

CZU: 663.12 + 579.66

## PERSPECTIVA BIOTEHNOLOGICĂ PRIVIND APLICAREA NANO-OXIZILOR METALICI LA CULTIVAREA LEVURILOR DE INTERES BIOTEHNOLOGIC

*Agafia USATÎI, Natalia CHISELIȚA, Alina BEȘLIU, Nadejda EFREMOVA,  
Ludmila BEJENARU, Ludmila BATÎR, Constantin DADU, Ana TANASE*

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie*

În lucrare sunt prezentate informații noi despre gradul de acțiune a nanoparticulelor cu diferite caracteristici fizico-chimice ZnO (10 nm, 30 nm, 50 nm, <100 nm), TiO<sub>2</sub> (30 nm, 40 nm), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10 nm, 30 nm, 50-100 nm), și ZnO/MgO (10/11 nm) asupra levurilor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, tulpini cu calități biotehnologice performante. S-a constatat că factorii-cheie în declanșarea răspunsului celulelor sunt nanostructura, dimensiunile și concentrațiile nanoparticulelor metalice, iar indicii importanți de răspuns ai celulei sunt viabilitatea, conținutul de proteine, carbohidrați (inclusiv β-glucani și manoproteine), pigmenți carotenoidici (inclusiv β-caroten, torulenă, torularodină), activitatea enzimelor antioxidante catalaza și SOD ca elemente ale stresului oxidativ al celulei. Analizând efectele nano-oxizilor metalici asupra tulpinilor de levuri, menționăm importanța acestora ca factor de reglare a proceselor de cultivare și biosinteză a principiilor bioactive celulare de interes biotehnologic. Rezultatele modelării proceselor biosintetice cu aplicarea nanoparticulelor prezintă privilegiu pentru dezvoltarea unor aplicații inovative, în special în bionanotehnologie, biomedicină, industria alimentară, protecția mediului, alte domenii.

**Cuvinte-cheie:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula gracilis*, nano-oxizi metalici, viabilitate, proteine, carbohidrați, carotenoide, catalază, superoxid dismutază.

### BIOTECHNOLOGICAL PERSPECTIVE IN THE APPLICATION OF METAL NANO-OXIDES AT THE CULTIVATION OF THE YEASTS WITH BIOTECHNOLOGICAL INTEREST

The paper reveals new insights about the degree of action of nanoparticles with different physico-chemical characteristics: ZnO (10 nm, 30 nm, <50 nm, <100 nm), TiO<sub>2</sub> (30 nm, 40 nm), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10 nm, 30 nm, 50 nm-100 nm) and ZnO/MgO (10/11 nm) on *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 and *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 yeast strains with performing biotechnological qualities. Key factors in triggering cell response are nanostructure, dimensions and concentrations of metal nanoparticles. Important cellular responses are viability, content of the proteins and carbohydrates, including β-glucans and mannoproteins, content of the carotenoid pigments, including β-carotene, torulene and torularhodin, antioxidant activity of SOD and catalase as elements of cellular oxidative stress. Analyzing the effects of metallic nano-oxides on yeast strains, we mention their importance in regulation of the cultivation and biosynthesis of cell bioactive substances with biotechnological interest. The results of the modeling of biosynthetic processes with the application of nanoparticles present advantage in the development of innovative applications, especially in bionanotechnology, biomedicine, food industry, environmental protection, and other fields.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula gracilis*, metal nano-oxides, viability, proteins, carbohydrates, carotenoids, catalase, superoxide dismutase.

### Introducere

Una dintre abordări în vederea sporirii potențialului bioproductiv a levurilor poate fi aplicarea nano-oxizilor metalici în procesele de cultivare a tulpinilor de interes biotehnologic. În calitate de surse cu potențial înalt sunt studiate microorganismele, în special levurile, care sintetizează un complex de substanțe bioactive de interes comercial, cum sunt carbohidrații, lipidele, proteinele, pigmenții carotenoizi, cu rol important în activitatea vitală a organismelor vii și avantajoase din punct de vedere economic. Conform studiilor recente, s-a demonstrat că nanoparticulele, datorită dimensiunilor mai mici față de celulele și organele celulare, sunt foarte mobile și pot penetra structuri biologice, astfel perturbând funcționarea normală a acestora [1,2]. Conform datelor din literatura de specialitate, nanoparticulele pot exercita efecte stimulatorii, dar și inhibitorii, asupra microorganismelor, care depind de concentrația, dimensiunea, compoziția chimică, tipul și forma nano-compozitelor. În acest context, căutarea noilor căi pentru dezvoltarea biotehnologiilor microbiene inovative este de o importanță majoră.

Scopul cercetărilor constă în elucidarea efectelor nano-oxizilor metalici asupra proceselor de dezvoltare și biosinteză a principiilor bioactive la levurile din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula*.

### Material și metode

**Obiecte de studiu.** În cadrul cercetărilor au fost utilizate tulpinile de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, selectată ca producător de  $\beta$ -glucani [3], *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, selectată ca producător de manoproteine [4], *Rhodotorula gracililis* – CNMN-Y-30, selectată ca producător de proteine și carotenoide [5]. Tulpinile sunt păstrate în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

**Medii de cultură și condiții de cultivare.** Pentru inoculare și cultivarea submersă a levurilor au fost utilizate mediile de fermentație specifice tulpinilor în studiu YPD și must de malț [6]. Cultivarea submersă s-a efectuat în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 1,0 l, pe agitator cu viteza de rotație 200 rot./min, la temperatura de 25°C, durata de cultivare submersă 120 de ore. Mediul lichid de fermentare a fost însămânțat în volum de 5% cu inocul  $2 \times 10^6$  celule/ml.

