

MICROBIOLOGIA ȘI BIOTEHNOLOGIA

EFFECTUL NANOPARTICULELOR TiO_2 ASUPRA CONȚINUTULUI DE POLIZAHARIDE ȘI PIGMENȚI CAROTENOIDICI LA LEVURI

Usatîi Agafia, Chiselița Natalia, Molodoi Elena, Bejenaru Ludmila,
Chirița Elena, Beșliu Alina, Efremova Nadejda, Borisova Tamara

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Rezumat

Lucrarea oferă informații noi despre influența diferitor concentrații de nanoparticule TiO_2 asupra conținutului de carbohidrați totali, manoproteine, β -glucani, pigmenți carotenoidici la levuri. S-a constatat că nanoparticulele dioxidului de titan, în concentrații de 0,5-5,0 mg/L nu modifică semnificativ procesul de acumulare a carbohidraților la tulpinile *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 și *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, dar în concentrații de 10,0 – 15,0 mg/L pot asigura o înmagazinare pronunțată a carbohidraților totali și manoproteinelor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18. Sporirea randamentului de acumulare a β -glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, se produce la cultivare pe mediul nutritiv suplimentat cu nanoparticulele dioxidului de titan în concentrații de 10,0-15,0 mg/L. Nanoparticulele TiO_2 manifestă efect de toxicitate asupra acumulării pigmentilor carotenoidici la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, factorul concentrației este unul determinant, coeficientul de determinare este de $R^2 = 0,67$. Proprietățile depistate ale NPs TiO_2 prezintă oportunitate de aplicare în biotehnologia cultivării levurilor și obținerii unor componente polizaharidice.

Cuvinte cheie: NPs TiO_2 , *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, carbohidrați, β -glucani, manoproteine, carotenoide.

Depus la redacție 09 octombrie 2015

Adresa pentru corespondență: Usatîi Agafia, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; tel. (+37322)73-80-13; E-mail: usaty.agafia@gmail.com

Introducere

Proprietățile unice și utilitatea nanoparticulelor (NPs) permit de a le aplica în diferite domenii: biologie, medicină, chimie, fizică etc. [15, 19, 20]. Se consideră că nanoparticulele de Fe, Zn, Mg, elemente esențiale conform proprietăților sale noi, pot modifica căile metabolice la organismele vii [5, 12]. Nanomateriale pe bază de nanoparticule metalice (CuO NPs, F₃O₄ NPs) se propun a fi utilizate în medicină ca remedii cu efect citotoxic [3, 23].

Există ipoteza că nanoparticulele influențează dezvoltarea microorganismelor. În lucrările mai multor autori sunt expuse rezultatele efectului diferitor NPs (oxizi ai Au, Ag, Ti, Si, Zn) asupra celulei microbiene din care concluzionăm că acestea, în dependență de compoziție și concentrație, pot stimula sau inhiba creșterea microorganismelor [2, 8, 10, 18]. Mudasir A. et al. [16] argumentează o posibilă utilizare în medicină a nanoparticulelor de Ag sintetizate biologic, elucidând activitatea antimicrobiană înaltă asupra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* și *Candida albicans*.

Comparativ cu alți agenți antimicrobieni, TiO₂ atrage atenție datorită stabilității înalte, nu este toxic pentru mediul inconjurator, este ieftin, posedă activități bioactive, etc. Conform rezultatelor din literatura de specialitate, concentrația minimă inhibitoare (MIC - minimum inhibitory concentration) a nanoparticulelor este variată și depinde de microorganismul cercetat. Spre exemplu, pentru *Escherichia coli* și *Candida albicans* MIC a NPs TiO₂ constituie 9,7 μg. ml⁻¹, iar pentru *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* MIC este de 19,0-19,5 μg.ml⁻¹[17]. Posibile mecanisme de influență a nanoparticulelor TiO₂ la nivel celular au fost cercetate de către mai mulți specialiști în domeniu [9,14] care au elucidat unele procese ce au loc în cazul aplicării NPs.

Cele expuse mai sus determină importanța de a evidenția efectul nanoparticulelor asupra producerii de metaboliți la diferite genuri de levuri în vederea dezvoltării posibilităților tehnologice de producere a noi bioproduse destinate diferitor ramuri ale economiei naționale.

