

## **NANOPROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI PREPARAT LIPOLITIC AUTOHTON ÎN BAZA TULPINII DE MICROMICETE *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 01**

**Bivol Cezara, Ciloci Alexandra, Tiurina Janneta, Labliuc Svetlana,  
Dvornina Elena, Clapco Steliana**

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Republica Moldova*

### **Rezumat**

Lucrarea prezintă rezultatele studiului de obținere a unui preparat enzimatic lipolitic autohton, competitiv, în baza tulpinii de micromicete *Aspergillus niger* CNMN FD 01 cu utilizarea nano-oxidului  $\text{TiO}_2$  în calitate de factor de influență. Schema integrată de obținere a preparatului enzimatic cu grad de puritate 10x, cu o activitate lipolitică de 750000 u/g și o activitate specifică de 2205 u/mg proteină, include cultivarea tulpinii *Aspergillus niger* CNMN FD 01 în prezanța a 10 mg/l nano-oxid  $\text{TiO}_2$  de dimensiunea 40nm timp de 5 zile, urmată de separarea lipazelor prin sedimentare cu alcool etilic de 96%. SDS-electroforeza proteinelor extrase din preparatele lipolitice obținute din *Aspergillus niger* CNMN FD 01, cultivată standard și în prezența nanoparticulelor  $\text{TiO}_2$ , a demonstrat asemănări și deosebiri evidente.

*Cuvinte cheie:* *Aspergillus niger*, lipaze, nanoparticule, TiO<sub>2</sub>, nanoprocedee.  
*Depus la redacție* 26 noiembrie 2020

*Adresa pentru corespondență:* Bivol Cezara, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, R. Moldova; E-mail: bivolcezara@yahoo.com; tel. (+373 22) 739824.

### Introducere

Enzimele lipolitice câștigă tot mai mult teren în diferite domenii ale industriei alimentare și ușoare [3], dar și medicină, în special în farmacoterapeutică sau ecologie, unde în ansamblu cu alte enzime hidrolitice sunt utilizate la purificarea apelor poluate și degradarea deșeurilor de diversă natură [11, 17].

O concepție inovativă în obținerea biotehnologică a lipazelor microbiene este utilizarea nanoparticulelor (NPs) în calitate de factori stimulatori și reglatori ai proceselor biosintetice ale microorganismelor [5, 8-10, 12, 15, 16, 19]. Nanoparticulele prezintă un instrument unic de manipulare a activității biosintetice a microorganismelor, cu eficiență confirmată pe obiecte biotehnologice din diverse grupe taxonomice, atât peste hotare, cât și la noi în țară în cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

Potențialul nanomaterialelor, deși apreciat ca enorm, este încă puțin studiat. Gradul de influență și descifrarea mecanismelor de acțiune a nanoparticulelor asupra organismelor vii reprezintă una dintre prioritățile biotehnologiei la etapa actuală.

Efectul nanoparticulelor este atribuit în primul rând dimensiunilor acestora care rezultă în facilitatea metodelor de străbateră a membranelor celulare, dar și capacității de adsorbție a lor pe suprafața membranelor biologice, care poate avea impact atât pozitiv, protector pentru celulă, cât și negativ, dereglând integritatea membranelor și, astfel, procesele metabolice [20]. Urmărind și alte proprietăți ale nanoparticulelor (capacitatea catalitică, potențialul  $\zeta$ , solubilitatea), acestea pot fi selectate și aplicate ca reglatori eficienți ai proceselor biotehnologice [23]. Numeroase publicații locale demonstrează că Republica Moldova dispune de resurse teoretice și materiale valoroase necesare pentru producerea locală a compușilor bioactivi [7, 18], inclusiv enzime lipolitice.

Elaborarea procedeelelor inofensive mediului de sinteză orientată a lipazelor microbiene, ce vizează implicarea tulpinilor producătoare locale, mediile nutritive ieftine în bază de subproduse ale industriei alimentare și aplicarea nanoparticulelor ca factor eficient de dirijare a proceselor biosintetice, oferă oportunități în obținerea preparatelor lipolitice autohtone competitive, la preț accesibil.

În contextul celor expuse, scopul cercetărilor a constat în elaborarea unor procedee de obținere a preparatelor lipolitice în baza tulpinii fungice locale *Aspergillus niger* CNMN FD 01, cu utilizarea în calitate de factor de influență a nanoparticulelor.

