

6. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. // М. «Наука». МГУ. 2004. 528 с.
7. Завелишко И.А., Николаева С.И. Оценка антибиотической активности мицелиальных грибов в отношении грибных фитопатогенов. // Микробиологический журнал. 1990. т.52. №3. с. 89-91.
8. Коваленко М.Н., Коваленко Т.Д. Триходермин: опыт исследования и применения. // Защита растений. 1992. №9. с. 20-22.
9. Лихачев А.Н., Садыкова В.С. Установление комплекса признаков - тестов по отбору антагонистов для биоконтроля фитопатогенов (на примере грибов рода *Trichoderma*). // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. 2007. вып.16. с.33-47, 228.
10. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений. // М. Агропромиздат. 1987. 224 с.
11. Простакова Ж.Г., Щелко Л.Г., Луцаику Г.А. Патогенная микофлора сои (возбудители и источники устойчивости). // Кишинев. «Штиинца». 1986. 72 с.
12. Рудаков О.Л. Микофильные грибы, их биология и практическое значение. // М. «Наука». 1981. с. 103.
13. Храпцов А.К., Шевчук Е.С., Юркевич А.Ю. Почвенные грибы рода *Trichoderma* – антагонисты вредоносных фитопатогенов. //Тезисы докладов второго съезда микологов «Современная микология в России». 2008. с. 212.
14. Щербакова Т.И. О патогенности некоторых изолятов грибов рода *Fusarium*, выделенных из семян сои. // International Conference of Young Researchers. Chişinău. 2007. 5. p. 91.
15. Comporota A. Antagonisme in vitro de *Trichoderma spp.* vis-a-vis de *Rhizoctonia solani* Kuhn. // Agronomie. 1985. v. 5. p. 613-620.
16. Howell, C. R., Stipanovic, R. D., and Lumsden, R. D. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. // Biocontrol Sci. Technol. 1993. 3. p. 435-440.
17. Şesan T.E., Crişan A. Putregaiul alb al plantelor de cultură *Sclerotinia sclerotiorum* prevenire şi combatere. // Editura ceres. Bucureşti. 1998. 288 p.

INFLUENȚA UNOR FACTORI DE CULTIVARE ASUPRA ACUMULĂRII BIOMASEI ȘI BIOSINTEZEI ERGOSTEROLULUI LA DROJDIA *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS CNMN-Y15*

**Molodoi Elena, Usatîi Agafia, Moldoveanu Taisia,
Chiselița Oleg, Chiselița Natalia**

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Introducere

Îmbogățirea biomasei drojdiilor cu ergosterol (provitamina D₂) în stadiul fermentativ are loc din contul componenței specifice a mediului nutritiv și a condițiilor de cultivare.

Anterior, prin stabilirea exigențelor nutritive, au fost stabilite căile de reglare a sintezei sterolilor la drojdii, în special a nutrienților preferențiali, precursorilor, stimulatorilor [15]. Însă, viteza transformărilor chimice în celule este influențată și de condițiile de cultivare a producătorului.

Din seria de factori importanți pentru cultivarea drojdiilor fac parte temperatura, concentrația ionilor de hidrogen, concentrația oxigenului, componența mediului de nutriție. Modificarea unuia dintre parametri atrage după sine modificarea celorlalți, iar influența asupra proceselor biosintetice este semnificativă.

Celulele de drojdii sunt facultativ aerobe, iar respirația aerobă intensă este o condiție indispensabilă pentru generarea de masă celulară și respectiv, de sinteză a principiilor bioactive [1-2, 5, 11]. Conținutul de steroli suferă schimbări vizibile în urma modificării condițiilor de cultivare. Cercetările au demonstrat, că la o trecere de la condițiile anaerobe la cele aerobe are loc o acumulare bruscă a sterolilor, astfel încât se modifică și corelația fracțiilor acestora: conținutul sterolilor legați (eteri de steroli) în condiții aerobe poate ajunge pînă la 85-90% din suma totală a sterolilor, iar a fracției de steroli liberi doar la 10-15% [12, 16].

Cunoașterea modului în care fiecare factor influențează gradul transformărilor metabolice permite stabilirea principiilor de modelare și optimizare a proceselor de fermentație. Eficientizarea condițiilor optime de cultivare a tulpinii producătoare poate duce la majorarea performanței proceselor biotehnologice.