**Nano-oxizi metalici:** În cercetări au fost utilizate nanoparticule (NP): ZnO cu dimensiuni de 10 nm și 30 nm, TiO<sub>2</sub> (30 nm și 40 nm), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10 nm), nanocompozitul ZnO/MgO (10,2 nm/11,7 nm), stabilizate în Polyvinylpyrrolide (PVP), sintetizate și puse la dispoziția noastră cu multă amabilitate de către cercetătorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii al AȘM [7–9]. În experiențe au fost utilizate nanoparticule comercializate: ZnO cu dimensiuni <50 nm, sub formă de pulbere, sinteză chimică, puritate >97%, conține 6% Al dopant, aria suprafeței >10,8 m<sup>2</sup>/g (Sigma-Aldrich); ZnO cu dimensiuni <100 nm, sub formă de pulbere, puritate 80%, aria suprafeței 15-25 m<sup>2</sup>/g (Sigma-Aldrich); Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> cu dimensiuni de 30 nm, greutatea moleculară 231,53 g/mol, stabilizate în Polyvinylpyrrolide (PVP), (Sigma-Aldrich); Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, cu dimensiuni de 50-100 nm, sub formă de pulbere, se referă la categoria materialelor biomedicale, aria suprafeței >60 m<sup>2</sup>/g, densitatea 4,8-5,1 g/ml la 25°C (Sigma-Aldrich). Soluția stoc de nanoparticule a fost preparată conform metodei descrise în [10]. Concentrațiile nanoparticulelor utilizate la cultivarea levurilor au variat în funcție de scopul experiențelor. În varianta martor nu s-au aplicat nanoparticule.

**Metode de analiză:** Caracterile morfoculturale ale levurilor au fost stabilite conform [11–13]. Forma și dimensiunile celulelor au fost examinate cu ajutorul microscopului XSZ-500, ocular 100x/1,25 OIL, 160/0,17 și camera video – MEM1300, utilizând programul special Future WinJoe. Caracterile morfologice coloniale au fost stabilite conform principiilor și tehnicilor de microbiologie generală [14]. Numărul de celule dezvoltate pe mediul lichid a fost determinat spectrofotometric ( $\lambda = 600$  nm) conform metodelor cunoscute [15,16]. Viabilitatea celulelor s-a stabilit prin cuantificarea numărului de colonii formate pe plăcile cu YPD agarizat. Formula de calcul UFC/ml = numărul de colonii x factorul diluției x 10 [17,18]. Producția de biomasa levuriană a fost determinată gravimetric [40]. Proteina a fost determinată spectrofotometric conform metodei Lowry [19], în calitate de standard fiind utilizată albumina cristalină din serul bovinelor. Carbohidrații totali în biomasa de levuri s-au determinat la spectrofotometrul PG T60 VIS la lungimea de undă 620 nm cu utilizarea reactivului antron și D-glucozei în calitate de standard conform metodei descrise în [20].  $\beta$ -glucanii au fost extrași din biomasa levuriană și determinați gravimetric conform procedeele prezentate în [21]. Manoproteinele au fost extrase și determinate gravimetric conform metodelor descrise în [22,23]. Carotenoidele totale ce conțin  $\beta$ -caroten, torulină, torularodină au fost extrase din celulele levuriene aplicând metoda Frengova et al. [24] și cuantificate spectrofotometric la lungimile de undă 450 nm, 480 nm și 507 nm. Coeficienții de extincție  $[E_{1\text{ cm}}^{1\%}]$  ai carotenoidelor în eter petroleic sunt: 2592 pentru  $\beta$ -caroten, 3240 pentru torulină și 2040 pentru torularodină [25,26]. Activitatea catalazei a fost determinată conform metodelor descrise în [27,28]. Activitatea superoxid dismutazei a fost determinată la spectrofotometrul PG T60 VIS, la lungimea de undă 560 nm, conform metodei descrise în [29] cu unele modificări. Gradul de corelare între unele caractere morfologice și conținutul de principii bioactive de interes biotehnologic s-a stabilit folosind instrumente Excel, aplicând coeficientul de determinare  $r^2 = r^2_{xy}$ . Rezultatele au fost prelucrate statistic cu ajutorul setului de programe Statistica 7, veridicitatea în comparație cu martorul -  $p \leq 0,05$ .

