

# BIOTEHNOLOGII DE OBȚINERE DIN LEVURI A $\beta$ -GLUCANILOR ȘI MANOPROTEINELOR

Dr. hab., prof. cercet. **Agafia USATÎI**

Dr., conf. cercet. **Elena MOLODOI**

Cercet. șt. **Natalia CHISELIȚA**

Cercet. șt. stag. **Ludmila FULGA**

Dr., conf. cercet. **Nadejda EFREMOVA**

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

## BIOTECHNOLOGIES FOR OBTAINING $\beta$ -GLUCANS AND MANNOPROTEINS FROM YEASTS

**Summary.** In this paper the experimental results of selection of yeast strains from *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Hansenula*, *Sporobolomyces* with high potential of polysaccharides biosynthesis and biotechnological interest are presented. Optimized culture mediums for biosynthetic processes stimulation are proposed, there are described new opportunities of application of extremely high frequency millimetric waves in the technology of the yeast cultivation and directed synthesis of  $\beta$ -glucans and mannoproteins. The results of the investigations contributed to the elaboration of the technological flow with the increased yield of  $\beta$ -glucans and mannoproteins obtained from yeasts with polyvalent utilization.

**Keywords:** yeast, *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -glucans, mannoproteins, culture medium, millimeter waves.

**Rezumat.** În studiu sunt reflectate rezultatele experimentale ale selectării tulpinilor de levuri din genurile *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Hansenula*, *Sporobolomyces*, cu potențial sporit de biosinteză a polizaharidelor de interes biotehologic. Se propun medii de cultură optimizate în vederea stimulării proceselor biosintetice, se descriu noi oportunități de aplicare a undelor milimetrice cu foarte înaltă frecvență în tehnologia cultivării levurilor și sintezei dirijate a  $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor. Cercetările au contribuit la elaborarea fluxului tehnologic cu randament sporit de obținere din levuri a  $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor cu utilizări polivalente.

**Cuvinte-cheie:** levuri, *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -glucani, manoproteine, mediu de cultură, unde milimetrice.

## INTRODUCERE

Actualmente apar tot mai multe informații privind la proprietățile funcționale ale unor molecule polizaharidice. Din acestea fac parte  $\beta$ -glucanii și mananii, prezenți sub formă de manoproteine în pe-rețele celulare al levurilor.  $\beta$ -glucanii intră în structura stratului interior al peretelui celular, iar învelișul exterior al lui este format din manan. Glucanul este un polizaharid complex, omniprezent printre drojdii, compus din unități de D-glucopiranoză legate  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) și  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Moleculele de glucan se asociază prin legături de hidrogen laterale, formând subunități de microfibre similare cu cele de celuloză și chiar de xilan. La rândul lor, microfibrele de glucan se asociază, organizând în interiorul matriței parietale o rețea cu o arhitectură și topografie complicată [15, 16].

Mananul reprezintă cea de a doua componentă chimică majoră a peretelui celular de la drojdii cu funcții multiple și complexe (structurală, informațională, imunitară, protectivă etc.). Mananul, de regulă, formează complexe stabile cu proteinele peretelui

și se caracterizează printr-o accentuată heterogenitate determinată de gradul de polimerizare a unităților manosil, de tipurile de legături ce se stabilesc, de prezența și a altor tipuri de reziduuri ozidice și de modul de complexare cu alte tipuri de molecule. Manoproteinele joacă un rol decisiv în menținerea integrității peretelui celular, supus acțiunii diferitelor enzime, presiunilor înalte sau temperaturilor scăzute [12, 13].

$\beta$ -glucanii și manoproteinele peretelui celular al levurilor posedă activitate imunomodulatoare [7,8,10,20], antioxidantă și antimutagenă [14,18], anticancerigenă [21], de aceea își găsesc utilizare la producerea preparatelor medicamentoase, drept componente ale remediilor cosmetologice, se utilizează în industria alimentară ca agenți de viscozitate și la formarea structurii produselor [9,11].

O soluție inovațională pentru obținerea  $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor este identificarea noilor procedee de reglare a biosintezei lor, rezultate în baza cărora pot fi elaborate tehnologii microbiene pentru producerea preparatelor cu utilizări polivalente.

