

**PRECURSORI DETERMINANȚI AI BIOSINTEZEI STEROLILOR
LA DROJDIA *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS* CNMN-Y-15**

*Agafia USATII, Elena MOLODOI, Oleg CHISELIȚA, Lilia TOPALĂ,
Natalia CHISELIȚA, Tamara BORISOVA*

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

The productivity, lipids and sterols compound in yeast strain *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 by the influence of some acetic precursors have been analyzed. It is clearly shown the positive effect of $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ on yeast productivity, especially in concentration 30 mg/l. $[\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ has been manifested as efficient stimulator of lipids and sterols biosynthesis.

Introducere

Procesele de fermentație constau în cultivarea tulpinilor pe medii de cultură, care conțin componentele necesare creșterii microorganismelor și biosintezei produselor dorite. La conceperea unui mediu nutritiv performant se iau în calcul necesitățile microorganismului în surse de carbon, azot, săruri minerale, precursori (compuși organici sau anorganici, care, adăugați în mediul de cultură, intervin ca molecule intermediare în biosinteza sau dirijarea biosintezei într-o anumită direcție), vitamine, reglatori ai proceselor de biosinteză (inductori, activatori sau represanți care pot acționa în producția principiilor bioactive fără a interveni direct în biosinteza lor) [1].

Se știe că precursorii acetati în protoplastul celular se sintetizează în urma metabolismului glucozei. După cum au demonstrat numeroase cercetări, activarea acetatului în celulă decurge sub influența coenzimei A (CoA), pe larg răspândită în natură [2,3]. În rezultatul acestei activări se formează acetyl-CoA.

Acetyl-CoA reprezintă acel compus intermediar comun, care se organizează în rezultatul dezintegrării oxidative a acizilor grași, glucidelor și aminoacizilor. Indiferent de originea sa, acetyl-CoA poate servi ca unitate constructivă inițială pentru biosinteza scheletului carbonic al diferiților compuși organici cu rol biologic important.

S-a demonstrat că numeroase microorganisme, inclusiv drojdiile, sunt capabile să sintetizeze, în totalitate, compuși ai șirului izoprenic din reziduurile acidului acetic cu participarea CoA [4]. Experiențele cu acetatul marcat au demonstrat participarea lui în biosinteza diferiților compuși care aparțin clasei compușilor poliizoprenici de o importanță practică majoră, cum sunt colesterolul, ergosterolul, carotenoidele, politerpenii. Conexiunea acetilului cu CoA se atribuie legăturilor macroergice, analoge cu cele ale acidului fosforic în adenozintrifosfat.

Acetyl-CoA participă la biosinteza acidului mevalonic – precursor al multor compuși de importanță fiziologică care se formează în celulă. Acidul mevalonic se sintetizează din acid acetic cu participarea enzimei de acetilare – CoA. De aceea, cercetarea mai detaliată a condițiilor de cultivare a drojdiilor și formarea la ele a sterolilor la nivelul conceptului modern prezintă interes deosebit. Aceasta va permite de a organiza mai eficient producerea ergosterolului, a provitaminei D din surse mai ieftine.

În contextul celor expuse, scopul investigațiilor constă în a cerceta influența unor precursori asupra productivității, biosintezei lipidelor și sterolilor la drojdia de bere și în a selecta compuşii eficienți.

Material și metode

Obiectul de studiu. Ca obiect de cercetare a servit tulpina de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15, producător activ de steroli, izolată din culturile comercializate de drojdiile de bere, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene [5] și păstrată în colecția laboratorului.

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 bază) pentru cultivarea submersă a drojdiei s-a utilizat mediul A-1 cu următoarea compoziție, g/l: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; K_2HPO_4 – 2,0; MgSO_4 – 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.