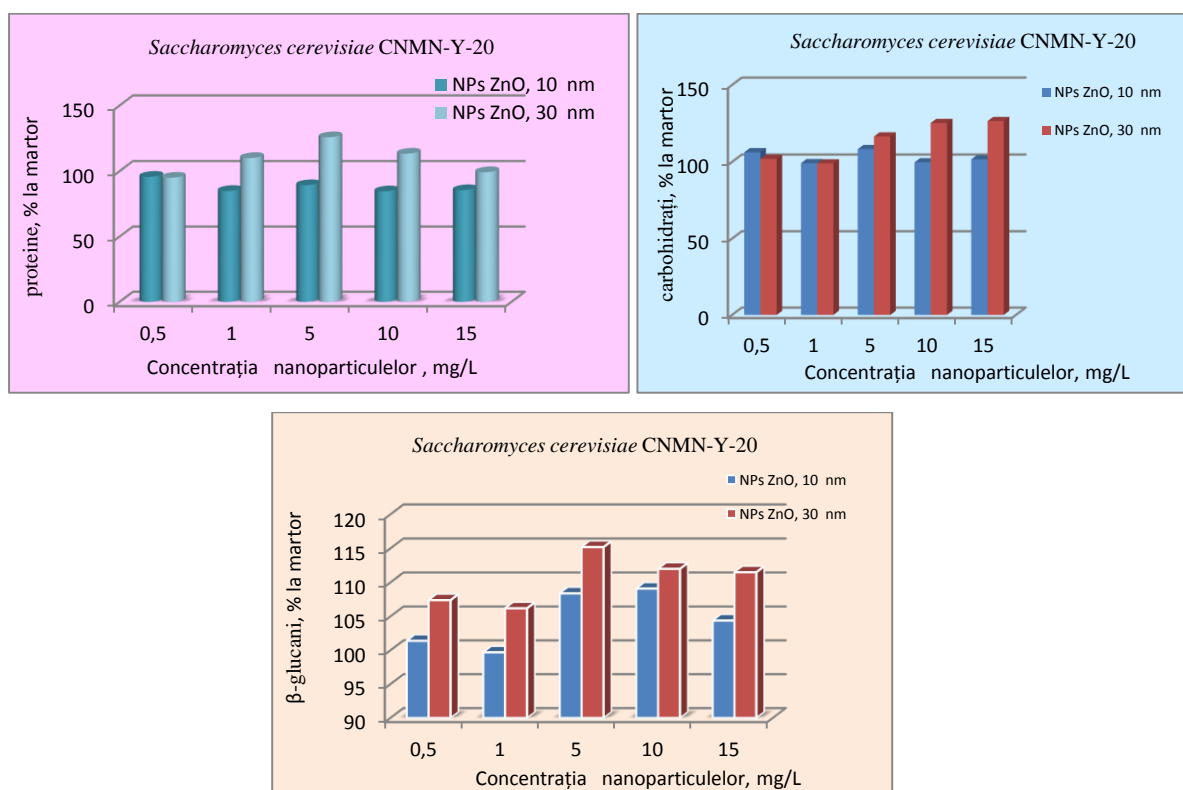
### Rezultate și discuții

Cercetările în domeniul studiului aplicării nano-oxizilor metalici în tehnologii de cultivare a levurilor au avut ca obiective identificarea caracterului de acțiune a nano-oxizilor metalici asupra levurilor din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula* în funcție de dimensiuni și concentrație; selectarea formelor preferențiale pentru sporirea performanțelor biotehnologice ale tulpinilor levuriene; modelarea proceselor de biosinteză a principiilor bioactive la levuri cu aplicarea nano-oxizilor metalici; evaluarea modificărilor morfologice în

corelare cu conținutul de principii bioactive de interes biotehnologic, la cultivarea levurilor în prezența nano-oxizilor metalici.

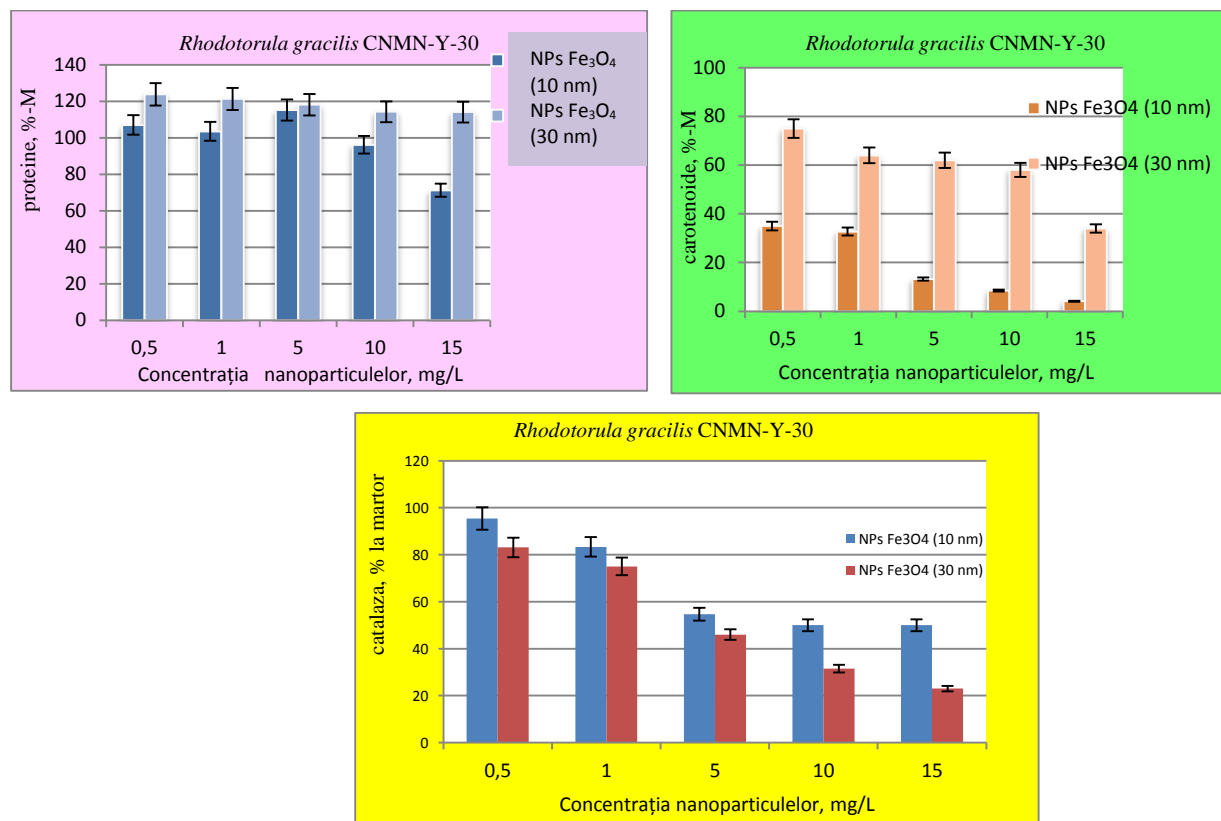
Cercetările de analiză a efectelor nano-oxizilor metalici asupra dezvoltării levurilor în vederea selectării formelor preferențiale pentru sporirea performanțelor biotehnologice au relevat că tipul, dimensiunile și concentrațiile nanoparticulelor sunt factori importanți în declanșarea răspunsului levurilor. Totodată, a fost stabilit că gradul de influență a nanoparticulelor asupra proceselor biosintetice la tulpinile în studiu depinde de particularitățile fiziologo-biochimice ale levurilor. Din analiza datelor privind efectele în funcție de nano-structură constatăm o influență pozitivă a nanoparticulelor de  $\text{TO}_2$  (30 nm) în concentrație de 5, 10 și 15 mg/l asupra acumulării carbohidraților și manoproteinelor la cultura *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, efect care nu s-a observat la determinarea producției de biomasă și a conținutului de proteine. Nanocompozitul ZnO/MgO (10/11 nm) în concentrații de 0,5-15 mg/l practic nu modifică conținutul componentelor peretelui celular al levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, cu excepția proteinelor a căror cantitate descrește cu 18-24%.