În acest sens, ne-am propus drept obiective principale selectarea agenților (tulpinilor de levuri) cu niște calități biotehnologice performante, specificarea condițiilor de cultivare și de biosinteză orientată a polizaharidelor la levuri, eficientizarea procedeelelor de extragere, identificarea noilor tehnologii eficiente de obținere din levuri a  $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor cu utilizări în medicină, industria alimentară, cosmetologie, piscicultură.

#### Relevarea producătorilor cu calități biotehnologice performante și stabilirea căilor de dirijare a potențialului biosintetic

Pentru dezvoltarea biotehnologiilor moderne este evidentă oportunitatea selectării tulpinilor cu

calități performante utilizate în producerea industrială. Screeningul a 32 de culturi de levuri din genurile *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Sporobolomyces* a indicat un nivel variat al conținutului de  $\beta$ -glucani și manoproteine în pereții celulari. Un potențial biotehnologic valoros de producere a polizaharidelor au prezentat levurile din genul *Saccharomyces*. Două tulpini din acest gen au fost selectate și brevetate [3, 4] ca producători cu activitate performantă biotehnologică – tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, care în medie conține  $22,3 \pm 0,57\%$  de  $\beta$ -glucani în pereții celulari și tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, care conține până la  $11,6 \pm 0,11\%$  de manoproteine (tabelul 1).

Tabelul 1

#### Conținutul de $\beta$ -glucani și manoproteine la tulpinile de levuri din genul *Saccharomyces*

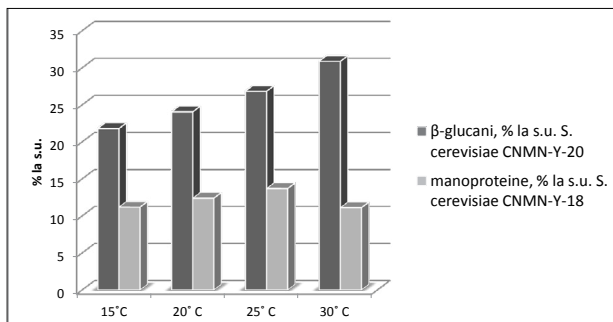
Specia de drojdie	$\beta$ -glucani, % s.u.		Manoproteine, % s.u.	
	Mediul YPD	Mediul Rieder	Mediul YPD	Mediul Rieder
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNMN-Y-18	14,41 $\pm$ 0,01	13,5 $\pm$ 0,1	10,93 $\pm$ 0,14	11,6 $\pm$ 0,11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNMN-Y-19	14,23 $\pm$ 0,16	16,70 $\pm$ 0,11	7,09 $\pm$ 2,21	7,80 $\pm$ 0,01
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNMN-Y-20	15,55 $\pm$ 0,96	22,3 $\pm$ 0,57	5,91 $\pm$ 0,44	7,47 $\pm$ 0,51
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNMN-Y-21	15,52 $\pm$ 0,93	20,59 $\pm$ 1,12	6,03 $\pm$ 0,82	7,1 $\pm$ 0,12

O altă problemă științifică importantă soluționată ține de elaborarea unor formule noi ale mediilor de fermentație și evidențierea condițiilor optime de cultivare în profunzime a tulpinilor de levuri selectate. De regulă, mediile de cultură ar trebui să conțină substanțe inductoare care pot facilita dezvoltarea levurilor și care nu afectează viabilitatea acestora. Cercetările au arătat că pentru levurile genului *Saccharomyces*, este necesar ca în mediul de cultură să fie incluse surse de carbon, azot, alți factori de creștere specifici producătorilor. În calitate de sursă de carbon utilizată pentru fermentare și pentru sporirea randamentului producerii de glucani și manani de către *S. cerevisiae* pot fi menționate glucoza, zaharoza, lactoza, fructoza, maltoza, manoza, amidonul [7]. Glucoza este cotată ca cea mai importantă sursă pentru biosinteza glucanilor și mananilor [1]. În calitate de sursă de azot organic pentru fermentare se aplică peptona și extractul de drojdie, combinate cu surse de azot, precum sulfatul de amoniu, azotatul de potasiu, cazeina [17].

