

## NUTRIENȚI PREFERENȚIALI PENTRU CULTIVAREA DIRIJATĂ A DROJDIEI *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS* CNMN-Y-15

*Elena MOLODOI, Agafia USATÎI, Oleg CHISELIȚA, Lilia TOPALĂ, Natalia CHISELIȚA*

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM*

The capacity of lipids and sterols biosynthesis increasing in yeast strain *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 during the cultivation on liquid medium with different sources of carbon and nitrogen has been studied. There has been established that yeast better metabolizes melasa and glucose, those are proposed for medium optimization for directed synthesis of yeast sterols producer.

### Introducere

Un rol important în sporirea potențialului biosintetic al microorganismelor revine mediului nutritiv optim ce asigură celula cu surse de energie și elemente nutritive corespunzătoare. Necesitățile nutritive și parametrii de cultivare variază în funcție de particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor microbiene și sunt specifice pentru fiecare producător [1]. Pentru multiplicare și biosinteza componentelor lipidice, drojdiile sunt dependente, în mare măsură, de prezența surselor de carbon și azot în mediul de cultură.

Cele mai multe specii de *Saccharomyces* se dezvoltă pe medii ce conțin zaharuri fermentescibile ca surse de carbon, săruri de amoniu ca donatori de azot, săruri minerale și factori de creștere [2]. Prin modificarea compoziției acestora se poate ameliora sau inhiba dezvoltarea drojdiilor.

În prezent, sunt relativ bine cercetate condițiile de cultivare, în urma cărora are loc acumularea sporită de steroli la drojdie. Cu toate acestea, rămân nedefinite unele aspecte ale biosintezei sterolilor, care ar determina suprasinteza sterolilor de către celulele levuriene. Prin urmare, prezintă interes o cercetare mai amplă a nutrienților preferențiali, a condițiilor de cultivare a drojdiilor și a sintezei sterolilor la nivelul cerințelor moderne, precum și metodele de analiză a acestora. Aceasta dă posibilitate de a majora efectiv producerea de steroli din materie primă mai ieftină de origine vegetală sau microbială [3].

Culturile genului *Saccharomyces* pot asimila numai hexoze. În consecință, se folosesc materii prime cu conținut de amidon sau de alți hidrați de carbon ce pot fi scindați în hexoze. Tot mai des, ca materie primă se utilizează melasa de sfeclă de zahăr, foarte accesibilă economic, care, pe lângă zaharoză, conține și o serie de alți compuși, ca: zahăr invertit (amestec de D-glucoză și D-fructoză), betaine, aminoacizi, acizi organici [4].

În contextul celor expuse, scopul cercetărilor constă în a analiza influența diferitelor surse de carbon și azot asupra productivității, biosintezei lipidelor și sterolilor la drojdia de bere și în a selecta substratul eficient.

### Material și metode

*Obiectul de studiu.* Ca obiect de cercetare a servit tulpina de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15, producător activ de steroli [5].

*Medii și condiții de cultivare.* Inoculul s-a obținut prin cultivarea drojdiei pe must de bere, timp de 24-48 ore, pe agitatorul rotativ (180-200 rot/min.), la temperatura de + 25...27°C. Inoculul s-a utilizat pentru mediile de fermentație în volum de 3-5%.

Ca mediu nutritiv de referință pentru cultivarea submersă a drojdiei s-a utilizat mediul A-1 cu următoarea compoziție, g/l: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2,0; MgSO<sub>4</sub> – 1,0; autolizat de drojdie – 10 ml [6]. Cultivarea s-a realizat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 1 l ce conțineau 0,2 l mediu de cultură, pe agitatorul rotativ (180-200 rot/min.), la temperatura de + 25...27°C timp de 3 zile.

Pentru investigații s-au utilizat sursele de carbon și azot, g/l mediu de cultură: glucoza – 20,0; 30,0; 40,0; melasa – 40,0; 60,0; 80,0; glicerina – 20,0; 40,0; 60,0; sulfatul de amoniu – 1,0; 3,0; 5,0.

*Metodele de realizare a cercetărilor.* Determinarea **productivității** drojdiei s-a efectuat gravimetric cu recalculul masei celulare la biomasa absolut uscată conform metodei clasice [7]. Extragerea **lipidelor** din biomasa levuriană s-a determinat cantitativ conform [8]. Conținutul de **steroli** s-a determinat gravimetric conform procedurii nou-elaborat în Laboratorul Oleobiotehnologie [9].

Datele experimentale au fost supuse prelucrării statistice în baza programului computerizat Excel Microsoft.

