

DROJDIILE DIN GENUL *SACCHAROMYCES* SURSE DE PERSPECTIVĂ PENTRU OBTINEREA ERGOSTEROLULUI

Autori: Elena MOLODOI, Agafia USATÎI, Nadejda EFREMOVA, Elena CHIRIȚA, Ludmila FULGA

Conducători: dr. Elena MOLODOI, dr. hab. prof. cercet. Agafia USATÎI, conf. univ. dr. Elena CHIRIȚA

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

Ideea principală: În lucrare sunt prezentate studiile morfologice, fiziologice, culturale ale tulpinilor de drojdie producători de ergosterol (provitamina D).

Cuvinte cheie: Drojdii, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, lipide, steroli, ergosterol, vitamina D, medii nutritive.

Pentru prima dată, ergosterolul ($C_{28}H_{44}O$) a fost extras din corn-de-secară în 1889 de către Tanret, mai apoi de Gerard (1895) în ciuperci, iar Nageli a descoperit că cea mai mare cantitate de steroli se află în drojdiile, specific fiind ergosterolul. Alți steroli, care sunt prezenți în celulele drojdiilor, alcătuiesc doar o cantitate infimă al acestora. Drojdiile, în prezent, reprezintă sursa principală pentru obținerea ergosterolului comercial [17]. Toți sterolii se deosebesc între ei prin lungimea catenei laterale sau după gradul de saturare. Din această diversitate de steroli, un loc deosebit după importanța sa, îl deține ergosterolul drojdiilor.

Ergosterolul prezintă interes nu numai ca materie primă pentru obținerea vitaminei D antirahitice, dar și ca compus, care joacă un rol important în organizarea structurală a celulei, formând împreună cu proteinele și glucidele complecși care intră în compoziția protoplasmei și membranelor celulare [2]. Drojdiile, reprezintă prin sine obiecte de perspectivă în ceea ce privește biosinteza sterolilor, în special ergosterol. Importanța practică a ergosterolului se determină prin capacitatea lui de a se transforma în vitamina D_2 la iradiere cu ultraviolete, pe de o parte, și pe alta ca sursă pentru sinteza hormonilor steroizi. Vitamina D_2 își găsește aplicarea practică în medicină ca remediu contra rahitismului, osteomalaciei, pentru produsele alimentare vitaminizate (produse lactate, produse de panificație), de asemenea pentru îngrășarea porcinelor și vitelor [10,16].

Ergosterolul din tot grupul de steroli de origine microbiană este cea mai accesibilă materie primă pentru sinteza preparatelor steroide, numeroșilor compuși cu activitate D-vitaminică sau hormonală. Cele mai recente studii biomedicale, confirmă oportunitatea includerii ergosterolului în compoziția unor remedii medicamentoase noi cu potențiale efecte anti-cancerigene, anti-leucemice, imunomodulatoare, anti-sclerotice, hematopoetice, de menținere a homeostazei celulare, precum și destinate prevenirii unor afecțiuni de ordin endocrin și reproductiv [18].

Extinderea domeniilor de aplicare a diferitor preparate steroide impune nu numai de a majora eficacitatea tehnologiei producerii lor, dar și de a găsi noi surse de materie primă. În ultimii ani tot mai multă atenție se acordă microorganismelor ca surse potențiale de steroli [9,12]. Acest fapt se explică printr-un șir de avantaje, pe care le posedă sinteza microbiană a sterolilor, comparativ cu procedeele de obținere din materia primă de origine vegetală sau animală. Cunoașterea mecanismelor de biosinteză a sterolilor la microorganisme dă posibilitate de a intensifica procesul producerii lor pe cale biotehnologică.

Microorganismele eucariote, și în deosebi drojdiile, dețin cel mai impunător procent în steroli. Componentul de bază a fracțiilor sterolice la drojdiile îl reprezintă ergosterolul (provitamina D_2). Conținutul acestuia variază în limitele 60-90% din totalul sterolilor celulei [2,15]. În prezent, drojdiile genului *Saccharomyces* reprezintă sursa principală pentru obținerea ergosterolului comercial [3].