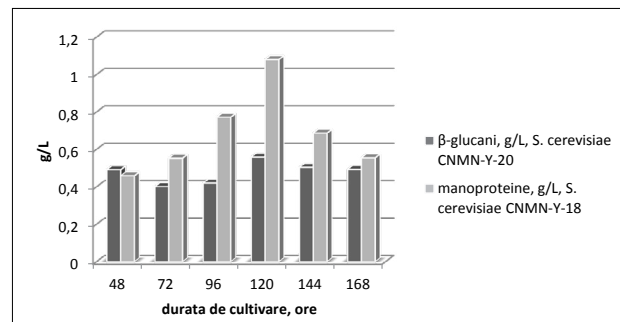
Cercetările efectelor diferitor surse de carbon, azot și acetați asupra creșterii și activității biosintetice a levurilor au permis stabilirea unor legități, în

urma cărora au fost optimizate două medii de cultură pentru cultivarea levurilor [5]. Biosinteza maximală a  $\beta$ -glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 s-a produs în varianta de mediu care conține ( $\text{g/L}^{-1}$ ): zaharoză – 37,0...39,0;  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}$  – 0,0014...0,0082;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,7; NaCl – 0,5;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  – 0,4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0; autolizat de drojdie – 10 ml; apă potabilă până la  $1\text{L}^{-1}$ , pH- 5,5. Mediul dat asigură obținerea cu 35,3 % mai mulți  $\beta$ -glucani față de mediul martor. Cantități maxime de manoproteine se obțin la cultivarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 pe varianta de mediu care conține ( $\text{g/L}^{-1}$ ): extract de drojdie – 10,0; peptonă – 20,0; glucoză – 43,0; hidrogenofosfat de amoniu – 2,41; apă potabilă până la  $1\text{L}^{-1}$ ; pH- 5,5. Compoziția dată asigură obținerea până la 1,0 g manoproteine la 1 L mediu.

Potrivit unor autori, temperatura de cultivare, pH-ul, aerația mediului și durata procesului de cultivare determină activitatea fiziologică a culturilor și acționează asupra proprietăților și compoziției biochimice a microorganismelor [18,19]. Deoarece compoziția biomasei de drojdie ar putea fi modificată în mod semnificativ prin intermediul aplicării



**Figura 1.** Efectul temperaturii de cultivare asupra conținutului de β-glucani și manoproteine la tulpinile de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 și *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18



**Figura 2.** Efectul duratei de cultivare asupra acumulării β-glucanilor și manoproteinelor la tulpinile de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 și *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18

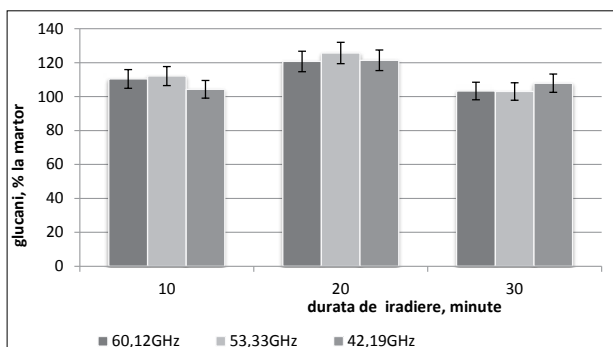
diferitelor condiții de cultivare, în vederea sporirii conținutului de glucani și manoproteine, este important de a modela acești factori pentru cultivarea producătorilor identificați.

La prima etapă a studiului, a fost urmărit efectul temperaturii de cultivare. Rezultatele cercetărilor demonstrează că nivelul de acumulare a β-glucanilor în pereții celulari ai tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 a crescut până la 30,9% la s.u. la cultivare în regimul termic de 30°C (figura 1), producția de β-glucani constituie 0,792 g/L. Accelerarea biosintezei manoproteinelor în pereții celulari ai *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 s-a stabilit la regimul de cultivare de 25°C. Nivelul acumulat de către levură a manoproteinelor constituie 13,71% s.u., în recalcul la productivitatea mediului de cultură obținându-se circa 0,848 g/L. Astfel, putem confirma că factorul de temperatură exercită un efect biologic caracterizat ca stimulent asupra biosintezei β-glucanilor și manoproteinelor la levuri.