În acest context scopul cercetărilor a constat în estimarea influenței unor factori de mediu (temperatură, pH, aeratie) asupra acumulării biomasei și biosintezei ergosterolului și stabilirea condițiilor optime de cultivare drojdiei *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

Material și metode

În calitate de obiect de cercetare a servit tulpina de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15, depozitată în CNMN și brevetată ca producător activ de steroli [13].

Inoculul s-a obținut prin cultivarea drojdiei pe must de bere, timp de 24-48h, pe agitatorul rotativ (180-200 rpm.), la temperatura de 25..27°C și s-a utilizat pentru mediile de fermentație în volum de 5%.

Cultivarea s-a realizat submers în baloane Erlenmayer cu capacitate de 1L ce conțineau 0,2 L mediu nutritiv MN-S 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 - 10,0; glucoză - 40,0; acetat de mangan - 0,012; apă potabilă pînă la 1 L.

Pentru stabilirea fazelor optime de acumulare a biomasei și biosintezei ergosterolului, drojdia a fost cultivată pe agitator (200 rpm.), la 25°C, probele fiind prelevate după 24, 48, 72, 96, 120 h de cultivare.

Examinarea influenței regimului termic s-a efectuat utilizând valorile de 15, 25, 30, 35°C, durata de cultivare – 96 h.

Monitorizarea modificărilor pH-ului inițial, a productivității și conținutului de ergosterol, s-a efectuat timp de 120h de cultivare în profunzime, la valorile pH-ului inițial de 3,5; 5,5; 6,5; 8,0 și a temperaturii de cultivare 25°C. S-a utilizat pH-metru portabil WTW 315i.

Influența gradului de aerare s-a investigat aplicând condiții de hipoxie (100 r.p.m.), aerare moderată (200 r.p.m.) și aerare intensivă (300 rpm.). Temperatura de cultivare 25°C, durata de cultivare – 96h. Conținutul de oxigen s-a măsurat cu oximetrul Oxi 315i/SET.

Determinarea productivității drojdiei s-a efectuat fotocolorimetric și gravimetric cu recalculul masei celulare la biomasa absolut uscată conform metodelor clasice [3, 18]. Conținutul de ergosterol s-a determinat gravimetric conform procedeeului nou elaborat în laboratorul Oleobiotehnologie [14].

Rezultate și discuții

Un număr important de cercetări indică faptul, că biosinteza ergosterolului la drojdii depinde de starea fiziologică a culturii [4, 8-9]. În unele surse bibliografice se afirmă, că conținutul de ergosterol crește odată cu îmbătrânirea organismului, atât animal și vegetal cât și microbial [17].

În urma investigațiilor efectuate s-a stabilit, că conținutul de ergosterol crește odată cu prelungirea duratei de cultivare, valoarea cea mai înaltă (13,02% în BAU) fiind obținută după 96 h de cultivare în profunzime. Productivitatea maximală a tulpinii (3,3 g/l BAU) se înregistrează la o durată mai scurtă de cultivare –72 h (fig. 1).

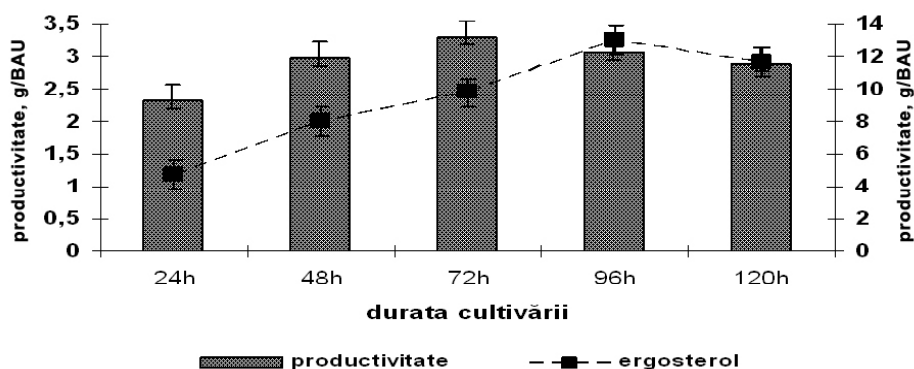


Figura 1. Dinamica productivității și acumulării ergosterolului la cultivarea în profunzime a drojdiei *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

Ca urmare a creșterii exponențiale a culturii, se intensifică procesele de asimilare a substanțelor nutritive necesare pentru multiplicare și dezvoltare, respectiv acumulându-se mai puțini compuși de rezervă. Acumularea tardivă a ergosterolului în faza staționară și declin poate fi explicată prin aceea, că odată cu încetinirea creșterii celulelor se inițiază metabolismul secundar, astfel, se formează metaboliți de tipul lipidelor, sterolilor, acizilor grași, etc.