### Rezultate și discuții

După cum se cunoaște, așa surse de carbon ca lactoza, xiloza, arabinoza, manitolul și sorbitolul nu pot fi asimilate sau se asimilează foarte greu de către celulele de drojdie *Saccharomyces*. În Tabel este arătat cum influențează diferite surse de carbon asupra procesului de biosinteză a sterolilor [10]. Conform datelor, conținutul de steroli în biomasa uscată variază de la 3,6% (galactoză) la 5,1% (melasa).

Tabel

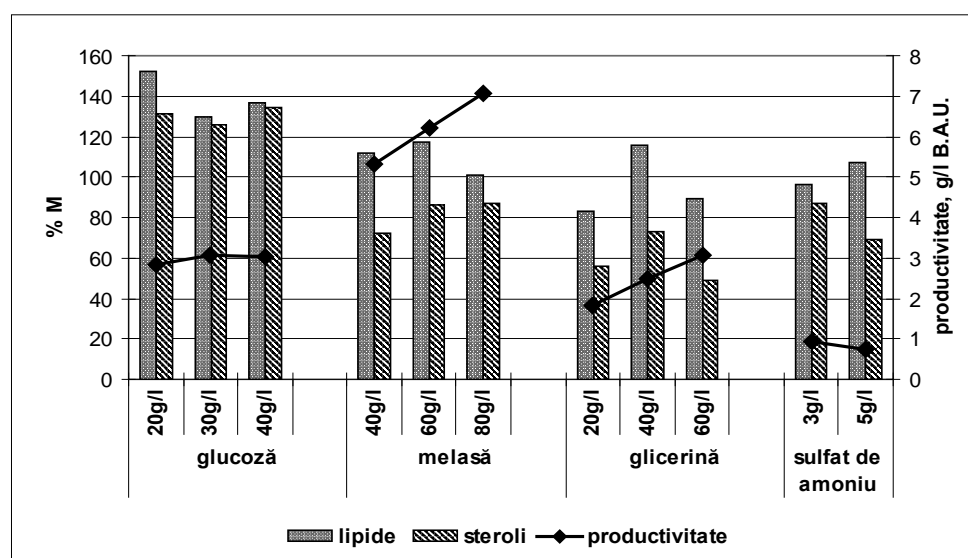
**Influența diferitelor surse de carbon asupra conținutului de steroli  
la drojdia de bere *Saccharomyces carlsbergensis* IHM101**

| Nr. d/o | Sursele de carbon       | Steroli, % B.U. |
|---------|-------------------------|-----------------|
|         | <i>Cultura inițială</i> | 3,39            |
| 1       | Galactoză               | 3,60            |
| 2       | Lactoza                 | 3,73            |
| 3       | Sorbitol                | 3,73            |
| 4       | Riboza                  | 4,08            |
| 5       | Fructoza                | 4,41            |
| 6       | Maltoza                 | 4,75            |
| 7       | Zaharoza                | 4,85            |
| 8       | Rafinoza                | 4,92            |
| 9       | Glucoza                 | 5,02            |
| 10      | Melasă                  | 5,10            |

În ceea ce privește importanța compușilor cu azot în procesul de acumulare a sterolilor de către celulele drojdiilor *Saccharomyces*, datele din literatura de specialitate confirmă faptul că azotul nu este necesar pentru îmbogățirea drojdiilor cu steroli, ci, dimpotrivă, cantitățile mari ale acestuia în mediul de cultură frânează în mod considerabil acumularea sterolilor în celule. După părerea autorilor, azotul reprezintă un factor represiv asupra procesului de biosinteză a sterolilor, deoarece o parte din produsele intermediare care se formează în urma metabolismului glucidic, necesare pentru sinteza sterolilor, sunt preluate de către azotul prezent în mediul de cultură pentru transformarea lor în compuși cu azot, adică în proteine, aminoacizi, acizi nucleici.

Astfel, în vederea elaborării unui mediu nutritiv optim ce va asigura conținut sporit de steroli, a fost cercetată capacitatea de biosinteză a principiilor bioactive la cultivarea tulpinii de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 pe medii lichide cu divers raport al carbonului și azotului. În calitate de substraturi de carbon și azot au servit un șir de surse, ca: glicerina, melasa, glucoza, zaharoza, sulfatul de amoniu, utilizate pe larg în microbiologie pentru cultivarea drojdiilor.

Prin analiza datelor obținute s-a constatat că tulpina *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 este capabilă să metabolizeze toate sursele de carbon și azot testate. Creșterea intensă a culturii s-a înregistrat pe mediul ce conține melasă, cantitatea de biomasă acumulată variind între 5,32 - 7,06 g/l (Fig. 1). O productivitate mică a fost semnalată pe mediul în care a fost utilizat sulfatul de amoniu în concentrații de 3,0 și 5,0 g/l. Astfel, pentru a obține o productivitate maximală pentru drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 se propune a fi utilizat mediul nutritiv cu următoarea componență, g/l:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 1,0$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 2,0$ ;  $\text{Mg SO}_4 - 1,0$ ; autolizat de drojdie - 10 ml; melasă - 80,0 g/l.