Metodele de realizare a cercetărilor. În scopul realizării obiectivelor propuse au fost utilizate un șir de metode de cercetare ce țin de determinarea productivității drojdiei, precum și metode de determinare a conținutului de lipide și steroli. 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

Reieșind din faptul că în procesul de biosinteză a diferiților compuși intracelulari se include și o gamă largă de elemente chimice, interes deosebit prezintă studiarea influenței precursorilor, în special a acetatilor, în combinație cu ionii unor metale. Majoritatea sistemelor enzimatică au în componența lor ioni ai metalelor de Zn, Fe, Cu, Mn, Ni etc. Zincul se caracterizează prin cea mai abundentă prezență, după fier, în organisme, ai cărui ioni influențează prin intermediul enzimelor, metabolismul glucidic, proteic, fosforic [10]. Manganul, numărându-se printre elementele indispensabile, este un oligoelement care participă la îndeplinirea mai multor funcții ale organismului. Participă la sinteza colagenului contribuie la rezistența osoasă, participă la metabolismul glucidelor, steroizilor și al câtorva hormoni, reglează creșterea și metabolismul proteinelor, lipidelor, activează un număr mare de enzime. Interes deosebit prezintă studiarea sintezei sterolilor la drojdia de bere *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15, la cultivare în prezența precursorilor.

În cercetările întreprinse au fost utilizați acetatul de zinc $[Zn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O]$ și acetatul de mangan $[Mn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O]$, adăugați în concentrații de 10,0, 20,0, 30,0 mg/l, respectiv.

Ca medii nutritive de bază au servit: mediul A-1 ce include, g/l: $(NH_4)_2SO_4 - 1,0$; $K_2HPO_4 - 2,0$; $MgSO_4 - 1,0$; autolizat de drojdie – 10 ml și mediul M-3 ce include, g/l: $(NH_4)_2SO_4 - 3,0$; $KH_2PO_4 - 1,0$; $MgSO_4 - 0,7$; $NaCl - 0,5$; $Ca(NO_3)_2 - 0,4$; autolizat de drojdie – 10 ml; glucoză – 30,0 g/l [11].

Influența acetatilor asupra tulpinii de drojdie a fost estimată determinând productivitatea, conținutul de lipide și conținutul de steroli în biomasă.

Rezultatele prezentate în Figurile 1 și 2 demonstrează că acetatii testați manifestă efect pozitiv asupra productivității drojdiei, exprimat prin efect mai puternic la concentrațiile compușilor acetati de 30 mg/l mediu de cultură.

Analizând rezultatele testării influenței acetatilor asupra biosintezei lipidelor și sterolilor de către drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15, constatăm că valori maxime ale conținutului de lipide (18,52 - 19,06% în B.A.U.) au fost obținute în condițiile utilizării a 10,0 mg/l acetat de zinc și, respectiv, a 10,0 mg/l acetat de mangan, fiind cu 33,3-38,2% mai mult față de martor.

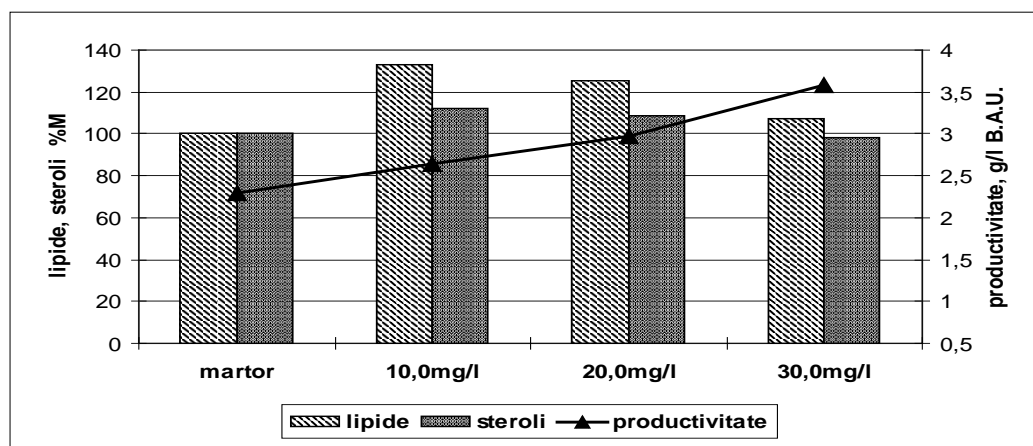


Fig.1. Productivitatea, biosinteza lipidelor și sterolilor la cultivarea drojdiei *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 în prezența acetatului de zinc.

Rezultatele influenței acetatilor asupra conținutului de steroli la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 demonstrează acțiunea stimulatorie a precursorului $[Mn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O]$, adăugat în concentrație de 10,0 mg/l, în mediul de cultură A-1, sporind cantitatea sterolilor până la 6,52% B.A.U., deci cu 21,18% mai mult față de martor (Fig.2).