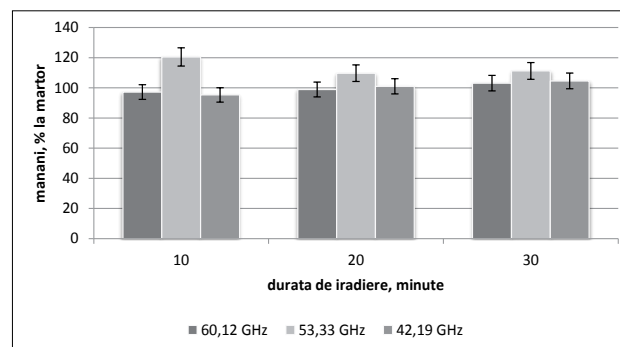
Este cunoscut faptul că stimularea transportului transmembranar al glucozei și activizarea proceselor

metabolice ale celulei se datorează sistemului piruvat dehidrogenază, care la rândul său este influențat de prezența oxigenului. În experiențele noastre, s-a constatat că acumularea β-glucanilor și manoproteinelor sporește odată cu majorarea concentrației oxigenului solvit din mediul de cultivare. La tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 conținutul maximal de glucani se observă la concentrația de 40,7...83,3 mg O<sub>2</sub>/L, comparativ cu 3,4-9,8 mg O<sub>2</sub>/L în variantele martor. La tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 maximul de manoproteine 1,1g/L mediu de cultură, s-a stabilit în mediul de cultivare cu grad înalt de oxigenare, față de 0,548 g/L calculat la creșterea tulpinii în condiții de aerare scăzută.

Un alt factor cu impact asupra eficienței tehnologiei este durata de cultivare a producătorului. Studiul privind sinteza β-glucanilor și manoproteinelor la levuri demonstrează că valoarea acestora este asociată cu fazele de dezvoltare. O acumulare semnificativă, atât a β-glucanilor, cât și a manoproteinelor în perețele celular, se produce în perioada 96-120 ore de cultivare submersă (figura 2).



(a)



(b)

**Figura 3.** Efectele undelor milimetrice de intensitate extra înaltă asupra conținutului de β-glucani și manoproteine la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 (a) și *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 (b).

O nouă abordare în soluționarea eficienței tehnologiilor microbiene constă în utilizarea undelor milimetrice cu o foarte înaltă frecvență. În acest sens, pentru tulpinile selectate s-au obținut informații noi despre modificările provocate de trei frecvențe 60,12 GHz, 53,33 GHz, 42,19 GHz, asupra caracterelor morfo-culturale, proliferării și viabilității celulelor, biosintezei  $\beta$ -glucanilor, mananilor, carbohidraților, proteinei, activității catalazei. S-a stabilit că efectul biologic al undelor milimetrice depinde de frecvența utilizată, dar și de durata de iradiere. Tulpinile de levuri cercetate reacționează pozitiv la frecvența 53,33 GHz,  $\beta$ -glucanii sunt acumulați activ la iradierea timp de 20 minute, manoproteinele la durata de 10 minute (figura 3). Noutatea cercetărilor este confirmată [6].

Așadar, la analiza datelor obținute se pot rezuma următoarele: s-au căpătat date noi privind potențialul înalt al levurilor de a sintetiza  $\beta$ -glucani și manoproteine; pentru fiecare tulpină producătoare s-au stabilit efectele și selectat condițiile optime de cultivare, cum ar fi mediul de fermentație, valorile de temperatură, aeratie, pH, durata de cultivare, aplicarea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă, ceea ce denotă perspectiva aplicării acestor factori în biotehnologia de producere pe scară largă a  $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor.

