

**EFECTELE UNDELOR MILIMETRICE DE INTENSITATE JOASĂ
ASUPRA BIOSINTEZEI LIPIDELOR LA DROJDIA
SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS CNMN-Y-15**

Agafia USATÎI, Elena MOLODOI, Anatol ROTARU, Lilia TOPALĂ

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

The influence of the low intensity milimetric waves on the biosynthetic abilities of the *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 strains was investigated. The influence of the milimetric waves on the yeast productivity, quantitative and qualitative content of the lipids was also investigated along with the relationship between the biological effect and the treatment period. The stimulatory effect of the milimetric waves on the phospholipids, sterols and glycerides synthesis was distinguished.

Introducere

Importanță teoretică și practică deosebită prezintă studierea sensibilității diferitelor componente ale membranei celulare a drojdiei la acțiunea undelor milimetrice de intensitate joasă. Unii autori indică acțiunea ne-univocă a undelor milimetrice de intensitate joasă asupra stării funcționale a celulei, în special a proceselor biosintetice. Puțin sunt studiate efectele undelor milimetrice de intensitate joasă asupra activității funcționale a membranei celulare la drojdii, în special asupra fazei lipidice.

Acțiunea undelor milimetrice asupra mediilor biologice este studiată și în instituțiile de cercetări științifice din Moldova. În cadrul Programului de stat „Noi metode de diagnostică și tratament direcționate în baza radiației milimetrice coerente asupra obiectelor medico-biologice” (conducător acad. D.Ghițu) sunt efectuate cercetări importante ale interacțiunii câmpului electromagnetic cu organismele vii și este un obiectiv central al cercetărilor din diverse sfere: medicină, biologie, inginerie etc. Rezultatele obținute sunt importante prin formularea unor teorii, legități, elucidarea unor efecte ale acțiunii câmpului magnetic milimetric [1-4].

Astfel, studiul analitic al literaturii de specialitate a permis de a evidenția importanța aplicării undelor milimetrice de intensitate joasă în biotehnologia cultivării microorganismelor. În special, este oportun de a acumula date noi privitor la particularitățile de acțiune a undelor milimetrice, la fundamentarea unor principii ale interacțiunii câmpului electromagnetic cu organismele vii, la elaborarea procedeele de sinteză orientată a substanțelor bioactive, la soluționarea problemelor de sporire a capacității biosintetice a microorganismelor.

Lipidele prezintă o clasă importantă de compuși organici, care în ansamblu cu alte fracții mențin funcționalitatea membranelor celulare. Proprietățile lipidelor membranare depind, în mare măsură, de conținutul fracțiilor din componența lor, în special ale conținutului de steroli, acizi grași, fosfolipide, gliceride.

Prin utilizarea undelor milimetrice de intensitate joasă, ca factor de reglare a biosintezei principiilor bioactive în celula microbiană, putem obține o cantitate mai mare de compuși, solicitați în diverse ramuri ale economiei naționale, în medicină, farmaceutică, industria cosmetică etc.

Scopul cercetărilor noastre a constat în elucidarea efectelor undelor milimetrice de intensitate joasă asupra biosintezei lipidelor comune, în special a sterolilor și acizilor grași, ale căror rezultate pot servi ca bază pentru elaborarea strategiei de utilizare a undelor milimetrice de intensitate joasă în oleobiotehnologie.

Material și metode

Ca obiect de cercetare a servit tulpina de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15, producător activ de steroli [5]. Tratării cu unde milimetrice vor fi supuse culturile de drojdie, crescute pe cutii Petri cu malț-agar, la $t^{\circ} +27...28^{\circ}\text{C}$ timp de 24 h.

Ca generator de unde milimetrice de intensitate joasă a servit dispozitivul „Iavi-1”, ce emite unde cu $\lambda=5,6$ mm. (valorile iradierii mai joase de 10 mW/cm^2), în regim continuu și periodic (raport corelativ 5:4), oferit cu multă amabilitate de Dumitru Ghițu, academician. Durata tratării va varia în dependență de scopul experimentelor în limitele 5, 10, 15, 20, 30 minute.

Cultivarea s-a realizat submers în baloane Erlenmayer cu capacitate de 1 l ce conține 0,2 l mediu nutritiv cu următoarea compoziție (g/l): peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie – 10 ml; apă potabilă – 1000 ml [6].

