

MICROBIOLOGIA ȘI BIOTEHNOLOGIA

UTILIZAREA NANOPARTICULELOR ZnO ÎN BIOTEHNOLOGIA CULTIVĂRII LEVURII *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Usatfi Agafia, Chiselița Natalia

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Rezumat

Lucrarea oferă informații noi despre influența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni și concentrații asupra tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, selectată ca producător de β -glucani. S-a constatat că nanoparticulele ZnO cu dimensiunile 10, 30, <50 și <100 nm în concentrații de la 0,5 până la 15,0 mg/L nu modifică semnificativ producția de biomasă celulară. O creștere semnificativă a producției de β -glucani s-a obținut în probele experimentale în care au fost aplicate nanoparticule cu dimensiuni de <50 nm, efectul de stimulare fiind dependent de concentrațiile aplicate. Aceste rezultate au contribuit la elaborarea unui procedeu nou de cultivare a tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, cu aplicarea nanoparticulelor ZnO, care asigură producerea cu 54,9-56,1% mai mulți β -glucani comparativ cu varianta de control.

Cuvinte cheie: nanoparticule ZnO, *Saccharomyces cerevisiae*, biomasă celulară, β -glucani.

Depus la redacție 13 martie 2019

Adresa pentru corespondență: Usatfi Agafia, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei, 1, mun. Chișinău, MD-2028, tel.+373(22)73-80-13, E-mail: usatyi.agafia@gmail.com

Introducere

În vederea dezvoltării posibilităților tehnologice de producere a noi bioproduse destinate diferitor ramuri ale economiei naționale, importante sunt cercetările detaliate ale efectelor nanoparticulelor asupra dezvoltării microorganismelor și sintezei metaboliților cu destinație biotehnologică. În acest sens s-a acumulat un material științific variat [9, 18, 21]. Este evident însă, că pentru a utiliza nanoparticulele în biotehnologia cultivării levurilor și obținerii produselor bioactive de diversă natură, sunt necesare cercetări suplimentare privitor la reacția lor la nanoparticule de diferit tip.

Din categoria nanoparticulelor cu perspectivă de aplicarea în diferite domenii fac parte nanoparticulele ZnO [7, 15]. În literatura de specialitate investigații raportate la elucidarea mecanismelor acțiunii nanoparticulelor ZnO asupra creșterii și dezvoltării microorganismelor sunt puține. Conform cercetărilor Ya-Nan Chang [19], mecanismul de influență a nano-oxidului metalici asupra celulei microbiene este complex și provoacă modificări atât în membrana celulară cât și în citoplasmă.

Din sursele bibliografice curente se cunoaște, că nanoparticulele oxidului de zinc stimulează sinteza β -glucozidazei (BGL) în celulele *Saccharomyces cerevisiae* [2]. Conform altor studii, nanoparticulele oxidului de zinc posedă activitate antimicrobiană și antifungică [5,13]. Nanoparticulele ZnO cu dimensiuni medii de $\sim 50 \pm 10$ nm, testate pe ciuperci patogene în concentrație de 100 mg/L, au demonstrat efect antimicotic evident [4]. Nanomaterialele oxidului de zinc, datorită proprietăților antimicrobiene sunt încorporate într-o varietate de produse farmaceutice cu aplicații dermatologice, în creme, loțiuni și unguente [10].

Proprietățile importante ale β -glucanilor izolați din pereții celulari, cum ar fi activitatea imunomodulatoare și imunostimulatoare [17], anticancerigenă [16, 20] antivirală și antibacteriană [12] sunt promițătoare în contextul consumului uman și animal.

Sumând informațiile expuse, considerăm oportune cercetările orientate spre stabilirea parametrilor optimali de aplicare a nanoparticulelor ZnO în procesul de cultivare a tulpinii producătoare de β -glucani și elaborarea procedurii de sporire a performanțelor biotehnologice.

Material și metode

Obiect de studiu. În cadrul cercetărilor s-a utilizat tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, selectată ca producător de β -glucani [3], păstrată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

Pentru cultivarea submersă a levurii s-a utilizat mediul YPD ce conține g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie - 10 ml; apă potabilă – 1.0 L, pH 5.5 [1]. Cultivarea s-a efectuat în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1,0 L, pe agitator cu

viteza de rotație 200 rot./min, la temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durata de cultivare submersă 120 ore. Mediul lichid de fermentare a fost însemănat în volum de 5% cu inocul 2×10^6 celule/mL, preparat pe mediul YPD.