Studiul efectelor nanoparticulelor în funcție de dimensiuni și concentrație a evdenciat că nanoparticulele de ZnO cu dimensiuni de 30 nm, în concentrație de 5, 10 și 15 mg/l, aplicate la cultivarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, posedă capacitatea de a stimula biosinteza proteinelor, carbohidraților,  $\beta$ -glucanilor și de a micșora conținutul de biomasă acumulată după 120 de ore de cultivare, însușiri care nu le-au manifestat nanoparticulele cu dimensiuni de 10 nm (Fig.1).



**Fig.1.** Conținutul de proteine, carbohidrați,  $\beta$ -glucani în biomasă *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni.

Alt tip de nanoparticule,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  cu dimensiunile de 10 și 30 nm, aplicate la cultivarea tulpinii de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 în concentrațiile din diapazonul 0,5-15 mg/l, inițiază stimularea biosintezei proteinelor, dar duc la diminuarea cantităților de carotenoide și a activității catalazei (Fig.2).



**Fig.2.** Conținutul de proteine, carotenoide și activitatea catalazei la tulpinina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> cu diferite dimensiuni.

Astfel, analizând rezultatele investigațiilor efectelor nanoparticulelor de TiO<sub>2</sub>, ZnO/MgO, ZnO și de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> asupra a trei tulpini de levuri de interes biotehnologic, menționăm importanța nano-oxizilor metalici ca factor de reglare a proceselor de cultivare și biosinteză a principiilor bioactive celulare, precizând că amploarea gradului de acțiune a nanoparticulelor este determinată de tipul nanoparticulelor, dimensiunile și concentrația acestora.

Cercetările ulterioare care au avut drept scop modelarea proceselor de biosinteză a principiilor bioactive la levuri cu aplicarea nano-oxizilor metalici au demonstrat că în calitate de repere pot fi diferiți indicatori, cum ar fi cei biologici și biochimici. Deoarece levurile își pot modifica indicii de productivitate și caracterele morfoculturale ca răspuns la schimbarea condițiilor fizico-chimice de cultivare, iar pe durata dezvoltării levurilor în mediul nutritiv se acumulează anumite cantități de alcool etilic care pot iniția dereglări în metabolismul celular, importante sunt cercetările de apreciere a modificărilor intervenite la levuri în prezența alcoolului etilic din mediul nutritiv. Totodată, prezintă interes investigațiile ce țin de posibilitatea diminuării efectului negativ al alcoolului prin utilizarea nanoparticulelor de ZnO. Datele obținute confirmă acțiunea nefavorabilă a concentrațiilor mari de alcool etilic care se pot reflecta negativ asupra proceselor vitale și care pot iniția degradarea membranelor celulare. În acest context prezintă interes cercetările asupra posibilității de reducere a efectelor negative ale alcoolului prin utilizarea nanoparticulelor.

Datele obținute de noi au confirmat că nanoparticulele de ZnO (30 nm) nu pot înlătura efectul negativ al conținutului înalt de alcool (10% v/v) asupra multiplicării celulelor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 și producției de biomasă. Totuși, aplicarea nanoparticulelor de ZnO (30 nm) în procesul de cultivare a levurii poate fi considerată ca supliment extern pentru a spori producția de β-glucani sub aspect industrial. Cercetările în acest sens au evidențiat că ponderea conținutului de β-glucani este maximală în cazul cultivării tulpinii în prezența a 5 mg/l nanoparticule de ZnO (30 nm) și a 2% de alcool etilic, iar producția de biomasă crește în variantele care conțin nanoparticule de ZnO (30 nm) în concentrații de 5-15 mg/l mediu de cultură (*a se vedea Tabelul*).

