

CZU: 579.873.71:577.115

**INFLUENȚA EXTRACTULUI DE AMINOACIZI ȘI OLIGOPEPTIDE DE ORIGINE
CIANOBACTERIANĂ DIN BIOMASA *SPIRULINA (ARTHROSPIRA) PLATENSIS*
ASUPRA CREȘTERII ȘI LIPIDOGENEZEI TULPINII
STREPTOMYCES FRADIAE CNMN-Ac-11**

Yulia BEREZIUK

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

A fost studiată capacitatea tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, izolată din solurile Părții Centrale a Republicii Moldova, de a acumula biomasă și sinteza lipidelor în dependență de compoziția mediului nutritiv. În calitate de supliment pentru mediul de bază a servit extractul de aminoacizi și oligopeptide din *Arthrospira platensis*. A fost stabilită creșterea cantității biomasei tulpinii studiate (cu 18,2%), pe parcursul creșterii tulpinii pe mediu în prezența extractului în concentrație de 0,1%/V. Valoarea fracției de steroli în toate variantele de mediu a fost mai mare cu 7,0-58,51% față de control.

Cuvinte-cheie: *Streptomyces, mediu de cultivare, extract de aminoacizi și oligopeptide, biomasă, lipide.*

**THE INFLUENCE OF AMINO ACID AND OLIGOPEPTIDE CYANOBACTERIAL EXTRACT BIOMASS
SPIRULINA (ARTHROSPIRA) PLATENSIS ON GROWTH AND LIPIDOGENESIS OF STRAIN
STREPTOMYCES FRADIAE CNMN-Ac-11**

Was studied ability of a strain *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 allocated from soils of the central part of Moldova to accumulate biomass and to synthesize lipids depending on composition of medium. As additive to the main medium used the extract of amino acids and oligopeptides from *Arthrospira platensis*. An increasing yield of biomass of the studied strain (by 18.2%) when grown on medium in the presence of the extract at a concentration of 0.1%/V, and the amount of the sterol fraction in the biomass of the strain grown in the medium supplemented with the extract at all tested concentrations (by 7.0-58.51% in comparison with control).

Keywords: *Streptomyces, medium, extract of amino acids and oligopeptides, biomass, lipids.*

Introducere

Actinomicetele, în special genul *Streptomyces*, cel mai răspândit în natură, se evidențiază printre altele datorită sintezei unui șir de substanțe biologice active. Acestea sunt antibiotice, vitamine, enzime, lipide, aminoacizi, fitohormoni etc. [1-5]. Pentru astfel de microorganisme sintetizatoare un rol foarte important prezintă compoziția mediului nutritiv, deoarece prezența sau absența anumitor componente determină compoziția biomasei și direcționează sinteza compușilor necesari.

Printre mediile nutritive propuse pentru cultivarea actinomicetelor sunt utilizate mediile minerale Dulaney, Pruss, Czapek – cu glucoză sau zaharoză, și altele, precum și medii complexe sau organice, în care sursa principală de carbon este făina (soia, porumb etc.) și diverși aditivi (lichior de porumb abrupt, melasă, drojdie, drojdie de panificație hidrolizată) și săruri minerale. În pofida faptului că pentru cultivarea actinomicetelor sunt propuse numeroase medii de cultivare, actuală rămâne problema obținerii cantităților mai mari de biomasă și reducerea costului acesteia. În acest sens, se efectuează cercetări permanente ale componentelor, care, fiind adăugate la mediul de cultivare, vor influența efectul dorit. În plus, este necesar să se ia în considerare și concentrația de substanțe din mediul de cultivare. De exemplu, adăugarea tărâței de grâu într-o cantitate de 3,34 g/l, praf de laminarie (0,7 g/l) și clorură de sodiu (0,88 g/l) la mediul de bază de cultivare a streptomicetei marine, care sintetizează enzima fucoidan, poate fi utilizată în sinteza nanoparticulelor de aur, cu majorarea randamentului [6]. Optimizarea compoziției mediului nutritiv prin modificarea cantităților de făină de soia, amidon solubil, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ și $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ pentru tulpina *Streptomyces viridochromogenes*, producător de avilamicină, majorează sinteza de 2,8 ori [7]. Avilamicina este un antibiotic furajer, care majorează media zilnică a creșterii masei corporale a porcilor și a păsărilor agricole în etapele finale ale producției acestora [8].