### Materiale și metode

Obiect de studiu a servit tulpina de fungi miceliali *Aspergillus niger* CNMN FD 01, distinsă prin capacitate înaltă și stabilă de sinteză a lipazelor exocelulare [6]. Cultura se păstrează în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie.

Cultivarea submersă a tulpinii a fost efectuată în baloane Erlenmeyer, capacitate de 0,5 L cu 100 ml mediu nutritiv, pe agitatoare la viteza de rotație 180-200 rot./min., la temperatura de 28-30 °C. Stabilirea duratei optime de cultivare a micromicetei ce

asigură manifestarea maximului de biosinteză a lipazelor s-a stabilit prin cultivarea tulpinii timp de 6 zile, cu prelevarea zilnică a probelor, în care s-a determinat activitatea lipazelor. Mediul lichid de fermentare a fost însămânțat cu inocul cu densitatea  $2-3 \times 10^6$  spori/ml, obținut prin spălarea cu apă distilată sterilă a culturii de 14 zile, crescută pe coloane oblice de maț-agar. Cantitatea inoculului în fiecare balon a fost 10 % v/v.

În calitate de mediu-martor a fost utilizat mediul cu componența (g/l): faină de soia - 35,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 5,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,0; pH 7,0-7,2.

În calitate de medii optimizate a fost utilizat mediul de bază suplimentat cu nanoparticulele  $\text{TiO}_2$  cu dimensiunea 40 nm, în concentrație extinsă de 1-15 mg/l. Nano- $\text{TiO}_2$  cu dimensiunea 40 nm a fost evidențiat în studiile anterioare ca biostimulator al procesului de lipidogeneză la tulpina *A. niger* CNMN FD 01 [1]. Nanoparticulele au fost introduse în mediul de cultivare concomitent cu materialul de inoculare. Nanomaterialele au fost sintetizate în cadrul Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D. Ghițu”.

pH-ul inițial al mediului nutritiv a fost modificat în limitele 4,0 (pH acid), 7,2 (pH neutru) și 9,0 (pH alcalin) pentru a evidenția condițiile optimale de cultivare a producătorului și de obținere a enzimelor lipolitice. Valorile pH-ului mediului de cultivare au fost determinate cu utilizarea pH-metrului InoLab.pH-720 WTW Germania (2001).

Izolarea lipazelor din lichidul cultural (LC) al micromicetei, separat de miceli prin filtrare, a fost efectuată prin sedimentarea cu alcool etilic de 96% răcit la  $-15^\circ\text{C}$ . Raportul LC:etanol de 96% a fost de 1:4, valoarea pH-ului de sedimentare au fost 7,0. Durata de contact dintre LC:etanol de 96% a fost 2 ore [2]. Sedimentul a fost separat din mediul de reacție prin centrifugare timp de 20 min. la 6000 rpm.

Cantitatea precipitatului, în g/l, a fost determinată gravimetric după uscare la temperatura camerei ( $20-22^\circ\text{C}$ ).

Activitatea lipolitică a fost dozată prin metoda modificată Otto-Yamad, după gradul de hidroliză a uleiului de masline în soluție de alcool polivinilic până la acidul oleinic. O unitate de activitate lipolitică a fost considerată cantitatea de enzime (cantitatea de preparat enzimatic) care determină formarea 1  $\mu\text{mol}$  acid oleinic din emulsia de 40 % ulei de măsline în alcool polivinilic în condițiile unui pH de 7,2 și temperaturii de  $37^\circ\text{C}$  în decurs de 1 oră [21].

Proteinele totale au fost dozate conform metodei Lowry, utilizând în calitate de standard albumina cristalină din serul bovinelor [14]. Determinarea activității enzimatică specifice a fost calculată per miligram de proteină conform următoarei ecuații: (u/mg) Activitatea specifică = activitatea enzimatică / cantitatea de proteine.

Analiza spectrului polipeptidic a proteinelor izolate din preparatele enzimatică a fost efectuată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă SDS-PAGE (15%) prin metoda descrisă de Laemmli [13]. Gelurile au fost nuanțate cu Coomassie Brilliant Blue R-250. În calitate de markeri proteici au servit următoarele proteine: Phosphorylase b (97,4kDa), Bovine serum albumin (67,0kDa), Egg albumin (45,0kDa), Carbonic anhidrază (29,0kDa), Trypsin inhibitor (21,0kDa).

Datele experimentale au fost supuse prelucrării statistice de rutină [22].