Tabel

Rata valorilor conținutului de biomasă și  $\beta$ -glucani la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la cultivare pe mediul YPD în prezența nanoparticulelor de ZnO (30 nm) și alcoolului etilic

Concentrația de etanol (% v/v)	Concentrația de NPs ZnO (30 nm) (mg/l)	Rata specifică a conținutului de $\beta$ -glucani (% la s.u.)	Rata specifică a conținutului de biomasă uscată, g/l	Conținutul de $\beta$ -glucani	
				g/l	% la martor
0	0	18,8±1,4	5,37±0,45	1,01	100
2	0	20,01±3,4	6,06±1,3	1,21	119,8
5	0	20,86±5,5	5,52±0,9	1,15	113,8
10	0	21,0±1,6	1,55±0,3	0,32	31,7
0	5	20,52±1,0	6,02±0,08	1,23	121,7
0	10	19,14±0,17	<b>6,16±0,28</b>	1,18	116,8
0	15	18,78±109	6,02±0,18	1,13	111,0
2	5	<b>22,55±1,9</b>	5,88±1,2	<b>1,32</b>	<b>130,7</b>
2	10	21,28±1,9	5,81±1,5	1,24	122,7
2	15	21,25±2,4	5,74±1,3	1,21	119,8
5	5	19,5±1,9	5,08±2,4	0,99	98,0
5	10	21,08±2,5	4,4±2,1	0,92	91,1
5	15	19,32±2,3	4,65±2,3	0,89	88,1

• P  $\leq$  0,01

Complexitatea metabolică a microorganismelor complică analiza și identificarea caracterului interacțiunii nanoparticule-celule. Compoziția și suprafața nanoparticulelor condiționează amploarea și specificitatea gradului de acțiune asupra caracterelor morfoculturale și fiziologo-biochimice ale microorganismelor. Modul în care celulele interacționează cu nanostructuri diferite rămâne puțin studiat. În continuare, cercetările au avut drept scop analiza viabilității, caracterelor morfoculturale celulare și coloniale ale levurilor din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula* sub influența nanoparticulelor oxizilor de metale și stabilirea gradului de asociere cu producția de principii bioactive.

Rezultatele cercetărilor de laborator au demonstrat în premieră că nivelul de acțiune a nanoparticulelor cu diferite caracteristici fizico-chimice  $\text{TiO}_2$  (40 nm), ZnO (<100 nm) și  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (10 nm) asupra procesului de multiplicare, viabilității celulelor, caracterelor morfoculturale, conținutului de manoproteine,  $\beta$ -glucani, carotenoide la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 și *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, tulpini cu calități biotehnologice performante, este determinat de tipul nanoparticulelor, concentrația și durata de contact. Nanoparticulele de  $\text{TiO}_2$  (40 nm), în concentrații de 10-30 mg/L, în primele 24 de ore de cultivare nu modifică semnificativ viabilitatea și caracterele morfoculturale ale celulelor și coloniilor de *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, dar după 120 de ore de contact provoacă o scădere neînsemnată, cu până la 11%, a conținutului de manoproteine în biomasa levuriană (Fig.3). Coeficientul de determinare între aria celulelor și cantitatea de manoproteine este unul puternic ( $R^2 = 0,8817$ ).

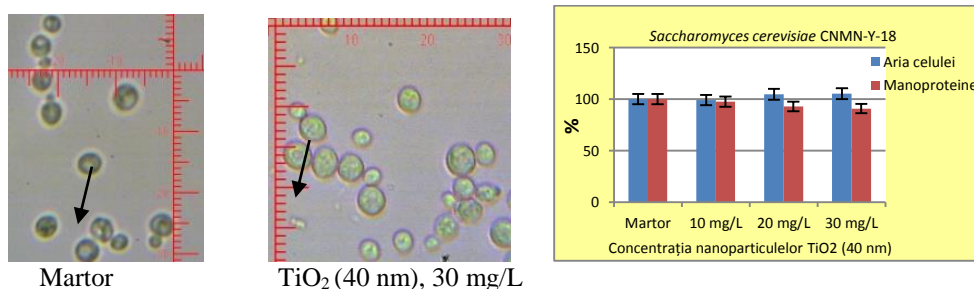
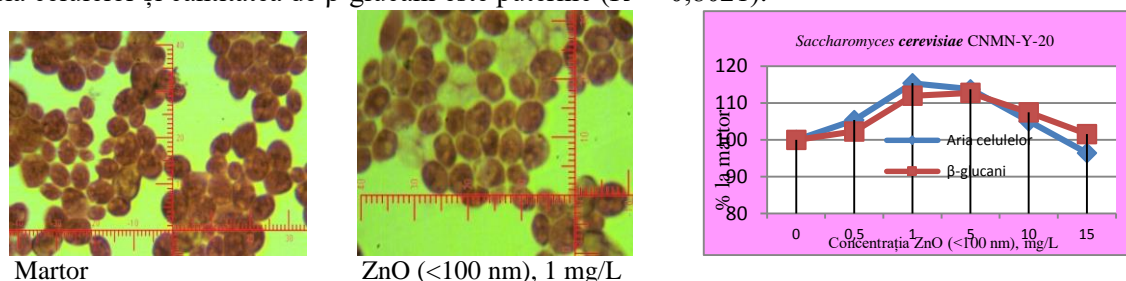


Fig.3. Celule *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 în proces de înmugurire după 24 de ore de contact și relația dintre aria celulelor și conținutul de manoproteine la acțiunea nanoparticulelor de  $\text{TiO}_2$  (40 nm); durata de contact 120 de ore.