Un rol important pentru biosinteza ergosterolului la drojdii îl au factorii exogeni: temperatura, aerația, pH-ul [12]. Cercetările au demonstrat, că temperaturile înalte induc represiunea enzimelor de sinteză a acidului mevalonic, iar cele scăzute duc la micșorarea conținutului sumar al sterolilor în celulă [6, 7].

Astfel, din rezultatele obținute s-a constatat, că modificarea regimului termic duce la schimbări importante ale proceselor legate de sinteza ergosterolului (fig. 2).

La temperaturile cuprinse între 15...25°C se observă o accelerare a procesului de biosinteză, care ulterior încetinește, astfel că la 35°C intensitatea acestuia scade aproximativ de 2 ori față de temperatura de 25°C. Conținutul de ergosterol a fost de 13,14g% în BAU și s-a înregistrat pentru regimul termic de 25°C. Creșterea temperaturii până la 35°C a fost însoțită de o micșorare a conținutului de ergosterol în celule (6,19g% BAU) comparativ cu valoarea de 25°C sau 30°C. O creștere a productivității tulpinii (până la 3,31g/l BAU) s-a evidențiat la temperatura de cultivare 30°C.

Experiențele au demonstrat, că cultura de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 posedă capacitate de autoreglare a pH-ului mediului. Astfel, în primele

24 h de cultivare cultura de drojdie modifică pH-ul inițial al mediului spre reacția acidă. În următorul interval de 24-72 h valorile pH-ului practic rămân neschimbate și variază de la 2,45 la 3,15 (fig. 3).

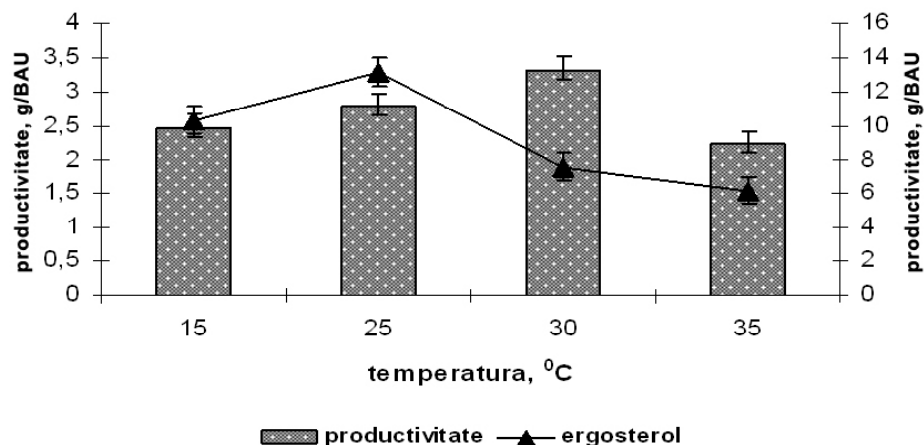


Figura 2. Influența unor valori ale temperaturii asupra productivității și biosintezei ergosterolului la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