#### Procese tehnologice de obținere din levuri a $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor cu utilizări polivalente

Pornind de la faptul că în cercetările precedente au fost selectate tulpinile cu proprietăți biologice și biotehnologice superioare și optimizate condițiile de cultivare, s-a decis elaborarea unei tehnologii inova-

ționale de producere a  $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor. Fluxul tehnologic complex propus se realizează conform schemei prezentate în figura 4.

S-a stabilit că aplicarea schemei integrate cu procedeele și complexul de factori selectați pentru tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 permite producerea a  $0,813 \pm 0,13$  g/L sau cu 91,7%  $\beta$ -glucani mai mult comparativ cu tehnologia martor. Pentru tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, aplicarea tehnologiei noi de cultivare dirijată permite obținerea a  $1,36 \pm 0,79$  g/L manoproteine, ceea ce depășește tehnologia martor de 1,5 ori.

Rezultatele care reflectă procesul de cultivare dirijată a prodicenților sunt reproduse în regulamentele de laborator de obținere din levuri a  $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor care, pe viitor, pot sta la baza producerii industriale a acestor polizaharide polifuncționale. Utilizând tehnologiile elaborate, au fost obținute și caracterizate fizico-chimic două preparate, Glucan-20 și Mannopur-18, cu largi domenii de aplicare.

În concluzie, vom menționa cu fermitate că cercetările asupra biologiei și tehnologiei levurilor genului *Saccharomyces* au implicații importante atât de ordin teoretic, pentru explicarea sau confirmarea unor ipoteze fundamentale ale biologiei, cât și practic, prin dezvoltarea unor procedee de obținere a  $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor de larg interes pentru medicină și industria farmaceutică, industria alimentară, vinificație, cosmetologie.

*NOTĂ: Investigațiile au fost efectuate în cadrul proiectului 11.817.08.19A, finanțat de Consiliul Suprem pentru Știință și Dezvoltare Tehnologică al Academiei de Științe a Moldovei.*

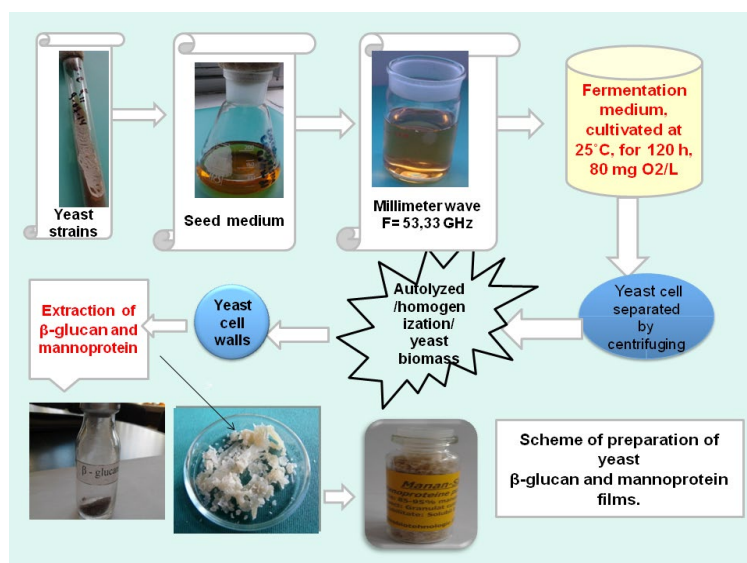


Figura 4. Schema fluxului tehnologic de producere din levuri a preparatelor pe bază de  $\beta$ -glucani și manoproteine