După cum se cunoaște, iradierea ergosterolului cu raze ultraviolete duce la formarea vitaminei D_2 (ergocalciferol) [1]: **ergosterol – lumisterol₂ – tahisterol₂ – vitamina D_2 - suprasterol₂**

Prezența acestei vitamine în organism este benefică, în sensul că previne instalarea osteomalaciei și osteoporozei senile, apariția unor tulburări nervoase, slăbiciune generală, sensibilitatea la unele boli infecțioase, contribuie la buna funcționare a glandei tiroide, paratiroidei și hipofizei. Vitamina D este indicată în cazurile de tratare a rahitismului la copii, în reumatism, tetanie, graviditate și alăptare, consolidarea fracturilor, fragilitate a oaselor și dinților, crampe musculare etc. [11,13,14].

Producția ergosterolului este organizată la nivel industrial în diverse țări ale lumii [18]. Tradițional ergosterolul este obținut din biomasa drojdiilor de panificație și celor de bere. Mai rar este utilizată biomasa ciupercilor cu miceliu – deșuri de la producția acizilor organici și antibiotice. Pe baza ergosterolului este posibil de a sintetiza numeroși compuși, inclusiv și cei cu activitate D-vitaminică și hormonală. Manipulările sistematice, care permit efectuarea acestor transformări, se deosebesc în dependență de structura produsului integrat.

În R. Moldova sunt mai multe surse de obținere a ergosterolului, dar cele mai frecvent utilizate sunt tulpinile genului *Saccharomyces* fiind producători performanți de steroli, în special ergosterol. În continuare au fost examinate caracterele morfo-culturale și fiziologo-biochimice a tulpinii de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* (fig.1.) și *Saccharomyces cerevisiae* (fig.2.). Drojdiile *Saccharomyces* prezintă celule de formă variată – rotundă, ovale, alungite, cilindrice, care uneori formează pseudomicelii.

Originea tulpinii. Tulpina de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15, a fost izolată în cultură pură din drojdiile de bere comercializate, prin pasaje pe mediul lichid (must de malț) și agarizat (malț-agar), în cadrul laboratorului Oleobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al A.Ș.M. (fig. 1.).



Figura 1. Aspectul coloniilor drojdiilor *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 pe mediu agarizat (a) și mediu lichid (b)

Caracterele morfologice și culturale. Tulpina de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 se prezintă sub forma unor celule cilindrice, elipsoidale, dispuse izolat sau în perechi și ocazional formează aglomerări. Mărimea celulelor constituie 5-10 μ în diametru. Se înmulțesc pe cale vegetativă prin înmugurire multilaterală și sexuat prin spori, formează asce persistente, direct din celula diploidă. Uneori poate forma pseudohife (pseudomiceliu). Tipul respirației – aerob; nepatogenă. În mediul lichid formează sediment și uneori un inel incomplet.

Caracterele fiziologo-biochimice. Fermentație +; nitrat - ; urează - ; DBB - ; nu formează peliculă. Drojdiile din acest gen metabolizează glucoza, zaharoza, melibioza (un caracter distinctiv între drojdiile de bere și cele de panificație), manoza, maltoza, mai slab arabinoza și ramnoza, nu asimilează lactoza. *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 suportă bine aciditatea, pH-ul optim fiind de 4,5-5,5; se dezvoltă bine la temperatura între +25-27⁰C. În laborator pot fi cultivate la +25-27⁰C, pe must de malț (7%) și mediu nutritiv, care conține (g/l): peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie – 10,0 ml [5] și/sau (g/l): glucoză – 30,0; (NH₄)₂SO₄ – 3,0; MgSO₄*7H₂O – 0,7; NaCl – 0,5; Ca(NO₃)₂ – 0,4; KH₂PO₄ – 1,0; autolizat de drojdie – 10 ml [193]. La cultivare timp de 72 ore pe mediile date, tulpina acumulează în medie 3,35-5,23 g/l biomasă uscată, sintetizează până la 18,08-18,85% lipide și 3,88-3,92% steroli în biomasa uscată.

Originea tulpinii. Tulpina de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-16, a fost izolată în cultură pură din drojdiile de panificație comercializate, prin însămânțare în mai multe etape, pe mediul lichid (must-

de-malț) și agarizat (malț-agar), în cadrul laboratorului Oleobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al A.Ș.M. (fig. 2.).