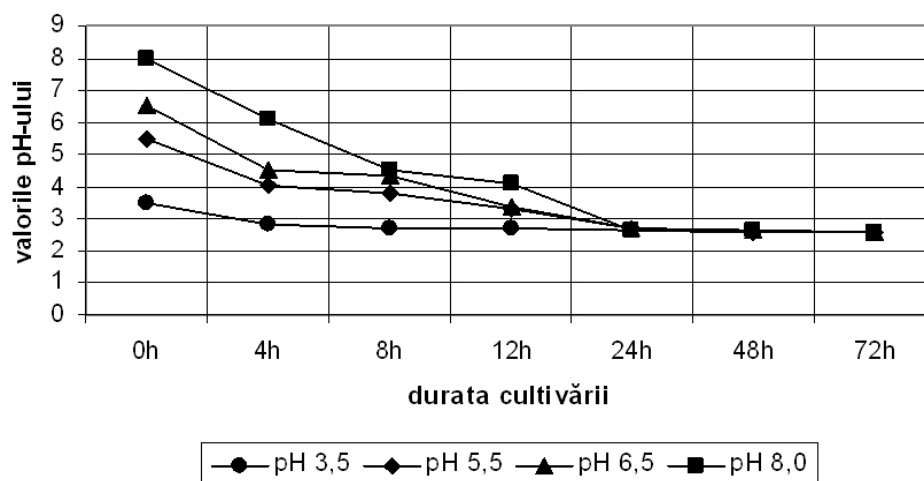


Figura 3. Modificarea pH-ului inițial al mediului nutritiv în dependență de durata cultivării drojdiei *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

Cercetările privind modificarea productivității și biosintezei ergosterolului la cultivarea drojdiei *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 pe medii nutritive cu diferite valori ale pH-ului inițial au demonstrat, că după 24 h de cultivare valoarea pH-ului se stabilizează în toate cazurile studiate. Totuși, productivitatea drojdiei, în variantele mediului de cultură cu pH-ul inițial de 3,5 este destul de scăzută comparativ cu cel neutru sau alcalin (fig. 4). Totodată, conținutul de ergosterol la drojdia cultivată în varianta cu pH-ul inițial de 3,5 crește semnificativ (până la 13,01g% BAU). Cantități mai reduse (8,39 - 10,11g% în BAU) de ergosterol au fost obținute în variantele de cultivare pe mediul nutritiv cu pH inițial de 6,5- 8,0.

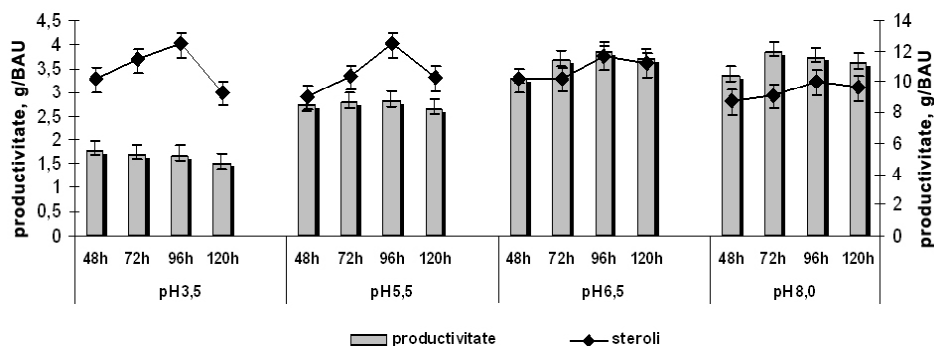


Figura 4. Influența valorii pH-ului mediului de cultivare asupra productivității și biosintezei ergosterolului la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

Rezultatele ne permit să constatăm la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 existența mecanismului de autoreglare a metabolismului prin modificarea pH-ului mediului. Mecanismul influenței pH-ului asupra celulei drojdiei, poate fi explicat prin modificarea permeabilității peretelui celular, acțiunea pH-ului asupra componentelor mediului, stării de oxido-reducere a mediului, constantei echilibrului chimic în celulă [10].

Unul din procedeele pe larg utilizate de sporire a conținutului de principii bioactive la drojdiile este menținerea unor valori înalte de oxigen [7-8]. În lipsa acestuia, în celulă se acumulează predecesorul aciclic – squalenul. S-a constatat, că oxigenul este necesar la etapa epoxidării squalenului și a sistemelor enzimatiche monooxigenazice, care participă în dimetilarea și hidrarea predecesorilor ciclici [19]. La trecerea de la condițiile aerobe la cele anaerobe se modifică particularitățile biochimice și funcționale ale celulei. Cultivarea drojdiilor în condiții de aerare intensivă, de obicei, duce la apariția celulelor de tip respirator, iar la cultivare în condiții anaerobe prevalează celule restructurate. Prin menținerea aerării sporite, unii cercetători au majorat conținutul sterolilor de aproximativ 3 ori.