## BIBLIOGRAFIE

1. Belinchón M., Gancedo J. Glucose controls multiple processes in *S. cerevisiae* through diverse combinations of signaling pathways. În: FEMS Y. Res., 2007, 7(6), p. 808-818.
2. Berthels N., et. al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *S. cerevisiae* wine yeast strains. În: FEMS Y. Res. 2004, 4 (7), p. 683-689.
3. Brevet de invenție 4048 B1, MD, C12N 1/16. Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae*-sursă de  $\beta$ -glucani. Chiselița O., Usatii A., Taran N., Rudic V., Chiselița N., Adajuc V. BOPI nr. 6/2010, p. 20-21.
4. Brevet de invenție 4216 MD, C12N 1/16, C12R 1/865. Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* – producătoare de manani. Usatii A., Molodoi E., Efremova N., Chiselița N., Borisova T., Fulga L. BOPI nr. 4/2013, p. 24.
5. Brevet de invenție 4227 MD, C12N 1/16, C12R 1/865. Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18. Molodoi E., Usatii A., Fulga L., Efremova N., Chiselița N., Borisova T. BOPI 5/2013, p. 28.
6. Brevet de invenție, C12P 19/04, C12N 13/00, C12N 1/16). Procedeu de cultivare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. Usatii A., Chiselița N., Efremova N., Molodoi E., Fulga L., Borisova T. Hotărâre pozitivă nr. 8014 din 2014.12.30.
7. Chaung H.C., Huang T.C., Yu J.H., et. al. Immunomodulatory effects of beta-glucans on porcine alveolar macrophages and bone marrow haematopoietic cell-derived dendritic cells. În: Vet Immunol Immunopathol. 2009, vol. 131, nr. 3-4, p. 147-157.
8. Gómez-Verduzco G., Cortes-Cuevas A., López-Coello C. et al. Dietary supplementation of mannan-oligosaccharide enhances neonatal immune responses in chickens during natural exposure to *Eimeria* spp. În: Acta Vet Scand. 2009, vol. 19, nr. 51, p. 1-7.
9. Gonzalez-Ramos D., Cebollero E., Gonzalez R. A Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strain Overproducing Mannoproteins Stabilizes Waive against Protein Haze. În: Applied and Environmental Microbiology. 2008, vol. 74, nr. 17, p. 5533-5540.
10. Hong Zhi Liu, Quang Wang, Yin H. Immunoactivities and antineoplastic activities of *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein. În: Carbohydrate Polymer. 2011, vol. 83, p. 1690-1695.
11. Joaquín P. Argumentos a favor de la incorporación de los  $\beta$ -D-glucanos a la alimentación. În: Endocrinología y Nutrición. 2007, vol. 54, nr. 6, p. 315-324.
12. Klis, F. M., Mol P., Hellingwerf K., et. al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. În: FEMS Microbiol. 2002, 26(3), p. 239-256.
13. Kollar R., Reinhold B. B., Petrakova E., et. al. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-6), glucan interconnects mannoprotein, beta(1-3)- glucan, and chitin. În: Journal of Biological Chemistry. 1997, vol. 272(28), p. 17762-17775.
14. Krizková L., Zitnanová I., Mislovicová D. et. al. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: mannan-human serum albumin and mannan-penicillin G acylase. În: Mutat Res. 2006, vol. 606, nr. 1-2, p.72-79.
15. Latgé J.-P. The cell wall: a carbohydrates armour for the fungal cell. În: Mol. Microbiol. 2007, V. 66(2), p. 279-290.
16. Lesage G., Bussey H. Cell Wall Assembly in *S. cerevisiae*. În: Microbiol. and Mol. Biol. Rev. 2006, vol. 70(2), p. 317-343.
17. Parrou J. et. al. Dynamic responses of reserve carbohydrates metabolism under carbon and nitrogen limitation in *S. cerevisiae*. În: Yeast. 1999, vol. 15, p. 191-203.
18. Silke C. J. et al. Antioxidative activity of (1-3), (1-6)- $\beta$ -d-glucan from *S. cerevisiae* grown on different media. În: LWT-Food Sci. and Technol. 2008, V. 41(5), p. 868-877.
19. Soltanian S. et al. The protective effect against *V. campbellii* in *A. nauplii* by pure  $\beta$ -glucan and isogenic yeast cells differing in  $\beta$ -glucan and chitin content operated with a source-dependent time lag. În: Fish & Shellfish Immunol. 2007, vol. 23(5), p. 1003-1014.
20. Volman J.J., Ramakers J.D., Plat J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. În: Physiol Behav. 2008, vol. 23, Nr. 94(2), p. 276-284.
21. Yoon T. J., Kim T. J., Lee H. et al. Anti-tumor metastatic activity of  $\beta$ -glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. În: International Immunopharmacology. 2008, vol. 8, Nr. 1, p. 36-42.