Nano-oxizi metalici: În cercetări au fost utilizate nanoparticule (NP): ZnO cu dimensiuni de 10 nm și 30 nm, stabilizate în Polyvinylpyrrolide (PVP), sintetizate și puse la dispoziția noastră cu multă amabilitate de către cercetătorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii "D. Ghițu" [6]. 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 $> 10,8 \text{ m}^2/\text{g}$ (Sigma-Aldrich) și ZnO cu dimensiuni < 100 nm, sub formă de pulbere, puritate 80%, aria suprafeței $15\text{-}25 \text{ m}^2/\text{g}$ (Sigma-Aldrich). Soluția stoc de nanoparticule a fost preparată conform metodei expuse de Otero-Gonzalez et al. [11].

Metode de analiză. Producția de biomasă levuriană s-a determinat gravimetric [8]. β -glucanii au fost extrași din biomasă levuriană și determinați gravimetric conform procedurii Thammakiti et al. [14]. Prelucrarea statistică a rezultatelor s-a realizat cu ajutorul setului de programe Statistica 7, veridicitatea în comparație cu martorul - $p \leq 0,05$.

Rezultate și discuții

Ținând cont de faptul că, în biotehnologia cultivării microorganismelor, utilizarea nanoparticulelor poate spori capacitatea de absorbție a nutrienților necesari și implicit se pot produce modificări în procesele metabolice, în lucrarea de față s-a investigat influența nanoparticulelor de ZnO cu diferite dimensiuni și concentrații asupra producției de biomasă și biosintezei β -glucanilor la tulpina de interes biotehnologic *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. S-a cercetat influența a patru dimensiuni (10, 30, < 50 și < 100 nm) a nanoparticulelor ZnO, aplicând concentrațiile de la 0,5 la 15 mg/L.

Evaluarea productivității de biomasă, obținută la 1 L mediu nutritiv, a relevat o stabilitate relativă pentru levura cultivată în prezența nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni diferite. Astfel, suplینirea mediului nutritiv cu nanoparticule de dimensiunea 30 nm, în concentrație de 1-15 mg/L, duce la micșorarea cantității de biomasă cu 11-16% (fig.1).

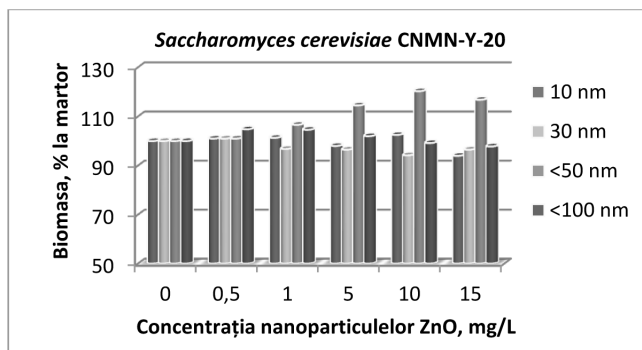


Figura 1. Conținutul de biomasă *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni și concentrații.

Prin cercetarea acțiunii nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni < 100 nm, în concentrație de la 0,5 până la 15 mg/L, deasemenea s-au stabilit diferențe nesemnificative ale valorilor producției de biomasă. Cantitatea de biomasă uscată în probele experimentale variază în jurul la 5,25...5,63 g per 1 L mediu nutritiv, ceea ce constituie 97,7% -

104,8% din proba martor, în care cantitatea de biomasă este de $5,37 \pm 0,48$ g/L. Majorare semnificativă a cantității de biomasă s-a observat în cazul suplînirii mediului nutritiv cu nanoparticule ZnO de dimensiunea <50 nm, efectul stimulatîv fiind dependent de concentrațiile aplicate. Astfel, conform cantității de biomasă obținute, efect stimulatîv sporit posedă nanoparticulele în concentrație 5-15 mg/L, care stimulează acumularea de biomasă cu pînă la 20,3% comparativ cu probele martor. Prin urmare, rezultatele indică implicarea nanoparticulelor ZnO în procesul de dezvoltare a levurii.

Deoarece în cercetare s-au utilizat nanoparticule care sunt puțin studiate în biotehnologia levurilor producătoare de β -glucani, problema ce ține de evidențierea producției polizaharidelor rămîne în centrul atenției. În acest sens, a fost inițiat studiul de elucidare a concentrației maximal eficiente pentru a obține o producție sporită de β -glucani.