Probele au fost cultivate pe agitator rotativ (180-200 rot/min), la temperatura de $+ 27...28^{\circ}\text{C}$ timp de 3 zile. Determinarea productivității drojdiilor s-a efectuat gravimetric prin separarea biomasei de lichidul cultural prin centrifugare [7].

Extragerea lipidelor din biomasă și determinarea cantitativă de lipide s-a efectuat conform metodei Bligh, Dyer [8] și procedeeului nou în modifi cația noastră [9].

Determinarea componenței calitative și cantitative a lipidelor s-a efectuat prin cromatografierea în strat subțire și densitometrie [10-11].

Determinarea conținutului de steroli s-a efectuat conform procedeeului specificat în [12].

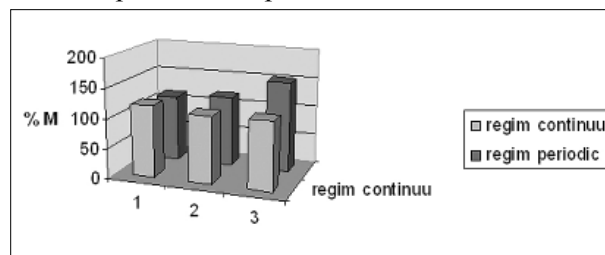
Componența și conținutul acizilor grași s-a determinat prin cromatografierea gaz lichidă a esterilor metil după metoda Sineak [13].

Rezultate și discuții

Efectele biologice de bază ale acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă au fost cercetate în dependență de regimul și durata de emiter.

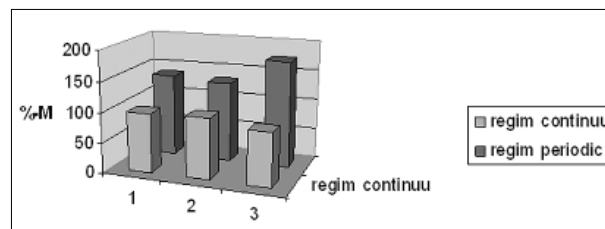
Criteriile de evaluare a stării fiziologice a culturii iradiate cu unde milimetrice de intensitate joasă au fost modificările în membrana celulară, în special a fazei lipide, conținutului de steroli, acizi grași, fosfolipide, gliceride.

Experimentele privind studiul influenței regimului de emiter a undelor milimetrice de intensitate joasă au demonstrat că regimul continuu nu influențează semnificativ biosinteza componentelor lipidice de către drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-1. O stimulare a procesului de biosinteză a lipidelor comune și a fracției sterolice (provitamina D) s-a evidențiat la iradierea culturii în regim periodic timp de 20 de minute. În experimentele date conținutul de lipide depășește martorul cu 53% (Fig.1) și a sterolilor cu 52,8% (Fig.2). Aceste rezultate indică la oportunitatea utilizării regimului periodic în realizarea efectelor biologice, în special asupra proceselor de biosinteză a componentelor lipidice.



Durata iradierii: 1 – 5 min.; 2 – 15 min.; 3 – 20 min.

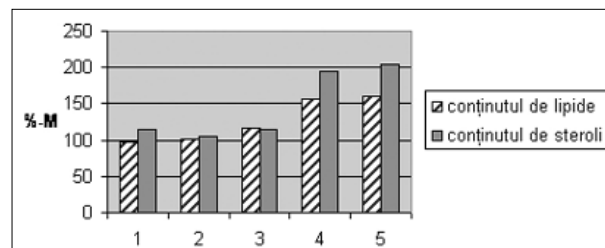
Fig.1. Influența undelor milimetrice de intensitate joasă asupra conținutului de lipide comune la *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 în funcție de regimul de emiter.



Durata iradierii: 1 – 5 min.; 2 – 15 min.; 3 – 20 min.

Fig.2. Influența undelor milimetrice de intensitate joasă asupra conținutului de steroli la *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 în funcție de regimul de emiter.