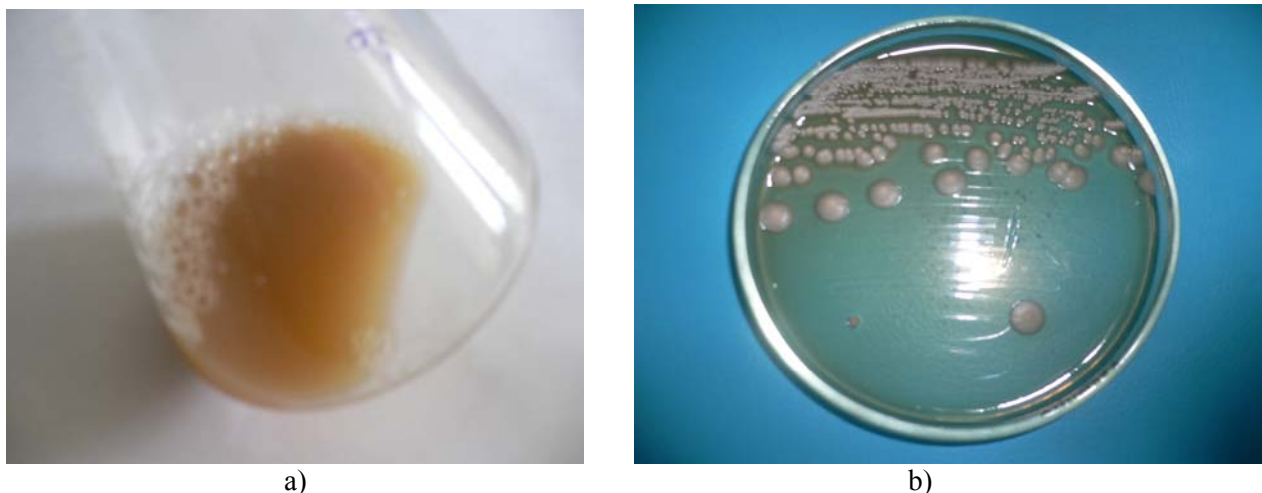


Figura 2. Aspectul coloniilor drojdiilor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-16 pe mediu lichid (a) și mediu agarizat (b)

Caracterile morfologice și culturale. Tulpina de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-16 se prezintă sub forma unor celule sferice, elipsoidale, alungite, dispuse izolat sau în perechi și ocazional formează lanțuri și aglomerări. Mărimea celulelor variază de la 3-8 μ în lățime și 5-12 μ în lungime. Se înmulțesc pe cale vegetativă prin înmugurire multilaterală și sexuat prin spori. În condiții naturale, celula diploidă se transformă în urma diviziunii meiotice într-o ască cu patru ascospori. Tipul respirației – aerob; nepatogenă. În mediul lichid formează sediment și uneori un inel incomplet.

Caracterile fiziologo-biochimice. Fermentație +; nitrat -; urează -; DBB -; nu formează peliculă. Drojdiile din acest tip metabolizează un spectru larg de glucide (monozaharide – glucoza, xiloza, arabinoza, rafinoza; dizaharide – maltoza, zaharoza, lactoza; alcoolii – manitol, sorbitol). Tulpina de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-16 suportă bine aciditatea, pH-ul optim fiind de 5,0-5,5; se dezvoltă optim la temperatura +28-30 $^{\circ}$ C. În laborator pot fi cultivate la t $^{\circ}$ +28-30 $^{\circ}$ C, pe must de malț (7%) și mediu nutritiv, care conține (%): extract de drojdie - 1,0 peptonă – 2,0, glucoză – 2,0, apă potabilă – 1000 ml [8]. La cultivare timp de 48 ore pe mediul dat tulpina acumulează în medie 8,2g/l biomasă uscată, sintetizează 9,0...15,45% lipide și până la 3,38% steroli în biomasă uscată.