Nanoparticulele de ZnO (<100 nm), în concentrații de 0,5-15 mg/l, în primele 24 de ore de contact diminuează gradul de viabilitate, dar după 120 de ore de contact inițiază o creștere cu 13-15% a dimensiunilor

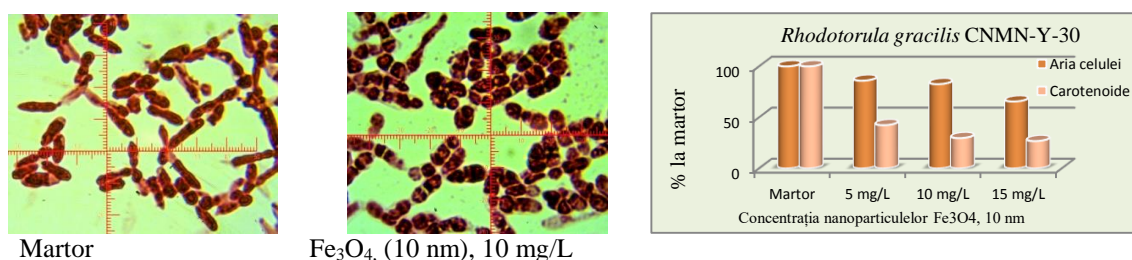


medii ale celulelor *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 și cu 7-12% a capacității de formare a  $\beta$ -glucanilor în biomasa celulară, în special sub acțiunea concentrațiilor de 1 și 5 mg/l (Fig.4). Coeficientul de determinare dintre aria celulelor și cantitatea de  $\beta$ -glucani este puternic ( $R^2 = 0,8021$ ).



**Fig.4.** Celule *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în proces de dezvoltare după 24 de ore de cultivare și relația dintre aria celulelor și conținutul de  $\beta$ -glucani la acțiunea particulelor de ZnO (<100 nm); durata de contact 120 de ore.

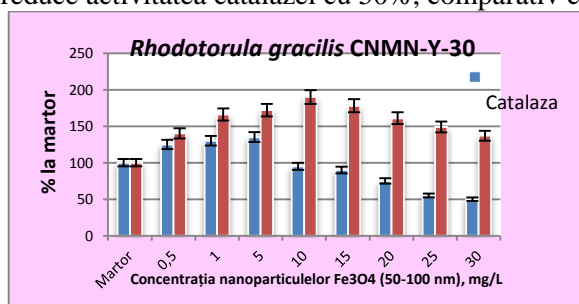
Nanoparticulele de  $Fe_3O_4$  cu dimensiunea de 10 nm, în concentrații de 5-30 mg/l, au impact puternic asupra levurii pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. În aspect de modificare a caracterelor morfoculturale celulare și coloniale, a capacității de formare a carotenoidelor, putem menționa schimbări semnificative exprimate, în funcție de concentrația nanoparticulelor, prin micșorarea dimensiunilor celulelor tulpinii, care se soldează cu diminuarea capacității de formare a pigmentilor carotenoidici în biomasa celulară (Fig.5). Raportul corelațional dintre aria celulelor și cantitatea de carotenoide este  $R^2 = 0,6926$ .



**Fig.5.** Modificări morfologice ale celulelor *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 și relația dintre aria celulelor și cantitatea de carotenoide, la cultivare în prezența nanoparticulelor de  $Fe_3O_4$  (10 nm); durata de contact 120 de ore.

Prin urmare, datele de morfologie celulară (modificarea dimensiunilor celulelor) corelate cu cele privind conținutul de principii bioactive de interes biotehnologic la levurile din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula* (în cazul nostru, manoproteine,  $\beta$ -glucani și carotenoide), pot oferi posibilitatea restrângerii paletii de analize și formării bazelor de referință necesare pentru strategia de sporire a performanțelor biotehnologice ale levurilor cu utilizarea nanoparticulelor oxizilor de metale.

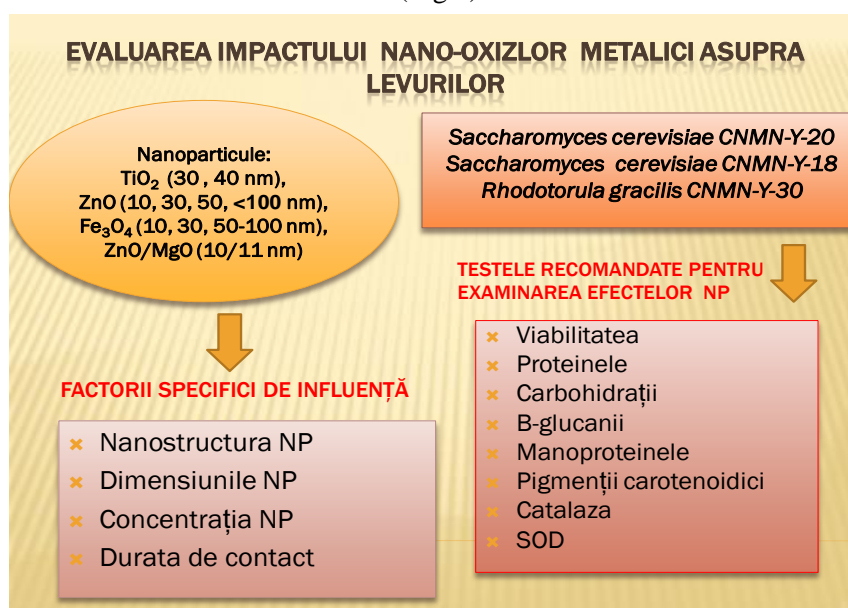
Deoarece componentele antioxidante naturale sunt primele care reacționează la factorii toxici din mediu, având funcția de a stabili și neutraliza efectele negative asupra celulei, a devenit necesară elucidarea influenței nanoparticulelor de  $Fe_3O_4$  asupra statutului antioxidant al *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. Din Figura 6 se poate observa că reacția de răspuns a tulpinii la introducerea nanoparticulelor de  $Fe_3O_4$  (50-100 nm) în concentrație de 20 mg/l se exprimă prin diminuarea activității catalazei cu 25%, iar concentrația nanoparticulelor de 30 mg/l reduce activitatea catalazei cu 50%, comparativ cu proba martor.