Lipidele sunt cei mai importanți metaboliți sintetizați de streptomicete. Acestea includ acizi grași liberi, gliceride neutre, ceruri, fosfolipide, sfingolipide, inclusiv glicosfingolipide, oxilipine, steroli etc. [9]. Lipidele efectuează mai multe funcții: sunt principalele componente structurale ale membranelor celulare [10,11],

oferindu-le flexibilitate, posedă proprietăți antibacteriene, antioxidative, imunostimulatoare și antitumorale, fosfolipidele reglează activitatea enzimelor membranare [12-14].

Actinomicetele sunt cunoscute pentru capacitatea lor de lipidogeneză [13,15,16]; prin urmare, în mod constant are loc stabilirea substanțelor, care, fiind suplimentate la mediul de cultivare, vor coordona procesul dat. În special, introducerea în mediul nutritiv Dulaney a substanțelor, cum ar fi pantotenat de Ca, β -alanin, biotin, tiamină, asparagin, acidul succinic și altele, brusc intensifică procesul de lipidogeneză la streptomicete. A fost înregistrată o creștere semnificativă a cantității de lipide în biomasa *Streptomyces canosus*, atunci când mediul a fost suplimentat cu pantotenat de Ca, biotină și acid succinic [13].

Scopul cercetărilor rezidă în evaluarea efectului compoziției mediului de cultivare asupra acumulării de biomasă, lipide și a compoziției fracționare a tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 izolate din solurile Părții Centrale a Republicii Moldova.

Material și metode

Obiectul de studiu a fost tulpina *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 izolată din solurile Părții Centrale a Republicii Moldova. Cultura a fost păstrată în două moduri: prin reînsămânțare periodică utilizând trei medii agarizate – Czapek, Gause, de ovăz, precum și sub formă liofilizată. Pentru efectuarea studiilor cu privire la cantitatea lipidelor totale și compoziția fracționară, tulpina studiată a fost crescută pe mediul lichid R, folosind inoculum preparat în mediul Dulaney. Cultivarea a fost efectuată la +27°C, cu ajutorul agitatorului (180-200 rot/min.), timp de 5 zile. Pentru a studia acțiunea compoziției mediului de cultivare asupra acumulării de biomasă, lipide și asupra compoziției fracționare, în mediul de cultivare de bază a fost adăugat extractul de aminoacizi și oligopeptide din *Arthrospira platensis* [17,18], în diverse concentrații. După cultivare, biomasă a fost separată de lichidul cultural, folosind centrifuga (5000 rot/min. timp de 20 min.). Cantitatea de biomasă a fost determinată după metoda gravimetrică. În continuare, a fost realizată extracția de lipide intracelulare din biomasă, după metoda descrisă de Folch cu anumite modificări [19]. Compoziția calitativă și cantitativă a lipidelor a fost determinată după metoda cromatografică în strat subțire pe plăcile „Sorbfil” cu ajutorul densitometrului, descrisă în [20].

Rezultate și discuții

Ultimele două decenii ale secolului XX se caracterizează prin apariția unor studii privind utilizarea biomasei algelor în zootehnie, horticultură, medicină, industria alimentară și în alte industrii. A fost demonstrat că utilizarea lor în hrana păsărilor agricole, a vitelor cornute mari și mici, a porcinelor intensifică metabolismul, îmbunătățește imunitatea față de boli și siguranța animalelor tinere [21-23].

În Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM experimentele au fost efectuate cu utilizarea produselor biologice microalgale ca potențiali regulatori de lipidogeneză la streptomicete. Atunci când streptomicetele sunt cultivate pe medii complexe suplimentate cu produse de origine cianobacteriană într-o cantitate de 0,1-1,0 mg/l, randamentul de biomasă se îmbunătățește cu 4,8-24,7%, iar productivitatea lipidelor – cu 12,0-90,7% [13].

Prin cultivarea tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 pe un mediu modificat a fost înregistrată o creștere a productivității de biomasă. Rezultatele modificării cantității de biomasă a tulpinii studiate sunt prezentate în Figura 1.