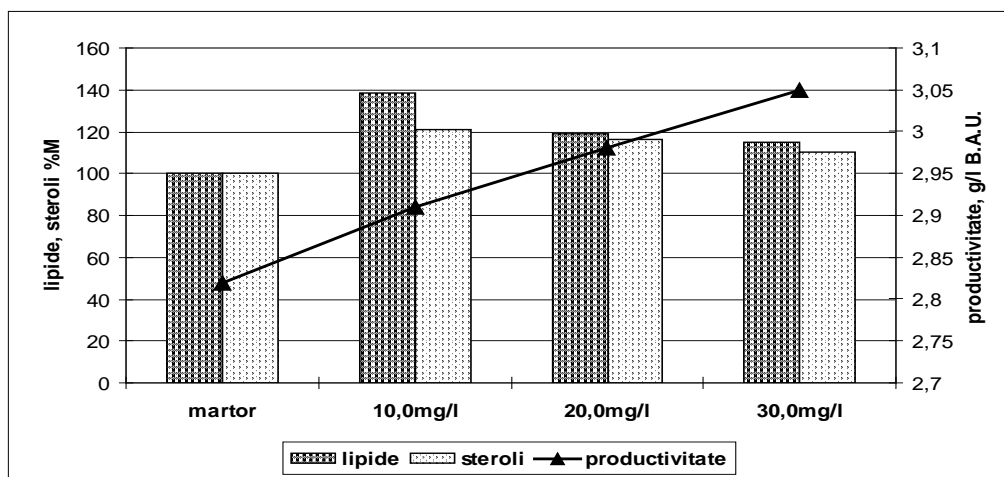


Fig.2. Productivitatea, biosinteza lipidelor și sterolilor la cultivarea drojdiei *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 în prezența acetatului de mangan.

Generalizând rezultatele obținute în experiențele cu acetatii, s-a ajuns la concluzia că biosinteza lipidelor și sterolilor la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 poate fi dirijată prin intermediul precursorilor acetati, în special al acetatului de mangan, care asigură un conținut sporit atât al lipidelor, cât și al sterolilor.

Cele expuse argumentează ipoteza că principala substanță inițială în biosinteza sterolilor din celula vie este acetatul. Astfel, precursorul $[Mn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O]$ se recomandă în calitate de biostimulator al sintezei sterolilor de către tulpina *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

Concluzii

1. Acetatul de zinc în concentrație de 30 mg/l, adăugat în mediul de cultură A-1, manifestă efect pozitiv asupra multiplicării drojdiei, productivitatea fiind cu 33,2 - 38,2% mai înaltă față de martor.

2. Biosinteza sterolilor la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 poate fi sporită prin intermediul acetatului de mangan adăugat în mediul de cultură A-1 în concentrație de 10 mg/l, care asigură un conținut al sterolilor de 6,52% din biomasa absolut uscată, ceea ce este cu 21,2% mai mult față de martor.

Referințe:

1. Oniscu C., Cașcaval D. Inginerie Biochimică și Biotehnologie. - Iași, 2002, p.66.
2. Гальцова Р. Стеринообразование у дрожжевых организмов. - Москва: Наука, 1980. - 224 с.
3. Залашко М. Физиологическая регуляция метаболизма. Минск: Наука і тэхніка, 1991, с.332.
4. Гальцова Р. Стеринообразование у дрожжевых организмов. - Москва: Наука, 1980. - 224 с.
5. Usatîi A., Molodoi E., Moldoveanu T., Borisov T., Topală L. Tulpină 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.3. - 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. Usatîi A., Calcateniuc A., Grosu L., Șirșov T. Procedeu de extragere a lipidelor din drojdiei / Brevet de Invenție Nr.1930 // MD. - BOPI. - 2002. - Nr.5.
9. Usatîi A., Chirița E., Molodoi E., Moldoveanu T., Cucu T., Borisov T. Procedeu de obținere a ergosterolului din drojdiei *Saccharomyces* / Brevet de Invenție Nr.3570 // MD. - BOPI. - 2008. - Nr.4. - P.41-42.
10. Дедюхина Э., Ерошин В. Незаменимые химические элементы в регуляции метаболизма микроорганизмов // Успехи микробиологии // РАН. - 1991. - Вып. 25. - С.127-141.
11. Квасников Е., Щелкова И. Дрожжи. Биология. Пути использования. - Киев: Наукова Думка, 1991. - 332 с.

Prezentat la 17.02.2009