Extragerea ergosterolului din biomasă drojdiilor a fost efectuată conform [5] și metoda adoptată de [Br. Inv. nr. 3570], în cadrul laboratorului Oleobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al A.Ș.M. Invenția se referă la tulpinile de microorganisme producătoare de substanțe biologice active, și anume la o tulpină de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 care poate fi utilizată pentru obținerea sterolilor, în special a ergosterolului-precursor al vitaminei D $_2$ [6].

Tulpina de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis*, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Republicii Moldova cu cifrul CNMN-Y-15, posedă proprietatea de biosinteză a sterolilor. În prezent cercetările științifice în acest domeniu sunt inițiate în cadrul Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al A.Ș.M., Laboratorul „Oleobiotehnologie”, sub conducerea dr. hab. biol., prof. A. Usatîi.

În stare pură vitamina D $_2$ prezintă cristale incolore, fără miros, instabile la acțiunea luminii și oxigenului din aer, insolubile în apă, solubile în solvenți organici și uleiuri vegetale, p.t.=115-118 $^{\circ}$ C, $[\alpha]_D^{20}$ = +79,5 $^{\circ}$ pînă la +83,5 $^{\circ}$ (soluție acetonică 1,6%). Pentru identificarea ergocalciferolului ca reactiv se folosește soluția cloroformică de SbCl $_3$. Această reacție se folosește și pentru determinarea cantitativă a ergocalciferolului prin metoda fotoelectrocolorimetrică.

Ergocalciferolul (vitamina D $_2$) se prepară în industria farmaceutică sub formă de:

1. Drajeuri de ergocalciferol 500 UI.
2. Soluție uleioasă de ergocalciferol în capsule 500 sau 1000 UI.
3. Soluție uleioasă de ergocalciferol 0,0625%, 0,125% sau 0,5%.

4. Soluție alcoolică de ergocalciferol 0,5%.

De menționat, că în R. Moldova producerea microbiologică a ergosterolului nu este dezvoltată, iar preparatele solicitate în medicină, cosmetologie, precum și în ramurile agrare crescătoare de animale și păsări, sunt importate la un preț destul de înalt, ceea ce ne-a determinat de a iniția cercetări de evidențiere a surselor competitive de steroli pe piața națională [4].

Rezultatele cercetărilor destinate selectării tulpinii de drojdie – producător activ de steroli, concretizării concentrațiilor optime a surselor de carbon, precursorilor, inductorilor specifici, stabilirii regimului optic de aplicare a undelor milimetrice de intensitate joasă, precum și perfecționării tehnicilor de extragere a sterolilor din biomasa levuriană, au servit drept reper pentru elaborarea procedurilor de sinteză orientată a sterolilor care sunt incluse în tehnologiile noi de obținere a produselor D-vitaminice.

Bibliografie

1. Babilev F. *Chimie Farmaceutică* // Chișinău, editura Universitas, 1994, pag. 264-269.
2. Гальцова Р.Д. //Стеринообразование у дрожжевых организмов. М.: Наука, 1980, 224 с.
3. Деев С.В., Буторова И.А., Авчиева П.Б. *Синтез и выделение эргостерина при использовании в качестве продуцента гриба *Blakeslea trispora**. Биотехнология, 2001, nr.4, с. 22-31.
4. Molodoi E., *Biotehnologii de cultivare și de obținere a preparatelor serolice*/Autoreferat al tezei de doctor în biologie.Chișinău 2009.23p.
5. Usatfi 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.
6. Usatfi 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.
7. Лукникий Ф., Аксевич А., Высоцкий Л. *Способ получения эргостерина*. Патент RU 2 080 389, 25.07.1997
8. Anghel I., Sassu T., Segal B., Berzescu P., et. al. *Biologia și tehnologia drojdiilor*. Vol.2. București: Editura Tehnică, 1991.- p. 385.
9. <http://www.biengi.ac.ru>
10. <http://www.chemlister.boom.ru>
11. <http://www.doctor.info.ro>
12. <http://www.ecolife.ro>
13. <http://www.evenimentul.ro>
14. <http://www.formula.ro/reviste>
15. <http://www.xumuk.ru/biologhim>
16. <http://www.wikipedia.org/wiki/sterol>
17. <http://www.tratamente-naturiste.ro>
18. <http://www.xumuk.ru/biologhim>.