Determinarea cantitatîvă a conținutului de β -glucani, în pereții celulari ai levurii la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni 10 nm, 30 nm și <100 nm, a pus în evidență modificări de ordin minor. Valorile conținutului de β -glucani în pereții celulari din probele experimentale cu ZnO <100 nm, variază în limitele 21,36 – 23,71%, în proba martor β -glucanii constituie 21,02 % la s.u. O sporire cu 12-12,8% a cantității de β -glucani s-a constatat la aplicarea concentrațiilor de 1 și 5,0 mg/L, valori care sunt mai mici față de efectele nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni <50 nm (Figura 2).

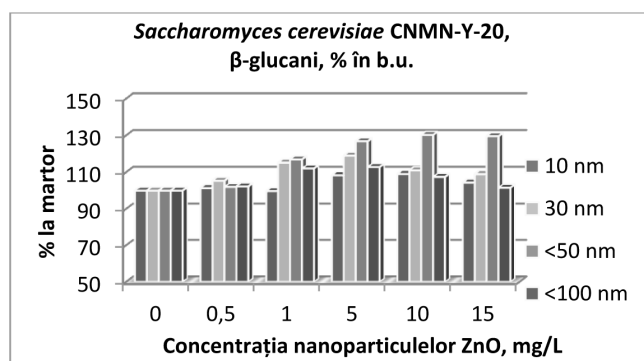


Figura 2. Conținutul de β -glucani în biomasă *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni și concentrații.

Cercetările de determinare cantitatîvă a β -glucanilor în biomasă levurii la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de <50 nm a pus în evidență modificări pozitive. Conținutul de β -glucani în biomasă celulară din variantele cu utilizarea nanoparticulelor a înregistrat un spor mai mare comparativ cu cele din variantele cu aplicarea nanoparticulelor cu dimensiuni de 10, 30 și <100 nm. Valorile conținutului de β -glucani în biomasă uscată din probele experimentale cu ZnO (<50 nm) variază în limitele 19,91% – 23,73%, în proba martor β -glucanii constituie $17,82 \pm 1,06\%$. O creștere statistic veridică (cu 30,3-33,2 %) a conținutului de β -glucani s-a constatat pentru concentrațiile 10 și 15 mg/L.

În scopul detectării potențialelor dimensiuni și concentrații ale nanoparticulelor ZnO favorabile pentru a obține o producție maximală de β -glucani la o unitate de mediu nutritiv, au fost realizate experimente din care am selectat rezultate promițătoare pentru a propune o posibilă utilizare a nanoparticulelor în biotehnologia cultivării levurilor din genul *Saccharomyces*.

Generalizând rezultatele experimentale ale producției de β -glucani, calculată la 1 L mediu nutritiv, putem afirma că cantitatea maximală de produs se obține la cultivarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 cu utilizarea a 10-15 mg/L nanoparticulelor ZnO (<50 nm). Concentrațiile date asigură obținerea a 1,33-1,34 g/L β -glucani, ceea ce este cu 54,9-56,1 % mai mult față de martor (figura 3).

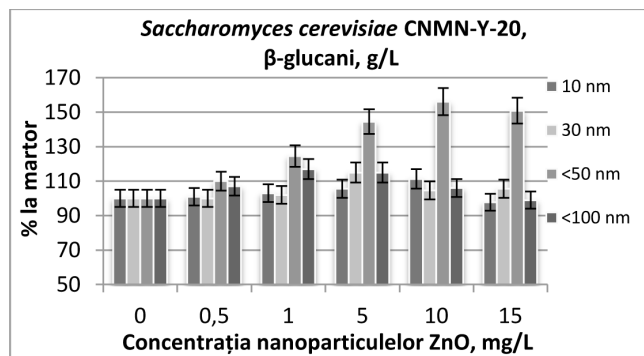


Figura 3. Valorile procentuale față de martor ale cantității de β -glucani la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, sub influența nanoparticulelor ZnO.

Astfel, rezultatele relevante obținute în experiențele de elucidare a influenței nanoparticulelor ZnO asupra biosintezei β -glucanilor permit de a propune un procedeu nou de aplicare a nanoparticulelor în biotehnologia cultivării levurii de interes biotehnologic *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20.