În acest studiu nanoparticulele TiO₂ au fost utilizate ca model pentru elucidarea efectelor asupra producerii polizaharidelor și pigmentilor carotenoidici la levurile din genul *Saccharomyces* și *Rhodotorula*.

Materiale și metode

Obiecte de studiu, medii de cultură, condiții de cultivare. În cadrul cercetărilor s-au utilizat tulpinile de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, selectată ca producător de β-glucani [4], *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, selectată ca producător de manani [24], levura pigmentată *Rhodotorula gracililis*– CNMN-Y-30, selectată ca producător de carotenoide. Tulpinile sunt păstrate în colecția Laboratorului Biotehnologia Levurilor și în Colecția de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

În cercetări s-au utilizat nanoparticule TiO₂, elaborate de cercetătorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii al Academiei de Științe a Moldovei. Concentrațiile nanoparticulelor utilizate în experiențe la cultivarea levurilor au constituit 0,5; 1; 5; 10 și 15 mg/L. În calitate de martor s-a cercetat varianta fără aplicarea nanoparticulelor.

Pentru inoculare și cultivarea submersă a levurilor s-a utilizat mediul YPD [1]. Cultivarea submersă s-a efectuat în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1,0 L, pe agitator cu viteza de rotație 200 r.p.m., la temperatura de 25°C, gradul de aerare 81,3...83,3 mg/L, durata de cultivare submersă 120 ore. Mediul lichid de fermentare s-a însământat în volum de 5% cu inocul 2×10^6 celule/ml. Conținutul de oxigen s-a măsurat cu Oximetrul portabil – Oxi-315i/SET 2B10-0011. Valorile pH-ului mediului de cultivare s-au determinat cu pH-316i MeBketten WTW, Germania.

Metode de cercetare. Carbohidrații totali în biomasa de levuri au fost măsurați la spectrofotometrul PG T60 VIS Spectrophotometer la lungimea de undă 620 nm cu utilizarea reactivului antron și D-glucozei în calitate de standard [6]. β -glucanii au fost determinați gravimetric conform procedurii [22]. *Manoproteinele* au fost determinate gravimetric conform metodei [13,25]. *Pigmenții carotenoidici* au fost extrași din biomasa levuriană și cuantificați spectrofotometric aplicând metoda [7,11]. 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

În cadrul expertiențelor au fost monitorizați diferiți parametri principali: conținutul de carbohidrați totali, manoproteine, β -glucani, carotenoide individuale și totale extrase din levuri. Studiarea și evidențierea particularităților de acțiune a nanoparticulelor dioxidului de titan asupra conținutului de carbohidrați în biomasă a pus în evidență valori diferite în funcție de tulpina levuriană și concentrația utilizată de nanoparticule. În variantele experimentale de cultivare a tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 sub influența nanoparticulelor TiO_2 în diapazonul de concentrații 0,5, 1,0 5,0, 10,0 și 15,0 mg/L s-a înregistrat o stabilitate relativă pentru conținutul de carbohidrați. Același efect s-a observat și în cazul tulpinii pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, la care, sub acțiunea concentrațiilor examinate ale nanoparticulelor, cantitatea de carbohidrați variază în intervalul 24,7 - 29,5 % la s.u., demonstrând un nivel asemănător martorului ce conține 25,7% la s.u. (fig. 1).