**Fig.6.** Activitatea enzimelor antioxidante la *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 sub influența nanoparticulelor de  $Fe_3O_4$  (50-100 nm) în funcție de concentrație.

Analiza datelor privind activitatea superoxid dismutazei (SOD) relevă o serie de modificări. În majoritatea cazurilor s-a constatat o activizare a activității enzimei ca răspuns la procesele degenerative cu formarea radicalilor liberi sub influența nanoparticulelor magnetitei. Maximul cantitativ de formare a SOD s-a observat în variantele în care levura a fost cultivată în prezența a 10 mg/l nanoparticule. Ulterior, odată cu aplicarea concentrațiilor mai mari – 15-30 mg/l, activitatea SOD descrește, însă rămâne în continuare mai înaltă față de martor.

Generalizând datele privind reacția diferită a levurilor de interes biotehnologic din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula* la nanoparticulele de TiO<sub>2</sub> (30 și 40 nm), ZnO (10, 30, <50 și <100 nm), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10, 30, 50-100 nm) și de ZnO/MgO (10,2 nm/11,7 nm), putem afirma că factorii-cheie în declanșarea răspunsului celulelor sunt nanostructura, dimensiunile și concentrațiile nanoparticulelor metalice, iar indicii importanți de răspuns al celulei sunt viabilitatea, conținutul de proteine, carbohidrați (inclusiv β-glucani și manoproteine), pigmenți carotenoidici (inclusiv β-caroten, torulenă, torularodină), activitatea enzimelor antioxidante catalaza și SOD ca elemente ale stresului oxidativ al celulei (Fig.7).



**Fig.7.** Schema cu privire la factorii de influență a nanoparticulelor metalice și testele recomandate pentru examinarea efectelor asupra levurilor din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula*.

Așadar, pornind de la constatările cu privire la factorii de influență a nanoparticulelor metalice și testele recomandate pentru examinarea efectelor asupra levurilor din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula*, putem deduce că datele noastre pot prezenta interes pentru dezvoltarea unor aplicații inovative, în special în bionanotehnologie, biomedicină, industria alimentară, protecția mediului, alte domenii.

### Concluzii

1. Amploarea gradului de acțiune a nanoparticulelor cu diferite caracteristici fizico-chimice ZnO (10 nm, 30 nm, 50 nm, <100 nm), TiO<sub>2</sub> (30 nm, 40 nm), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (10 nm, 30 nm, 50-100 nm) și ZnO/MgO (10/11 nm) asupra viabilității celulelor, caracterelor morfoculturale, conținutului de β-glucani, manoproteine, carotenoide, proteine, carbohidrați la levurile *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 și *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, tulpini cu calități biotehnologice performante, este determinată de tipul nanoparticulelor, dimensiunile, concentrația și durata de contact.
2. Monitorizarea reproducerii celulelor, producției de biomasă, compoziției biochimice a levurilor din genurile *Saccharomyces* și *Rhodotorula* a demonstrat posibilitatea modelării proceselor de dezvoltare și biosinteză a principiilor bioactive cu aplicarea nanoparticulelor de ZnO, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, în concentrații de 0,5-30 mg/l.
3. Datele de morfologie celulară (modificarea dimensiunilor celulelor), corelate cu cele privind conținutul de principii bioactive de interes biotehnologic (manoproteine, β-glucani, carotenoide), indică legături puternice ( $R^2 = 0,6926-0,8817$ ), ceea ce permite restrângerea paletelor de analize și formarea bazelor de referință

necesare pentru strategia de sporire a performanțelor biotehnologice ale levurilor în cazul aplicării nano-oxizilor metalici.