Din datele prezentate în fig. 5 se observă, că gradul de aerare în primele 4 h de dezvoltare practic nu influențează multiplicarea. Odată cu trecerea culturii în faza logaritmică de dezvoltare (24 -72h) procesele de multiplicare a drojdiei în condițiile de aerare intensă sporesc semnificativ, comparativ cu cele de hipoxie.

Cercetările de stabilire a influenței gradului de aerare asupra productivității și biosintezei ergosterolului la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 au demonstrat, că după 96 h, maximum de biomasă (3,11g/L BAU) și a conținutului de ergosterol (13,6g% în BAU) s-au obținut la cultivarea în condiții de aerare intensivă (200-300 rpm.), concentrația de oxigen s-a aflat în limitele 7,7...8,4 mg/L (fig. 6).

Astfel, în rezultatul cercetărilor au fost optimizate condițiile pentru cultivarea dirijată a tulpinii *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 și sporit conținutul de ergosterol în biomasă.

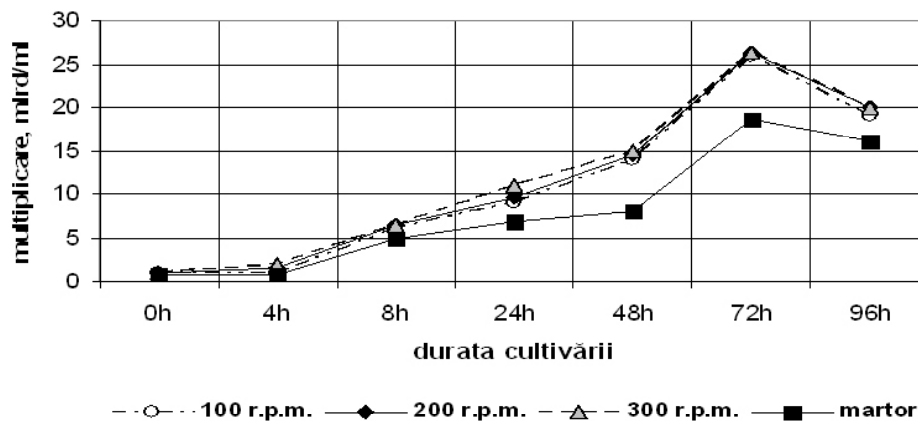


Figura 5. Influența gradului de aerare asupra multiplicării culturii de drojzii *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

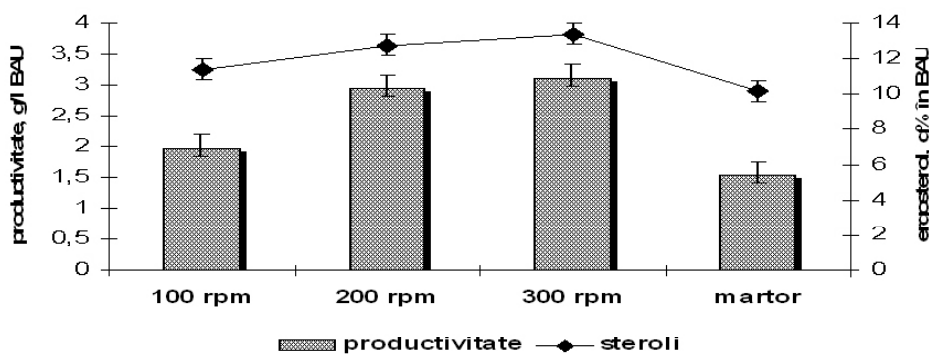


Figura 6. Influența gradului de aerare asupra productivității și biosintezei ergosterolului la drojdie.

În baza experiențelor realizate au fost elaborate 2 procedee eficiente de sporire a productivității drojdiei și sinteză orientată a ergosterolului:

Procedeu de sporire a productivității drojdiei. Procesul de cultivare decurge cu respectarea următorilor parametri:

- Temperatura mediului în timpul procesului de cultivare - 30°C;
- pH mediului - 5,5...6,5;
- Debitul oxigenului 7,7...8,4 mg/L;
- Durata procesului de cultivare 72h;

Acest procedeu permite de a obține până la 8,0...8,3 g/L biomasă absolut uscată.