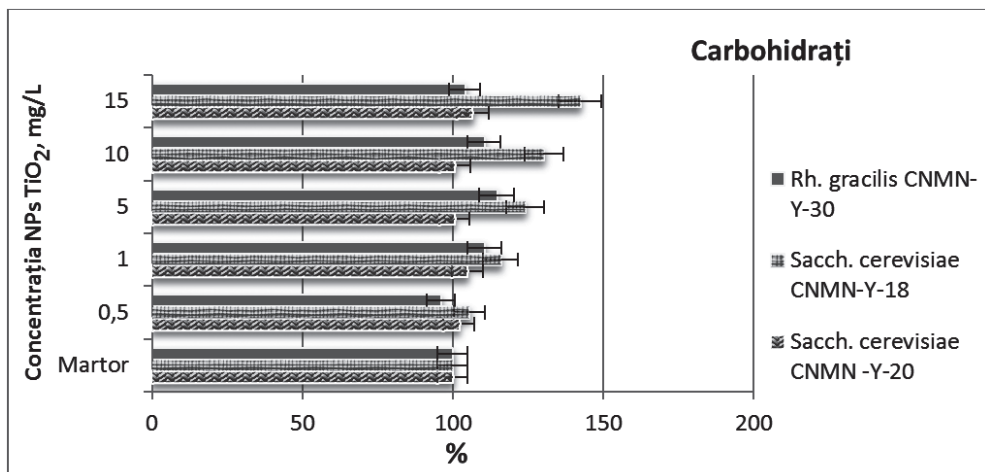


Figura 1. Efectele nanoparticulelor TiO_2 asupra acumulării carbohidraților la tulpinile de levuri.

Analiza statistică a rezultatelor obținute la cultivarea altei tulpini *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, a pus în evidență valori diferite ale cantității de carbohidrați care, în variantele experimentale cu 10-15 mg/L nanoparticule TiO_2 , depășesc martorul cu 30,3...42,3 % (fig. 1). Astfel, în cercetările cu implicarea levurilor a fost demonstrat că nanoparticulele TiO_2 se manifestă ca reglatori și în funcție de tulpina levuriană pot asigura o acumulare pronunțată a carbohidraților.

Pornind de la faptul că efectul stimulator al NPs TiO_2 asupra conținutului de carbohidrați este vizibil la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 a fost considerată oportună aplicarea nanoparticulelor în scopul modificării conținutului de manoproteine. Analiza rezultatelor indică că toate concentrațiile de nanoparticule stimulează procesul de acumulare a manoproteinelor în peretele celular, mai semnificative fiind 10,0 și 15,0 mg/L a NPs TiO_2 care sporesc cu 19 - 22,6 % comparativ cu probele martor cantitatea de manoproteine acumulate în biomasa levuriană (fig. 2).

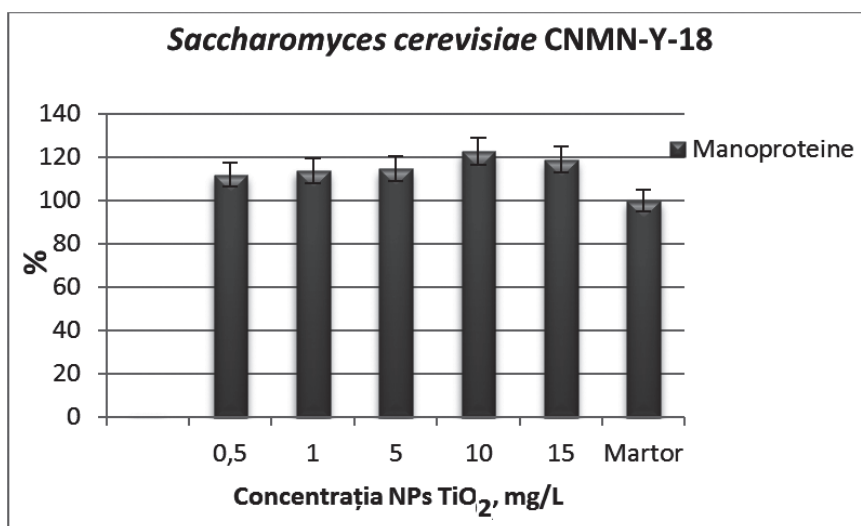


Figura 2. Conținutul de manoproteine în biomasa *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, cultivată în prezența nanoparticulelor TiO_2

Determinarea altei componente glucidice, a conținutului de β -glucani, a pus în evidență că în biomasa levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor TiO_2 , au loc variații nesemnificative comparativ cu proba martor. Astfel, o ușoară sporire a conținutului de β -glucani s-a observat la aplicarea concentrațiilor de 10,0 - 15,0 mg/L, conținutul β -glucanilor constituie de la 18,8% la 21,0 % la s.u., ceea ce este cu 7,2-19,8 % mai mult comparativ cu martorul (fig. 3). La concentrații mai mici - 0,5-5,0 mg/L a nanoparticulelor TiO_2 , efectul de stimulare asupra acumulării β -glucanilor lipsește.