În literatura de specialitate se menționează că efectele undelor milimetrice de intensitate joasă asupra proceselor biosintetice sunt în dependență de **durata aplicării** asupra obiectului biologic și există o dependență efect biologic – durata de emiter. Rezultatele obținute de noi în experiențele cu drojdia de bere tratată cu unde milimetrice timp de 5, 10, 15, 20, 30 minute confirmă acest fapt. Analiza materialelor privitor la conținutul de lipide și steroli în biomasa drojdiei la cultivare în profunzime denotă că tratarea timp de 5-15 minute nu modifică substanțial procesul de biosinteză a lipidelor și sterolilor. Durata optimă de aplicare a undelor milimetrice de intensitate joasă constituie 20-30 minute, condiții în care maximul procentual constituie 57,5 – 60% (pentru lipide) și 94,4 – 04,0% (pentru steroli) (Fig.3).



Durata iradierii: 1 – 5 min.; 2 – 10 min.; 3 – 15 min.; 4 – 20 min.; 5 – 30 min.

Fig.3. Influența undelor milimetrice de intensitate joasă (regim periodic) asupra conținutului de lipide comune și steroli la *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 în funcție de durata de emiter.

Studiul influenței undelor milimetrice de intensitate joasă asupra conținutului de acizi grași a evidențiat că iradierea drojdiei timp de 10–20 minute induce unele modificări. În special, iradierea drojdiei timp de 10–20 minute stimulează biosinteza acizilor grași nesaturați cu 59,7%, respectiv, 44,7% față de martorul neiradiat (Fig.4). Coeficientul de saturație (C_{sat}) al acizilor grași se micșorează substanțial – de la 0,158 (martorul neiradiat) la 0,104 (iradierea timp de 10 minute) și 0,08 (iradierea timp de 20 minute). Lipidele cu coeficient mic de saturație a acizilor grași sunt solicitate în industria farmaceutică pentru pregătirea diferitelor remedii medicamentoase, în cosmetologie – pentru prepararea diferitelor creme, producerea șampoanelor etc.

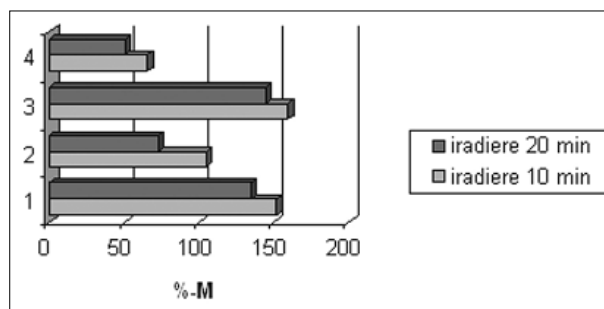
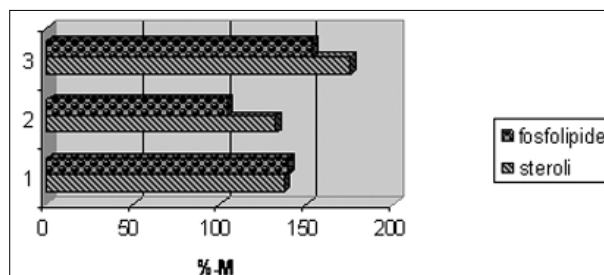


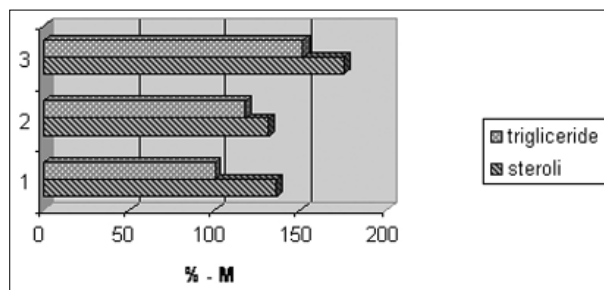
Fig.4. Conținutul acizilor grași la *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 sub acțiunea undelor milimetrice de intensitate joasă emise în regim periodic: 1 – suma acizilor grași; 2 – suma acizilor grași saturați; 3 – suma acizilor grași nesaturați; 4 – coeficientul de saturație.

Ulterior au fost cercetate interlegăturile de biosinteză a sterolilor cu alte componente fracționare ale lipidelor sintetizate de drojdia de bere sub acțiunea undelor milimetrice. S-a constatat că conținutul de steroli este superior față de fosfolipide și trigliceride (Fig.5,6).