Realizarea procedurii. Se obține suspensia de levuri (inocul), crescută timp de 24 ore pe mediul YPD sau must de malt, care se inoculează în volum de 5% (inocul 2×10^6 celule/ml), în 200 ml mediu nutritiv YPD ce conține g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie – 10 ml; apă potabilă – 1.0 L, pH 5.5. În calitate de catalizator pentru stimularea biosintezei β -glucanilor, se adaugă în condiții sterile, nanoparticule ZnO cu dimensiunea <50 nm, în concentrații de 10- 15 mg/L. Cultivarea tulpinii se realizează în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1.0 L în condiții de agitare continuă, 200 r.p.m., la temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, în decurs de 120 ore. Ulterior, biomasa se colectează prin centrifugare la 3000 r.p.m., timp de 15 minute.

Procesul de extragere a β -glucanilor din biomasa levuriană se efectuează aplicând metoda Tammakiti et al. [14]. Conținutul maximal al β -glucanilor determinat în biomasa uscată constituie $23,22 \pm 0,5$... $23,73 \pm 0,32\%$ fiind cu 30,3...33,2 % superior matorului (tab.1). Recalculul cantității de β -glucani obținut la 1 L mediu de cultură indică o producție de 1,33...1,34 g/L, ceea ce este cu 54,9-56,1 % mai mult comparativ cu matorul.

Tabelul 1. Cantitatea de biomasa și conținutul de β -glucani la tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la cultivare pe mediul YPD în prezența nanoparticulelor ZnO (<50 nm).

Concentrația nanoparticulelor ZnO (<50 nm), mg/L	Biomasa uscată		B-glucani		B-glucani	
	g/L	% la martor	% în biomasa uscată	% la martor	g/L mediu de cultură	% la martor
0,0	$4,82 \pm 0,59$	100	$17,82 \pm 1,06$	100	$0,862 \pm 0,14$	100
1	$5,14 \pm 0,65$	106,6	$20,65 \pm 0,12$	117	$1,073 \pm 0,03$	124,5
5	$5,52 \pm 0,3$	114,5	$22,60 \pm 0,38$	126,8	$1,246 \pm 0,02$	144,5
10	$5,80 \pm 0,4$	120,3	$23,22 \pm 0,55$	130,3	$1,346 \pm 0,03$	156,1

15	5,63±0,10	116,8	23,73±0,32	133,2	1,335±0,05	154,9
20	5,60±0,82	116,1	23,10±0,32	129,6	1,293±0,06	150,0
30	5,06±0,34	105,0	23,11±0,52	129,7	1,171±0,09	147,3
50	5,26±0,74	109,1	21,48±0,87	120,5	1,126±0,02	130,6
70	5,49±0,49	113,9	19,91±0,81	119,3	1,094±0,09	126,9

✓ $P \leq 0,05$

Astfel, esența cercetărilor realizate constă în elucidarea efectelor nanoparticulelor oxidului de zinc în vederea sporirii potențialului bioproductiv al levurilor și elaborarea unui procedeu inovativ de producere a β -glucanilor. O asemenea abordare a permis selectarea dimensiunilor și concentrațiilor nanoparticulelor cu activitate stimulatorie înaltă asupra celulelor levuriene, ceea ce este o soluție inovativă pentru biotehnologiile contemporane.

Concluzii

1. Dintre nanoparticulele ZnO cu diferite dimensiuni, aplicate la cultivarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, mai active au fost cele cu dimensiunea <50 nm, în concentrații de 10 și 15 mg/L, care au manifestat o creștere statistic veridică a producției de biomasă și conținutului de β -glucani.
2. Procedeu elaborat de cultivare a tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, cu aplicarea nanoparticulelor ZnO (<50 nm), asigură conform rezultatului tehnic, producerea de β -glucani cu 54,9-56,1 % mai mult comparativ cu varianta de control.