Rezultatele analizei modificării conținutului de pigmenți carotenoidici, care reprezintă compuși cu proprietăți antioxidante, indică că pe durata cultivării levurii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, acesta este în scădere direct proporțională cu concentrația NPs TiO_2 . Reducerea semnificativă a pigmenților se observă în toate variantele experimentale, mai semnificativă fiind varianta de mediu

suplimentat cu 15 mg/L nanoparticule, în care conținutul de pigmenți s-a redus cu 67 % (fig. 4). Posibil, unul din mecanismele blocării formării pigmenților carotenoidici constă în afectarea de către radicalii liberi a segmentelor membranei celulare ce răspund de sinteza carotenoidelor.

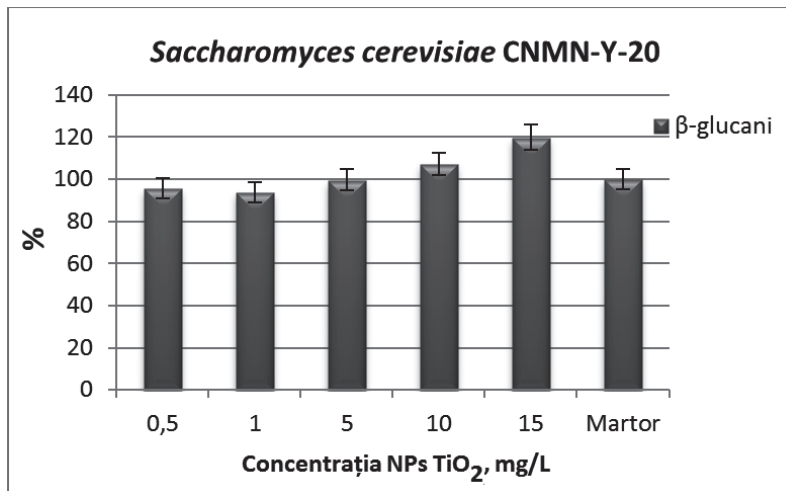


Figura 3. Conținutul de β-glucani în biomasa *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor TiO₂

Pentru a stabili rolul NPs TiO₂ în cultivarea levurii pigmentate *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 a fost efectuată analiza corelațională dintre concentrațiile nanoparticulelor utilizate și conținutul de carotenoide. Dependența dintre concentrațiile NPs TiO₂ utilizate la cultivarea tulpinii de levuri este exprimată prin coeficientul de determinare de $R^2 = 0,67$. Prin urmare în 67 % de cazuri, concentrația de nanoparticule determină acumularea de pigmenți carotenoidici.

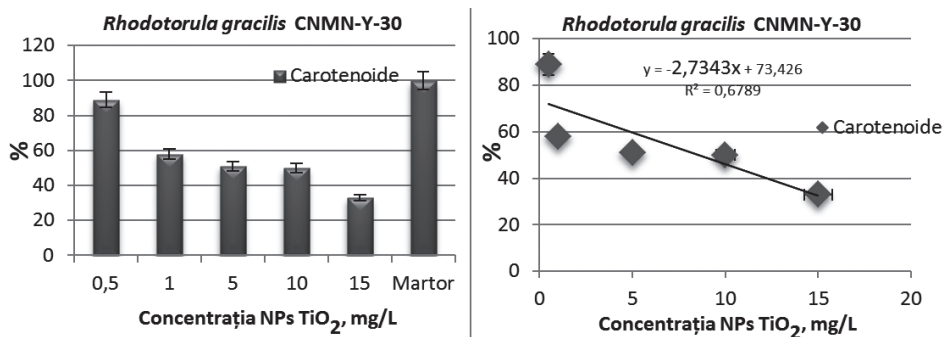


Figura 4. Efectul nanoparticulelor TiO₂ asupra conținutului de carotenoide la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

Atrage atenție faptul că, sub influența nanoparticulelor TiO₂ proporția dintre cantitatea de caroten, torulină, torularhodină nu se modifică esențial, în majoritate fiind β-carotenul (fig. 5). Acest fenomen ne indică că nanoparticulele dioxidului de titan nu afectează căile de formare a carotenoidelor pigmentate conform cărora β-carotenul este predecesorul torulinei, iar torulina - predecesorul torularhodinei, dar presupunem că

influențează procesul de biosinteză a altor componente, cum ar fi formarea compușilor incolori cu lanțul de carbon C_{40} care stau la baza fazelor următoare de ciclizare și formare a lanțurilor de atomi ai carbonului mai mari de C_{40} [21].