**Fig.1.** Influența surselor de carbon și azot asupra productivității, biosintezei lipidelor și sterolilor de către drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15

La estimarea activității de biosinteză a lipidelor și sterolilor s-a stabilit că drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 manifestă activitate maximă în cazul creșterii pe mediile ce conțin glucoză. Printr-un efect

stimulator mai puternic s-a evidențiat glucoza în concentrație de 20,0 g/l – pentru biosinteza lipidelor și de 40,0 g/l – pentru biosinteza sterolilor. Valorile activităților biosintetice manifestate în prezența concentrațiilor menționate variază între 16,88% lipide în B.A.U. și 10,19% steroli în B.A.U., fiind cu 52%, respectiv, 34% mai înalte comparativ cu martorul (Fig.1). Aceasta evidențiază caracterul inductibil al sinzetei produselor oleogene la tulpina în studiu de către sursa de carbon menționată. Astfel, pentru optimizarea mediului nutritiv și obținerea cantității maxime de lipide și steroli se propune a fi utilizată ca sursă de carbon glucoza în concentrații de 20,0 și 40,0 g/l.

Generalizând rezultatele obținute privitor la rolul carbonului și azotului, se poate confirma că drojdia metabolizează mai eficient melasa, care asigură o creștere activă a biomasei în defavoarea biosintezei lipidelor și sterolilor. Concentrațiile de glucoză administrate în mediul de referință asigură o creștere a conținutului de lipide, precum și al sterolilor. Aceste două componente – melasa și glucoza, se propun a fi cercetate în continuare pentru optimizarea mediului de cultură pentru drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

### Concluzii

1. Din sursele de carbon și azot testate, drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 metabolizează mai eficient melasa și glucoza. Melasa asigură o creștere activă a biomasei, dar în defavoarea biosintezei lipidelor și sterolilor.

2. Mediul nutritiv cu următoarea componență, g/l:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,0;  $\text{Mg SO}_4$  – 1,0; autolizat de drojdie – 10 ml; melasă – 80,0 permite obținerea unei productivități maxime (7,06 g/l B.A.U.) și se propune a fi utilizat în biotehnologia cultivării drojdiei.

3. Incluzarea în mediul de cultivare a tulpinii *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 a glucozei, în concentrație de 20,0 – 40,0 g/l, influențează considerabil procesul de biosinteză a lipidelor și sterolilor, sporind conținutul acestora până la 14,42 ...16,88% la B.A.U., respectiv, 9,56...10,19% la B.A.U.

### Referințe:

1. Zarea G. Tratat de Microbiologie Generală. – București: Editura Academiei Republicii Socialiste România, 1984.- 474 p.
2. Anghel I., Vassu T., Segal B. și al. Biologia și tehnologia drojdiilor. Vol.II. - București: Editura Tehnică, 1991, p.386.
3. <http://wikipedia.org/wiki/Sterol>
4. Oniscu C., Cașcaval D. Inginerie Biochimică și Biotehnologie. I. Ingineria proceselor biotehnologice. - Iași: Inter Global, 2002, p.451.
5. Usafii A., Molodoi E., Moldoveanu T., Borisov T., Topală L. Tulpina de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* – sursă de steroli / Brevet de Invenție Nr.3538 // MD-BOPI. - 2008. - Nr.3. - P.32-33.
6. Anghel I., Vamanu A., Mitrache L. și al. Biologia și tehnologia drojdiilor. Vol.III. - București: Editura Tehnică, 1993, p.308.
7. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Егорова Н.С. - Москва: Изд-во МГУ, 1995.- 224 с.
8. Usafii A., Calcateniuc A., Grosu L., Șirșov T. Procedeu de extragere a lipidelor din drojdii / Brevet de Invenție Nr.1930 // MD-BOPI. - 2002. - Nr.5.
9. Usafii A., Chirița E., Molodoi E., Moldoveanu T., Cucu T., Borisov T. Procedeu de obținere a ergosterolului din drojdii *Saccharomyces* / Brevet de Invenție Nr.3570 // MD-BOPI. - 2008. - Nr.4. - P.41-42.
10. Гальцова Р. Стеринообразование у дрожжевых организмов. - Москва: Наука, 1980.- 224 с.
11. Ibidem.
12. Ibidem.

Prezentat la 17.02.2009