di database custom ha permesso di individuare sequenze associate a enzimi variamente coinvolti nella produzione di acetyl-CoA, a enzimi della via del mevalonato e della via carotenogenica. Il dirottamento del flusso del carbonio verso la biosintesi del mevalonato, ipotizzato sulla base dei risultati della 2D-DIGE giustifica, almeno in parte, la maggior produzione di β -carotene nel mutante 400A15. In questo mutante, infatti, l'incremento nella produzione di β -carotene si accompagna ad un decremento significativo nella produzione di torulene e torularodina (Cutzu et al., 2013a). Ciò sembrerebbe dovuto da un lato alla incrementata espressione di enzimi della via biosintetica attivi a monte del licopene, dall'altro alla capacità del mutante di indirizzare il licopene verso la produzione di β -carotene a discapito degli altri pigmenti (Fig.1).

Data la frammentarietà delle informazioni sulla via carotenogenica di *R. glutinis*, l'ottimizzazione della produzione di β -carotene col mutante 400A15 poteva essere conseguita esclusivamente agendo sulle variabili di processo. Sono stati quindi realizzati due disegni sperimentali indipendenti che hanno portato il mutante 400A15 a produrre, in condizioni ottimizzate, una quantità di β -carotene significativamente superiore a quella prodotta dal ceppo parentale. Per quantificare il β -carotene prodotto si è proceduto con la messa a punto di un metodo citofluorimetrico multiparametrico. Questo metodo non presenta gli svantaggi associati ai metodi tradizionalmente impiegati per la estrazione e quantificazione del β -carotene e permette di monitorare in tempo reale lo stato fisiologico del biocatalizzatore (Cutzu et al., 2013b).

In conclusione, la realizzazione di questo progetto ha consentito di produrre alcuni strumenti utili per la delucidazione dei meccanismi che sottendono la produzione dei carotenoidi.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari

La ricostruzione della via carotenogenica, realizzabile attraverso l'integrazione di dati genomici e proteomici, permetterà di individuare gli step su cui agire per facilitare una efficiente conversione dei precursori metabolici nei prodotti di interesse e incrementare ulteriormente la produzione di β -carotene.

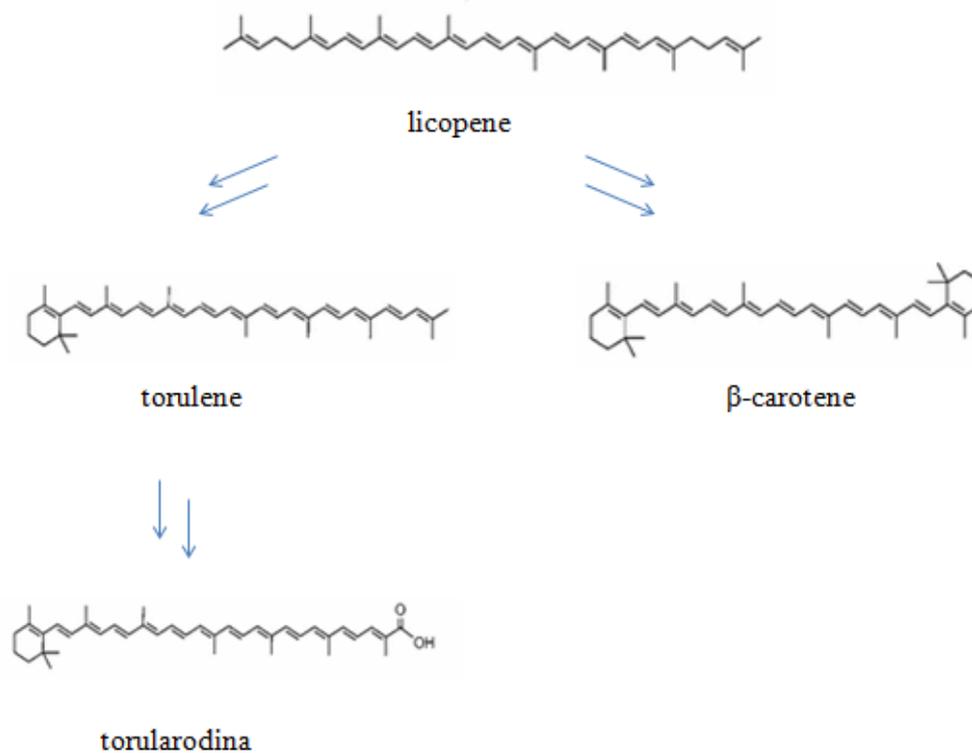


Figura 1: Schema della produzione del β -carotene, torulene e torularodina a partire dal lycopene.

Il lavoro presentato in questa tesi è stato finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali D.M. 26285/7303/2009 Prot. 29299 (Annualità 2010) “I lieviti nel recupero e valorizzazione del glicerolo grezzo derivante dalla produzione di biodiesel” e dalla Regione Autonoma della Sardegna (RAS Legge 7 (2007) Annualità 2011) “Studio della biosintesi dei carotenoidi mediante analisi proteomica e trascrizionale di *Rhodotorula glutinis* C2.5t1 e di suoi mutanti difettivi nella produzione di pigmenti”.

Raffaella Cutzu. Produzione di carotenoidi in *Rhodotorula glutinis* su glicerolo.

Tesi di dottorato in Biotecnologie microbiche agroalimentari, Scuola di dottorato di ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari.

Università degli studi di Sassari