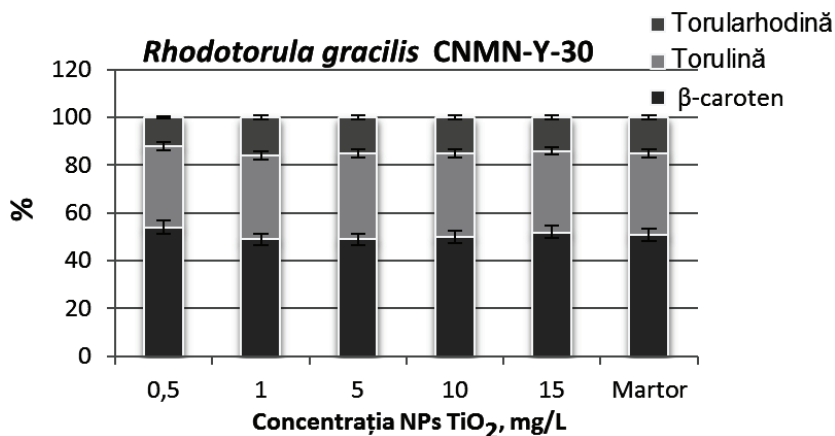


Figura 5. Efectul nanoparticulelor TiO_2 asupra conținutului de β -caroten, torularhodină la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30.

Astfel, în premieră au fost efectuate cercetări pentru stabilirea posibilității de utilizare a nanoparticulelor TiO_2 în biotehnologia cultivării levurilor și obținerii unor componente polizaharidice și pigmenților carotenoidici. Rezultatele obținute au demonstrat eficiența utilizării nanoparticulelor TiO_2 la cultivarea tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 pentru sporirea capacităților de biosinteză a carbohidraților totali și manoproteinelor și a tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 pentru elevarea randamentului de acumulare a β -glucanilor. Reducerea semnificativă a conținutului de pigmenți observată în toate variantele experimentale cu *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 indică necesitatea examinării mai minuțioase a influenței altor concentrații a nanoparticulelor.

Concluzii

Nanoparticule TiO_2 nu modifică semnificativ procesul de acumulare a carbohidraților la tulpinile *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 și *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, dar în concentrații de 10,0 – 15,0 mg/L pot asigura o înmagazinare pronunțată a carbohidraților totali și manoproteinelor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18.

Sporirea randamentului de acumulare a β -glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, se produce la cultivare pe mediul nutritiv suplimentat cu nanoparticulele dioxidului de titan în concentrații de 10,0 - 15,0 mg/L.

Nanoparticulele TiO_2 manifestă efect de toxicitate asupra acumulării pigmenților carotenoidici β -caroten, torulină, torularhodină la tulpina *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30, factorul concentrației este unul determinant, coeficientul de determinare este de $R^2 = 0,67$. Proprietățile depistate ale NPs TiO_2 prezintă oportunitate de aplicare în biotehnologia cultivării levurilor și obținerii unor componente polizaharidice.

Investigațiile au fost realizate în cadrul proiectului 15 817 05 16A finanțat de CSSDT al AȘM.