Procedeu de sinteză orientată a ergosterolului la drojdie. Procesul de cultivare decurge cu respectarea următorilor parametri:

- Temperatura mediului în timpul procesului de cultivare - 25°C;
- pH mediului - 3,5...5,5;
- Debitul oxigenului 7,7...8,4 mg/L;
- Durata procesului de cultivare 96 h;

Procedeu elaborat permite de a spori cantitatea de ergosterol până la 12,7...13,3g% în biomasa absolut uscată.

Concluzii

Factorii de mediu (temperatura, pH-ul, gradul de aerație) exercită un efect de reglare diferențiat asupra proceselor de multiplicare și biosinteză a ergosterolului la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

Masa celulară maximală s-a obținut după 72 h cultivare în profunzime, la un regim termic de 30°C, pH 5,5-6,5, în condițiile debitului de oxigen 7,7-8,4mg/L.

Conținutul de ergosterol în biomasă crește odată cu prelungirea duratei de cultivare. Efectul stimulator maximal asupra sintezei ergosterolului revine condițiilor de cultivare: temperatura de 25°C, pH 3,5-5,5, oxigen 7,7-8,4mg/L, 96h cultivare în profunzime.

Bibliografie

1. Aittoniemi J., Rog T., Niemela P. et al. Major factor in sterols' ordering capability in membranes. // J. Phys. Chem. B Lett., 2006, vol. 110(51), p. 25562-25564.
2. Alcazar-Fuoli L., Mellado E., Garcia-Effron G. et al. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. // Steroids, 2008, vol. 73, p. 339-347.
3. Anghel I., Voica C., Toma N., Cojocar I. Biologia și tehnologia drojdiilor. București: Editura Tehnică, 1991, vol. 2, 385 p.
4. Arnezeder C., Hampel W. Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast-cells. // Biotechnol. Lett., 1990, vol. 12, p. 277-282.
5. Bui K., Garly P., Spencer F., Spencer M. Yeast technology. // Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1990, p. 241-265.
6. Casey W., Keesler G., Parks L. Regulation of partitioned sterol biosynthesis in *Saccharomyces* yeasts. // J. Bacteriol., 1992, vol. 174(22), p. 7283-7288.
7. Charoenchai C., Fleet G., Henschke P. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth rates and cells biomass of wine yeasts. // Am. J. of Enol. and Viticul., 1998, vol. 49, p. 283-288.
8. Gao, H., Tan, T. Fed-batch fermentation for ergosterol production. // Process. Biochemistry, 2003, vol. 39(3), p. 345-350.
9. He X., Huai W. et al. Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. // J. of Industr. Microbiol. and Biotechnol., 2000, vol. 25, p. 39-44.
10. Jones R., Gadd G. Ionic nutrition of yeast-physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. // Enzyme Microb. Technol., 1990, vol. 12(6), p. 402-418.
11. Kennedy A., Taidi B., Dolan J., Hodgson J. Optimisation of a fully defined medium for yeast fermentation studies. // Food Technol. Biotechnol., 1997, vol. 35, p. 261-265.
12. Shobayashi M., Mitsueda S., Ago M., Fuji T. et al. Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. // Biosci. Biotechnol. Biochem., 2005, vol. 69(12), p. 2381-2388.
13. 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.
14. Usatîi A., Chirița E., Molodoi E., Moldoveanu T., Cucu T., Borisov T. Procedeu de obținere a ergosterolului din drojdia *Saccharomyces*. Brevet de Invenție Nr.3570/MD – BOPI, 2008, Nr.4, p.41-42.
15. Usatîi A., Molodoi E., Moldoveanu T., Borisov T., Chiselița N. Elaborarea mediilor de cultură pentru *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 producător de steroli. // Conferința șt. naț. cu particip. internaț. Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei 5-6 octombrie 2009, Chișinău, R. Moldova, p. 179-181.
16. Zhang B., He X., Tie C., Liu Y. The construction of high ergosterol-production strains and study of optimal conditions for culture. // Chinese J. of Biotechnology, 1999, vol. 15(1), p. 46-51.
17. Гальцова П. Стеринообразование у дрожжевых организмов. М.: Наука, 1980, 224 с.
18. Руководство к практическим занятиям по микробиологии/Под ред. Егорова Н.С. Москва: Изд-во МГУ, 1995, 224 с.
19. Синуцкая Н., Огородникова Т., Михайлова Н. Микробиологический синтез стерина. // Прикл. Биохим. и Микробиол., 1993, Т. 29, с. 675-683.