#### Referințe:

- BRAIN, J., CURRAN, M., DONAGHEY, T., MOLINA, R. Biologic responses to nanomaterials depend on exposure, clearance, and material characteristics. In: *Nanotoxicology*, 2009, vol.3, p.174-180.
- MRINMOY DE, PARTHA S. GHOSH, AND VINCENT M. ROTELLO. Applications of Nanoparticles in Biology. In: *Adv. Mater.* 2008, 20, 4225-4241 DOI: 10.1002/adma.200703183
- Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. *Tulpina de drojdie Saccharomyces cerevisiae – sursă de β-glucani*. Brevet de invenție MD 4048, Inventatori: CHISELIȚA, O., USATÎI, A., TARAN, N., RUDIC, V., CHISELIȚA, N., ADAJUC, V., BOPI, 2010, 6.
- Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. *Tulpină de drojdie Saccharomyces cerevisiae – producătoare de manani*: Brevet de invenție MD 4216, Inventatori: USATÎI, A., MOLODOI, E., EFREMOVA, N., CHISELIȚA, N., BORISOVA, T., FULGA, L. C12N 1/16, C12R 1/865. Publ. 15.08.2012, BOPI, 2013, 4.
- USATÎI, A., BEȘLIU, A., CHIRIȚA, E. Caractere fenotipice și compoziția biochimică a tulpinii de levuri pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30. În: *Materialele Conferinței tehnico-științifice a colaboratorilor, doctoranzilor și studenților*, UTM, 26-28 noiembrie 2015. Chișinău, 2016, 2 (1), p.31-34. ISBN 978-9975-45-440-7
- AGUILAR-USCANGA, B., FRANCOIS, J.M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. In: *Letters in Applied Microbiology*, 2003, no37, p.268-274.
- GUTUL, T., RUSU, E., CONDUR, N., URSAKI, V., GONCEARENCO, E., VLAZAN, P. Preparation of poly(N-vinylpyrrolidone)-stabilized ZnO colloid nanoparticles. In: *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2014, no5, p.402-406. DOI: 10.3762/bjnano.5.47.
- GUTUL, T., RASTEMISINA, I., POSTOLACHI, O., NICORICI, A., DVORNIKOV, D., PETRENCO, P. Synthesis and biological application of magnetite nanoparticles. In: *Moldavian Journal of the Physical Sciences*, 2015, vol.14, no.3-4, p.177-188.
- RUSU, E., URSAKI, V., GUTUL, T., VLAZAN, P., SIMINEL, A. Characterization of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles and ZnO/TiO<sub>2</sub> Composite Obtained by Hydrothermal Method. In: *3rd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*, Springer Science+Business Media Singapore 2016, V. Sontea and I. Tiginyanu (eds.), IFMBE Proceedings 55, 93 – 96, DOI: 10.1007/978-981-287-736-9\_22.
- OTERO-GOZALIEZ, L., GARSIA-SAUCEDO, C., JAMEZ, A., SIERRA-ALVAREZ, R. Toxicity of TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, FeO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Chemosphere*, 2013, p.1201-1206.
- ANGHEL, I., VOICA, C., TOMA, N., COJOCARU, I. *Biologia și tehnologia drojdiilor*. București: Editura Tehnică, 1991, vol.2. 385 p.
- BARNETT, J., PAYNE, R., VARROW, D. *Yeasts: characteristics and identification*. 3-rd Edition. Cambridge University Press, 2000, p.1150.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. *General classification of the yeasts. The yeast: Ataxonomic study*. 3rd Edition. Elsevier, Amsterdam, 1984. 1082 p.
- ZARNEA, G., MIHĂESCU, G.R., VELEHORSCHI, V. *Principii și tehnici de Microbiologie generală*. Vol.I, București, 1992. 330 p.
- DOBIAS, J. *Nanoparticles and Microorganisms: from Synthesis to Toxicity*. These no.5614 (2013) pour l'obtention du grade de docteur es sciences. Ecole Polytechnique Federale de Lausanne. Suisse, 2013. 139 p.
- MITCHELL DESMA N., HILARY ARNOLD GODWIN, ELIZABETH CLAUDIO. Nanoparticle Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*: A Comparative Study Using Au Colloid, Ag Colloid, and HAuCl<sub>4</sub> • 3H<sub>2</sub>O in Solution. In: *Nanoscape*, Spring 2004, Issue 1, p.59-69.
- SAHAYARAJ, K., RAJESH, S. Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez Vilas (Ed.) In: *FORMATEX*, 2011, p.228-244.
- ZHANG YIXIA, DAPENG YANG, YIFEI KONG, XIANSONG WANG, OMAR PANDOLI, GUO GAO. Synergetic Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles@Aloe Vera Prepared via a Green Method. In: *Nano Biomed. Eng.*, 2010, no.2(4), p.252-257.
- LOWRY, O., ROSEBOUGH, N., FARR, A. et. al. Protein measurement with the folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.*, 1951, vol.193, p.265-275.
- DEY, P., HARBORNE, J. *Methods in Plant Biochemistry. Carbohydr.* Academic Press, 1993, vol.2, 529 p.
- THAMMAKITI, S., SUPHANTHARIKA, M., PHAESUWAN, T., VERDUYN. Preparation of spent brewer's yeast β-glucans for potential applications in the food industry. In: *International Journal of Food Science & Technology*, 2004, no.39(1), p.21-29.



22. LIU, H.-Z., WANG, Q., LIU, H.-Y., FANG, F. Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *S. cerevisiae*. In: *Biotech. and Bioprocess Engineering*, 2009, vol.14(5), p.577-583.
23. ZHANG, Y.T., GU, W.Y. Determination of Mannose in Yeast by Ultraviolet Spectrometry. În: *Food. Ferment. Ind.*, 1999, no.5, p.32-36.
24. FRENGOVA, G., SIMOVA, E., GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultra filtrate. In: *Biotechnology and Bioeng.*, 1994, vol.44, no.8, p.288-294.
25. EL-BANNA, A., AMAL, M.A., EL-RAZEK, AHMED R. EL-MAHDY. Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. In: *Food and Nutrition Sciences*, 2012, no.3, p.64-71.
26. TĂMAȘ V., NEAMȚU G. *Pigmenți carotenoidici și metaboliti. Chimie și biochimie*. București, 1986, vol.1, 269 p.
27. AEBI, H. Catalase in Vitro. In: *Methods in Enzymology*, 1984, no.105, p.121-126.
28. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei. *Metodă de determinare a activității catalazei*. Brevet de invenție MD 4205. Inventatori: EFREMOVA, N., USATÎI, A., MOLODOI, E. BOPI, 2013, 2, p.26.
29. НЕКРАСОВА, Г.Ф., КИСЕЛЕВА И.С. *Экологическая физиология растений. Руководство к лабораторным и практическим занятиям*. Екатеринбург: Уральский государственный университет, 2008. 157 с.

**Date despre autori:**

**Agafia USATÎI**, doctor habilitat, profesor cercetător; șef LCȘ *Biotehnologia Levurilor*, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** usaty.i.agafia@gmail.com

**Natalia CHISELIȚA**, cercetător științific în LCȘ *Biotehnologia Levurilor*, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** chiselita.natalia@gmail.com

**Alina BEȘLIU**, doctorandă, Școala doctorală *Științe Biologice*, Universitatea de Stat „Dimitrie Cantemir”; cercetător științific stagiar la Institutul de Microbiologie și Biotehnologie.

**E-mail:** besliu.imb@gmail.com

*Prezentat la 08.02.2019*