Bibliografie

1. 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. //Letters in Applied Microbiology. 2003, 37, 268-274.
2. Ban Deependra Kumar, Subhankar Paul. Zinc Oxide Nanoparticles Modulates the Production of β -Glucosidase and Protects its Functional State Under Alcoholic Condition in *Saccharomyces cerevisiae*. //Appl. Biochem Biotechnol, 2014, 173, 155–166 DOI 10.1007/s12010-014-0825-2
3. Brevet de invenție MD 4048. Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* – sursă de β -glucani. /Chiselița, O., Usatii, A., Taran, N., Rudic, V., Chiselița, N., Adajuc, V., BOPI, 6/2010.
4. El-Diasty Eman M., Ahmed M.A., Nagwa Okasha, Salwa F. Mansour, Samaa I. EL-Dek, Hanaa M. Abd el-Khalek, Mariam H. Youssif. Antifungal activity of Zinc Oxide Nanoparticles against dermatophytic lesions of cattle. //Romanian J. Biophys., Bucharest, 2013, 23, 3, 191–202.
5. Espita, P., Soares, N. F., Teofilo R. F. et al. Optimized dispersion of ZnO nanoparticles and antimicrobial activity against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. //J. Nanopart. Res., 2013, 15, 13-24. doi 10.1007/s11051-012-1324-4.
6. Gutul, T., Rusu, E., Condur, N., Ursaki, V., Goncarenco, E., Vlazan, P. Preparation of poly(N-vinylpyrrolidone)-stabilized ZnO colloid nanoparticles. //Beilstein J. Nanotechnol., 2014, 5, 402–406. doi:10.3762/bjnano.5.47.
7. Hassan A. A., Howayda, M.E., Mahmoud H.H. Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Growth of Mycotoxigenic Mould. //Studies in Chemical Process Technology (SCPT), 2013, 1, 4, 66-74.
8. Hong-Zhi, Liu., Wang, Q., Yin, H. Immunoactivities and antineoplastic activities of activities of *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein. //Carbohydrate Polymers, 2011, 83, 1690-1695.
9. Ingale, A. G., Chaudhari A. N. Biogenic Synthesis of Nanoparticles and Potential Applications: An Eco-Friendly Approach. //J. Nanomed. Nanotechnol., 2013, 4:2, 165-172. doi:10.4172/2157-7439.1000165
10. Martinez, F.E., Negrete, J., Torres, V.G. Structure and properties of Zn-Al-Cu alloy reinforced

with alumina particles. //Mater. Des., 2003, 24, 281–286.

11. Otero-Gonzalez Lila, Citlali Garcia-Saucedo, James A. Field, Reyes Sierra-Alvarez. Toxicity of TiO₂, ZrO₂, FeO, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. //Chemosphere, 2013, 93, 1201–1206.

12. Rondanelli M, Opizzi A, Monteferrario F. The biological activity of beta-glucans. // Minerva Med., 2009, 100(3), 237–245.

13. Shi, L.E., Liangying, X., Baochao, H., Hongjuan, G., Xiaofeng, G., Zhenxing, T. Inorganic nano mental oxides used as anti-microorganism agents for pathogen control. //Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Vol I, A. Méndez-Vilas ed., FORMATEX, Badajoz, 2010, pp. 361–368

14. Thammakiti, S.; Suphantharika, M.; Phaesuswan, T.; Verduyn. Preparation of spent brewer's yeast β-glucans for potential applications in the food industry //International Journal of Food Science&Technology, 2004, 39(1), 21–29.

15. Vaseem Mohammad, Ahmad Umar, Yoon-Bong Hahn. ZnO Nanoparticles: Growth, Properties, and Applications. Metal Oxide Nanostructures and Their Applications. Chapter 4. ISBN: 1-58883-170-1 Copyright © 2010 by American Scientific Publishers All rights of reproduction in any form reserved. Edited by Ahmad Umar and Yoon-Bong Hahn Volume 5: Pages 1–36.

16. Volman, JJ, Mensink, RP, Ramakers, JD, Winther, MP, Carlsen, H., Blomhoff, R, Buurman, WA, Plat, J. Dietary (1-->3),(1-->4)-beta-D-glucans from oat activate nuclear factor-kappa B in intestinal leukocytes and enterocytes from mice. //Nutr Res., 2010, 30(1), 40–48.

17. Volman, JJ, Ramakers, JD, Plat, J. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. //Physiol Behav., 2008, 23/94(2), 276–284.

18. Wang, E.C., Wang, A.Z. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. //Integr. Biol., 2014, 6, 9–26. DOI: 10.1039/c3ib40165k

19. Ya-Nan Chang, Mingyi Zhang, Lin Xia, Jun Zhang and Gengmei Xing. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. //Materials, 2012, 5, 2850–2871. doi:10.3390/ma5122850

20. Yoon Taek J., Kim Tack J., Lee H., Shin Kwang S., Yun, Y., Moon W. Anti-tumor metastatic activity of β-glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. // International Immunopharmacology. 2008, 8(1), 36–42.

21. Zaman, M., Ahmad, E., Qadeer, A., Rabbani, G., Khan, R.H. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. //International Journal of Nanomedicine, 2014, 9, 899–912.