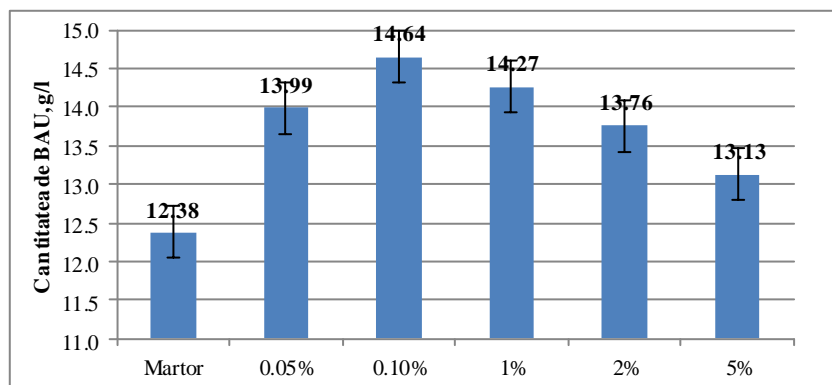


Fig.1. Acumularea biomasei absolut uscate (BAU) de către tulpina *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 în urma cultivării pe mediul complex R suplimentat cu extractul de aminoacizi și oligopeptide.

Potrivit datelor prezentate în Figura 1, creșterea maximală a biomasei la adăugarea extractului de aminoacizi și oligopeptide într-o concentrație de 0,1% a fost de 18,2% față de proba martor. La varianta experienței cu adăugarea extractului de aminoacizi și oligopeptide, într-o concentrație de 0,05%, cantitatea de biomasă a fost majorată cu 13%, comparativ cu proba martor. La adăugarea preparatului în concentrații de 1%, 2% și 5% cantitatea de biomasă obținută a constituit 115,3%, 111,2% și 106,1%, în raport cu proba martor. Astfel, tulpina a fost mai productivă la utilizarea preparatului în concentrații minimale.

Este cunoscut faptul că actinomicetele sunt unii dintre cei mai activi producători de lipide. Acestea sintetizează și acumulează în celulele lor o cantitate destul de mare de lipide. Conținutul de lipide în miceliul actinomicetelor constituie 5-40% și mai mult, în dependență de mediul nutritiv și specificul tulpinii [13,24]. Cantitatea de lipide în biomasa tulpinii studiate, cultivate pe mediul complex R suplimentat cu cantități diferite de preparate obținute din cianobacterii, este prezentată în Figura 2.

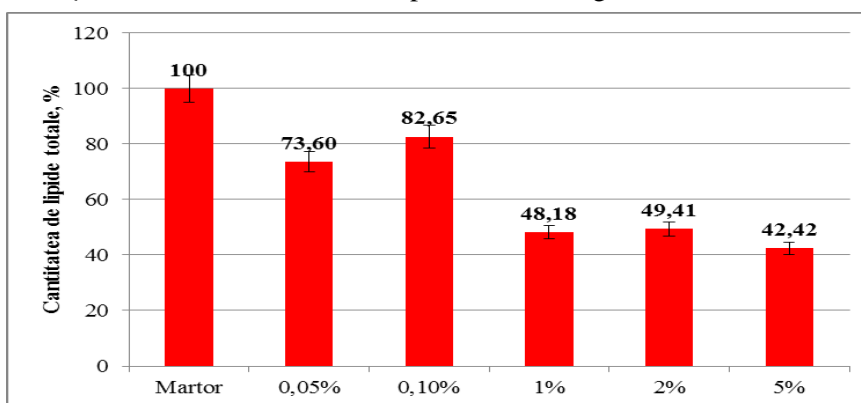


Fig.2. Conținutul de lipide în biomasa *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 în urma cultivării pe mediul complex R suplimentat cu extractul de aminoacizi și oligopeptide.

Conform datelor prezentate în Figura 2, se evidențiază cantitatea scăzută a lipidelor comparativ cu proba martor. Astfel, cantitatea de lipide în biomasa cultivată pe mediul R suplimentat cu extractul de aminoacizi și oligopeptide într-o concentrație de 0,1% a fost de 82,7% în raport cu proba martor. S-a înregistrat o oarecare reducere, aproximativ cu 25%, a cantității de lipide cu utilizarea extractului de aminoacizi și oligopeptide în concentrație de 0,05%. În probele de biomasă cultivate pe mediul R în prezența preparatului la o concentrație de 1%, 2%, 5% cantitatea de lipide a fost de 48,2%, 49,4% și 42,4%, față de proba martor.

Următoarea etapă a cercetării a fost determinarea compoziției fracționale a lipidelor tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11, în urma cultivării pe mediu modificat R. În Figura 3 este prezentată variația cantității fracțiunilor lipidice de bază: fosfolipide, steroli, trigliceride. Este cunoscut faptul că fosfolipidele streptomicelelor au capacitatea de a stabili sistemul de apărare antioxidant, fracția de steroli în combinație cu polizaharide și fosfolipide posedă efecte imunostimulatoare și trigliceridele servesc drept substrat energetic [14,25].