Durata iradierii: 1 – 5 min.; 2 – 15 min.; 3 – 20 min.

Fig.5. Conținutul procentual al sterolilor și fosfolipidelor la *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 sub acțiunea undelor milimetrice de intensitate joasă emise în regim periodic.



Durata iradierii: 1 – 5 min.; 2 – 15 min.; 3 – 20 min.

Fig.6. Conținutul procentual al sterolilor și trigliceridelor la *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 sub acțiunea undelor milimetrice de intensitate joasă emise în regim periodic.

Rezultatele obținute au fost folosite pentru elaborarea a 2 procedee de sporire a conținutului de lipide și steroli la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 cu utilizarea în calitate de factor stimulator a undelor milimetrice de intensitate joasă (Fig.7).

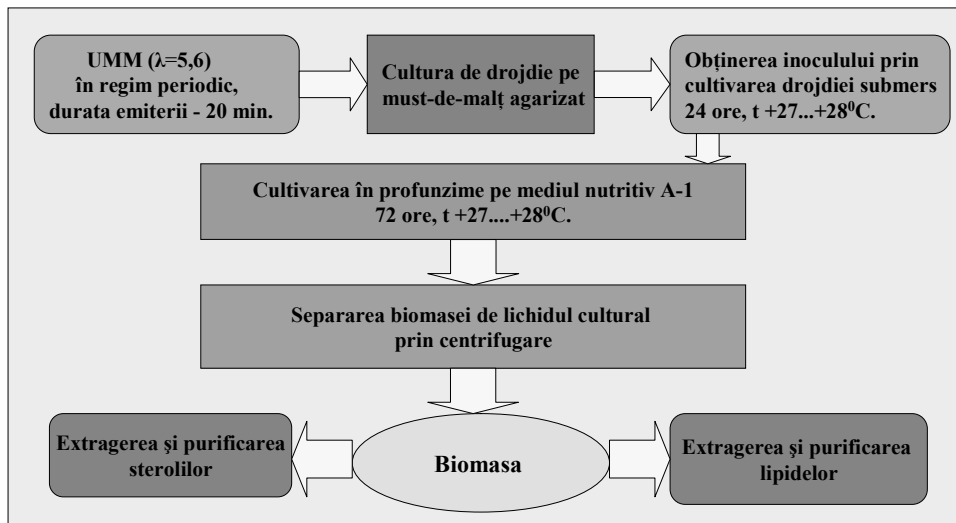


Fig.7. Schema realizării procedurii de sinteză orientată a lipidelor și sterolilor la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

Procedul de sinteză orientată a lipidelor

Constă în tratarea culturii de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15, crescută timp de 24 ore pe cutii Petri cu mălț-agar, cu unde milimetrice de intensitate joasă ($\lambda = 5,6$ nm), emise în regim periodic, timp de 20 de minute. Ulterior, materialul iradiat se inoculează în baloane Erlenmayer cu 0,1 l must de bere și se cultivă 24 de ore la temperatura de + 27...28°C. Inoculul în concentrație de 5% în bază volumetrică se transferă în baloane Erlenmayer cu 0,2 l mediu nutritiv, g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie – 10 ml; apă potabilă – 1000 ml. Cultivarea drojdiei se efectuează submers, pe agitator rotativ cu 180-200 rot/min., la temperatura de + 27-28°C, timp de 3 zile.

Avantajul procedurii constă în sporirea conținutului de lipide cu 53...57% față de martorul neiradiat.

Procedul de sinteză orientată a sterolilor

Constă în tratarea culturii de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15, crescută timp de 24 de ore pe cutii Petri cu mălț-agar, cu unde milimetrice de intensitate joasă ($\lambda = 5,6$ nm), emise în regim periodic, timp de 20 sau 30 de minute. Ulterior, materialul iradiat se inoculează în baloane Erlenmayer cu 0,1 l must de bere și se cultivă 24 de ore la temperatura de + 27...28°C. Inoculul în concentrație de 5% în bază volumetrică se transferă în baloane Erlenmayer cu 0,2 l mediu nutritiv. Cultivarea drojdiei se efectuează submers, pe agitator rotativ cu 180-200 rot/min., la temperatura de + 27-28°C, timp de 3 zile.