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. *Buteică Sandra Alice.* Nanoparticule de oxid de fier cu înveliș polar: proprietăți și perspective biomedicale. Rezumat Teză de doctorat, Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova, Craiova, 2014, 11p.
4. *Chiselița O., Usatii A., Taran N., Rudic V., Chiselița N., Adajuc V.* Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* – sursă de β -glucani. Brevet de invenție MD 4048. MD-BOPI, 6/2010.
5. *Darrius Guiden, Vinayak Dravid, Ming Su, Lei Fu.* Smart Therapy: The Multivariate Potentials of Iron Oxide Nanoparticles in Drug Delivery. //Nanoscape, Spring 2004, Issue 1, 71-75.
6. *Dey, P.; Harborne, J.* Methods in Plant Biochemistry. Carbohydr. Academic Press, 1993, vol. 2, 529 p.
7. *El-Banna Amr A., Amal M. A. El-Razek, Ahmed R. El-Mahdy.* Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. //Food and Nutrition Sciences, 2012, 3, 64-71.
8. *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, Vol. 23, No. 3, P. 191–202
9. *El-Said Karim Samy, Ehab Mostafa Ali, Koki Kanehira, Akiyoshi Taniguchi.* Molecular mechanism of DNA damage induced by titanium dioxide nanoparticles in toll-like receptor 3 or 4 expressing human hepatocarcinoma cell lines. //Journal of Nanobiotechnology 2014, 12:48.
10. *Espita Paula Judith Perez, Nilda de Fátima Ferreira Soares, Jane Sélia dos Reis Coimbra, Nélío José de Andrade, Renato Souza Cruz, Eber Antonio Alves Medeiros.* Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. //Food Bioprocess Technol, 2012, 5:1447–1464 DOI 10.1007/s11947-012-0797-6
11. *Frengova G., Simova E., Grigorova D.* Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultra filtrate. //Biotechnology and Bioeng., 1994, 44, 8, 288-294
12. *Hassan A.A., M.E. Howayda, H.H. Mahmoud.* Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Growth of Mycotoxigenic Mould. //Studies in Chemical Process Technology (SCPT), 2013, 1, 4, 66-74.
13. *Liu Hong-Zhi., et al.* Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *S. cerevisiae*. //Biotech. and Bioprocess Engineering, 2009, vol. 14(5), 577-583.
14. *Minju Jeong, Jeong Min Park, Eun Jeong Lee, Yea Seul Cho, Chunghyun Lee, Jeong Moo Kim, Sang Soo Hah.* Cytotoxicity of Ultra-pure TiO₂ and ZnO Nanoparticles Generated by Laser Ablation. //Bull. Korean Chem. Soc. 2013, Vol. 34, No. 11 3301-3306.
15. *Mrinmoy De, Partha S. Ghosh, and Vincent M. Rotello.* Applications of Nanoparticles in Biology. Adv. Mater. 2008, 20, 4225–4241 DOI: 10.1002/adma.200703183.
16. *Mudasir A. Dar, Avinash Ingle, Mahendra Rai.* Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. //Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2013, 9, 1, 105-110.
17. *Pişkin Sabriye, Arzu Palantöken, and Müge Sari Yılmaz.* Antimicrobial Activity of Synthesized TiO₂ Nanoparticles. //International Conference on Emerging Trends in Engineering

and Technology (ICETET'2013) Dec.7-8, 2013. PatongBeach, Phuket (Thailand).<http://dx.doi.org/10.15242/IEE.E1213004>.

18. Rai, M. N., Duran (eds.), Metal Nanoparticles in Microbiology. DOI 10.1007/978-3-642-18312-6_1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011, 305 p.

19. Simion, A. Radoi, R. Gavrilă, A. Dinescu, M. Danila, M. Miu, D. Dascalu. Materiale nanostructurate: aplicatii practice in nanomedicina si bio-senzoristica. Workshop-ul „Nano Sisteme Dinamice: de la Concepte la Aplicatii Senzoristice” Centrul International de Biodinamica , București , 22-23 SEPTEMBRIE 2010, p.26.

20. Syed A Jamal. Application of Nanoparticles of Ceramics, Peptides, Silicon, Carbon, and Diamonds in Tissue //Engineering. Chemical Sciences Journal, Vol. 2013: CSJ-91, 1-10.

21. Sympson K.O., Nakayama T.C., Chichester C.O. Biosynthesis of yeast carotenoids. //J. Bacterial., 1964, 88, 6, 1688-1694.

22. Thammakiti, S.; Suphantharika, M.; Phaesuwan, 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.

23. Tingting Sun., Yiwu Yan., Yan Zhao, Feng Guo, Chengyu Jiang. Copper Oxide Nanoparticles Induce Autophagic Cell Death in A549 Cells. //PLOS ONE. August 2012, Volume 7, Issue 8, e43442 p.1-7.

24. Usatii Ag., Molodoi, E., Efremova, N., Chiselița, N., Borisova, T., Fulga L. Tulpină de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* – producătoare de manani. Brevet de invenție MD 4216, BOPI 4/2013, p. 24.

25. Zhang Y.T., Gu W.Y. Determination of Mannose in Yeast by Ultraviolet Spectrometry. //Food. Ferment. Ind. 1999, 5, 32-36.