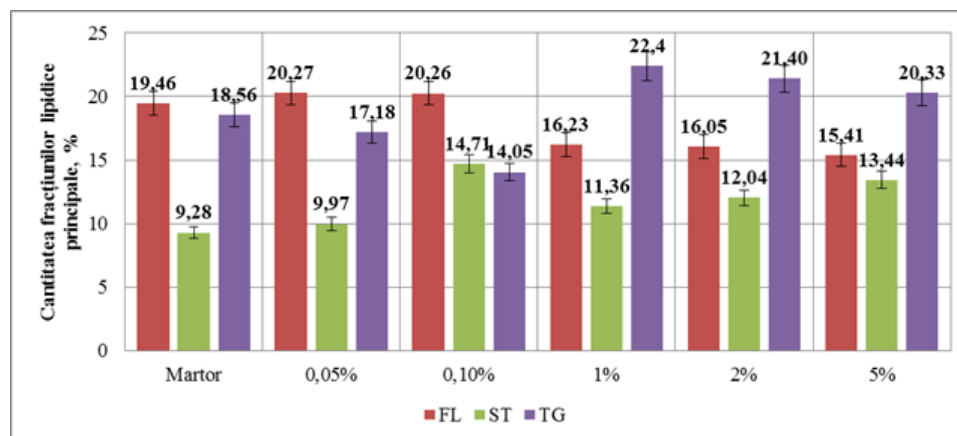


Fig.3. Conținutul fracțiunilor lipidice de bază ale tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 în urma cultivării pe mediul complex R suplimentat cu extractul de aminoacizi și oligopeptide.

Conform datelor din Figura 3, cantitatea maximală de fosfolipide a fost înregistrată în probele de biomasă cultivate pe mediul R suplimentat cu extractul de aminoacizi și oligopeptide într-o concentrație de 0,05%; acestea constituiau 20,3% din totalul lipidelor. Cea mai mare cantitate de steroli în probele de biomasă, obținută prin adăugarea de preparat în concentrație de 0,1%, constituia 14,7%. Cantitatea de trigliceride a fost maximă în probele de biomasă cultivate pe mediul R suplimentate cu 1% de extract de aminoacizi și oligopeptide și constituia 22,4% din totalul lipidelor.

Concluzii

Astfel, studiile au arătat că pentru creșterea productivității de biomasă a tulpinii *Streptomyces fradiae* CNMN-Ac-11 și a conținutului său de fracțiuni lipidice fiziologic active (fosfolipide și steroli) cea mai eficientă este cultivarea tulpinii pe mediu complex R cu adaos de extract de aminoacizi și oligopeptide în concentrație de la 0,1% până la 1%.

Referințe:

1. DEMAİN, A.L., SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. In: *J. Antibiot.*, 2009, no.62(1), p.5-16.
2. CHATER, K.F., BIRO, S., LEE, K.J., PALMER, T., SCHREMPF, H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. In: *FEMS Microbiol. Rev.*, 2010, no.34(2), p.171-198.
3. NOVIKOVA, I.I., SHENIN, Y.D. Isolation and characterization of Antibiotics Produced by *Streptomyces chrysomallus* R-21 and *S. globisporus* L-242 strains. In: *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010, vol.46, no.9, p.41-53.
4. ДАРИЙ, Т.Е., БУРЦЕВА, С.А., МАРАНДИЧ, Е.П., РАСТИМЕШИНА, И.О. Микробные биопрепараты для сохранения гамет сельскохозяйственных животных в Молдове. В: *Тезисы докладов Международной научной конференции «Микробные биотехнологии»*, 11-15 сентября 2006 г., с.49.
5. ПОЛЩУК, Л.В., БАМБУРА, О.І., ЛУК'ЯНЧУК, В.В. Антибіотична активність стрептоміцетів. В: *Мікробіол. ж.*, 2012, т.74, №4, с.45-51.
6. PANCHANATHAN MANIVASAGAN, JUNGHWAN OH. Production of a Novel Fucoidanase for the Green Synthesis of Gold Nanoparticles by *Streptomyces sp.* and Its Cytotoxic Effect on HeLa Cells. In: *Mar. Drugs*, 2015, vol.13, p.6818-6837.
7. CHUAN-HE ZHU, FU-PING LU, YA-NAN HE, JUAN-KUN ZHANG, LIAN-XIANG DU. Statistical optimization of medium components for avilamycin production by *Streptomyces viridochromogenes* 57-1 using response surface methodology. In: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, no.34, p.271-278.
8. JONES, D.J., MOWERY, D.H., ANDERSON, D.B., WELLENREITER, R.H. Effect of various levels of avilamycin on the performance of growing-finishing swine. In: *J. Anita Sci.*, 1987, vol.65, p.881-885.
9. БЕРЕЗОВ, Т.Т., КОРОВКИН, Б.Ф. *Биологическая химия*. Москва: Медицина, 1998. 750 с.
10. КРЕПС, Е.М. *Липиды клеточных мембран*. Москва: Наука, 1981, с.3-18.
11. БЕРГЕЛЬСОН, Л.Д. *Мембраны, молекулы, клетки*. Москва: Наука, 1983. 240 с.
12. СЕВЕРИН, Е.С. *Биологическая химия*. Москва: Медицина, 2000. 729 с.
13. БУРЦЕВА, С.А. *Биологически активные вещества стрептомицетов (биосинтез, свойства, перспективы применения)*: Автореферат диссертации доктора habilitat биологии. Кишинев, 2002. 35 с.
14. КОВАЛЬЧУК, Л.П., ДОНЕЦ, А.Т., БУРЦЕВА, С.А. *Липиды актиномицетов*. Кишинев: Штиинца, 1979. 104 с.
15. БУРЦЕВА, С.А. Эффективность использования микробных биоантиоксидантов в животноводстве и растениеводстве. В: *Биоантиоксидант. Материалы конференции*. Москва, 1998, с.114-115.
16. МИРЗАЕВ, М.Н. и др. Липиды *Streptomyces avetuses*: возможность применения в ветеринарной медицине. В: *Биотехнология*, 2004, №3, с.75-77.
17. RUDIC, V., GUDUMAC, V. *Preparat medicamentos*: brevet MD nr. 545 G2. Publ.: 31.05.1996, BOPI nr. 5/96.
18. DULANEY, EL. Observations on *Streptomyces griseus*. II. Nitrogen Sources for Growth and Streptomycin Production. In: *J. Bacteriol.*, 1948, no.56(3), p.305-313.
19. BURTEVA, S., USATII, A., TODERAȘ, A. Variabilitatea formelor spontane ale tulpinii *Streptomyces sp.* 36 producătoare de substanțe bioactive. În: *Buletinul AȘM. Seria Științe biologice și chimice*, 1996, nr.4, p.27-32.
20. ПОСТОЛАКИЙ, О.М., БУРЦЕВА, С.А. Влияние миллиметрового излучения на рост и липидообразование *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 и его вариантов. В: *Электронная обработка материалов*, 2009, №2 (259), с.93-97.
21. РУДИК, В.Ф. *Биотехнологические основы получения биомассы микроводорослей и перспективы ее применения*: Автореферат диссертации доктора биологических наук. Москва, 1990. 36 с.
22. МУЗАФАРОВ, А.М., ТАУБАЕВ, Т.Т. *Культивирование и применение микроводорослей*. Ташкент: Фан, 1984. 132 с.

23. СПРУНЕ, Я.Я. Эффективность применения хлореллы в животноводстве. В: *VIII Конференция по споровым растениям Средней Азии и Казахстана*. Ташкент: Фан, 1989, с.78-79.
24. LOMTATIDZE, L., SHUKASHVILI, T., ANELI, G., MAMULASHVILI, K. Fatty acids of cell wall lipids of some actinomycetes. In: *Bull. Georg. Acad. Sci.*, 2001, no.1, p.163-164.
25. РАКОВА, Т.Н. *Применение микробных метаболитов в животноводстве*. Кишинев: Штиинца, 1985. 80 с.

Mulțumiri. Autorul este recunoscător academicianului **Valeriu Rudic** și șefului Colecției Naționale de Microorganisme Nematogene **Oleg Chiselita**, doctor în biologie, pentru oferirea extractelor din biomasa cianobacteriei *Arthrospira (Spirulina) platensis* CNMN-CB-02, **Svetlanei Burțeva**, profesor-cercetător, și doctorandului **Maxim Bîrsa** pentru asistență în efectuarea experiențelor și consultație la elaborarea articolului.

Prezentat la 22.02.2017