Avantajul procedurii constă în sporirea conținutului de steroli cu 75-94,4% față de martorul neiradiat.

Așadar, **semnificația teoretică** a rezultatelor obținute constă în ceea ce s-a demonstrat că undele milimetrice de intensitate joasă pot fi utilizate ca **unul dintre factorii de reglare** a biosintezei principiilor bioactive din clasa lipidelor de către drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 și rezolvă probleme ce țin de elaborarea tehnologiilor de obținere a acestor componente. **Efectul biologic** al acțiunii undelor milimetrice de intensitate joasă, cercetat la nivel de celulă la drojdia de bere, poate provoca **stimularea**, dar poate fi și **neutru** sau poate **inhiba activitatea** și depinde de regimul și durata de emiterie a undelor milimetrice.

Concluzii

1. Emiterea undelor milimetrice de intensitate joasă în regim periodic timp de 20-30 de minute activează substanțial procesele de biosinteză a lipidelor și sterolilor la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

2. Emiterea undelor milimetrice de intensitate joasă în regim periodic timp de 10-20 minute activează procesele de biosinteză a acizilor grași, în special a acizilor nesaturați (cu 59,7%, respectiv, cu 44,7%) la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15.

3. Studiul comparativ al biosintezei sterolilor și altor fracții lipidice a evidențiat că la acțiunea undelor milimetrice de intensitate joasă emise în regim periodic conținutul de steroli este superior conținutului de fosfolipide și trigliceride.

4. Procedul nou de sinteză orientată a lipidelor elaborat cu utilizarea undelor milimetrice de intensitate joasă permite sporirea conținutului de lipide cu 53% față de martor.

5. Procedul nou de sinteză orientată a sterolilor elaborat cu utilizarea undelor milimetrice de intensitate joasă permite sporirea conținutului de ergosterol cu 75...94,4% față de martor.

Referințe:

1. Betskii O.V., Gitsu D.V., Parhomenko V.F., Rotaru A.H. Watter in the process of the interaction of electromagnetic millimeter waves with living organism. The second International Conference of Ecological Chemistry. Abstract.- Chișinău, 2002, p.300.
2. Rotaru A., Bucun N., Donica T., Trifan A. Acțiunea undelor milimetrice asupra sistemelor medico-biologice. Rezumatele Conferinței corpului didactico-științific al USM.- Chișinău, 1998, p.171.
3. Rotaru A. Coherent electromagnetic field interaction with Biological media. 12th Național Conference of the Romanian Physical Society „Trends în Physics”. - Târgu-Mureș, 2002, p.94.
4. Rotaru A., Toderaș I., Andronic L., Bulat D. Efecte biologice ale câmpului electromagnetic milimetric de densități reduse de putere // Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”.- Chișinău, 2005, p.107-112.
5. Usatîi A., Molodoi E., Moldoveanu T., Borisova T., Topală L. Tulpină de drojdie *Saccharomyces carlsbergensis* – sursă de steroli. Hotărâre de acordare a brevetului de invenție №5392 din 16.01.2008..
6. Anghel I., Vamanu A., Mitrache L. și al. Biologia și tehnologia drojdiilor. Vol.3. - București: Editura Tehnică, 1993. - 308 p.
7. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. - Москва: Издательство МГУ, 1995. - 224 с.
8. Кейтс М. Техника липидологии. - Москва: Мир, 1975.- 322 с.
9. Usatîi A., Calcateniuc A., Grosu L., Șirșov T. Procedeu de extragere a lipidelor din drojdiei / Brevet de Invenție MD №1930. Publ. BOPI, 2002, nr.5.
10. Новицкая Г.Н. Методическое руководство по тонкослойной хроматографии. - Москва: Наука, 1974. - 82 с.
11. Препаративная биохимия липидов / Под ред. Л.Д. Бергельсона. - Москва: Наука, 1981. - 259 с.
12. Лукницкий Ф.И., Аксенович А.В., Высоцкий Л.Н. Способ получения эргостерина. Пат. RU 2 080 389, 1997.
13. Синяк К.И., Даниленко И.И., Васюренко З. П. и др. Авторское свидетельство СССР, 542932, 1977.

Prezentat la 10.04.2008