### Rezultate și discuții

Studiul anterior din cadrul laboratorului Enzimologie al IMB a evidențiat efectul stimulator al nanoparticulelor de  $\text{TiO}_2$  de dimensiunea 40 nm asupra activității lipolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 01, care în concentrația de 10 mg/l au determinat

atât un spor considerabil al activității enzimatică de peste 1,5 ori, cât și o accelerare a ritmului de biosinteză a lipazelor cu 24 ore [1].

Cercetările au continuat cu testarea unui diapazon lărgit de concentrații ale nano-oxidului  $\text{TiO}_2$  de dimensiunea 40 nm. A fost investigată activitatea lipolitică a *A. niger* CNMN FD 01 pe o durată mai lungă a cultivării pornind de la diferite valori ale pH inițial.

Analiza activității lipolitice a *A. niger* CNMN FD 01 în a 5-a zi de cultivare în prezența unui diapazon extins de concentrații de NPs  $\text{TiO}_2$  de dimensiunea 40 nm demonstrează cel mai favorabil rezultat pentru concentrația compusului 10 mg/l, activitatea enzimatică a producătorului fiind cu 55,3% mai înaltă decât în proba martor (Tabelul 1). Spor semnificativ a fost înregistrat și pentru concentrațiile 5 și 15 mg/l nano- $\text{TiO}_2$ , de 24,7 % și 35,3 %, respectiv. Concentrația nanocompusului de 1 mg/l a prezentat cel mai redus efect stimulator, de 12,2 % față de martor. Rezultatele obținute confirmă acțiunea stimulatorie înregistrată anterior a nano-oxidului  $\text{TiO}_2$  care demonstrează cel mai înalt spor în concentrația de 10 mg/l.

**Tabelul 1. Activitatea lipolitică a *A. niger* CNMN FD 01 cultivată în prezența unui diapazon extins de concentrații de NPs  $\text{TiO}_2$  de dimensiunea 40 nm (a 5-a zi de cultivare)**

Concentrația nano- $\text{TiO}_2$ (40nm)	1 mg/l	5 mg/l	10 mg/l	15 mg/l	martor
Activitatea lipolitică, u/ml	23433	26050	32433	28250	20883
% față de martor	112,2	124,7	155,3	135,3	100

Studiul dinamicii activității lipolitice la micromiceta *A. niger* pe parcursul a 2-6 zile de cultivare a prezentat în probele martor, dar și în cele suplimentate cu NPs  $\text{TiO}_2$  o creștere a activității enzimatică în primele 5 zile de cultivare, urmată de o scădere bruscă a activității în ziua a 6-a (Tabelul 2 și Fig. 1).

**Tabelul 2. Dinamica activității lipolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 01 cultivată în prezența 10 mg/l nano- $\text{TiO}_2$  de dimensiunea 40 nm**

Durata cultivării, zile	Varianta martor, u/ml	Varianta optimizată cu nano- $\text{TiO}_2$ , u/ml	% față de martor
2	687,5	937	136,3
3	5833	6979	119,6
4	19000	29000	152,6
5	20941	32666	156,0
6	3187,5	4675	146,7

Cea mai ridicată activitate lipolitică la producătorul *A. niger* CNMN FD 01 s-a observat în ziua a 5-a de cultivare, efect observat și la cultivarea tulpinii în prezența nano-oxidului  $\text{TiO}_2$  de dimensiunea 40 nm, în concentrația 10 mg/l. Totuși, activitatea lipolitică a micromicetei cultivate în prezența nano- $\text{TiO}_2$  a fost superioară comparativ cu probele martor pe durata întregii cultivări. Pentru zilele cu cea mai înaltă activitate enzimatică, a 4-a și a 5-a zi de cultivare, probele crescute în prezența nanocompusului au fost cu 52,6 % și, respectiv, cu 56,0 % superioare față de probele-martor ale aceluiași zile. Probele cu nano- $\text{TiO}_2$  deja în ziua a 4-a de cultivare au prezentat activitate lipolitică superioară comparativ cu rezultatele obținute pentru proba-martor din ziua cu cea mai înaltă activitate a lipazelor, a 5-a zi. Sporul probei experimentale din a 4-a zi a constituit 38,4% față de martorul zilei a 5-a. Fenomenul observat confirmă rezultatele obținute

anterior evidențiind ziua a 5-a cu cea mai ridicată activitate lipolitică la *A. niger* CNMN FD 01 și influența semnificativă a nano-oxidului  $\text{TiO}_2$

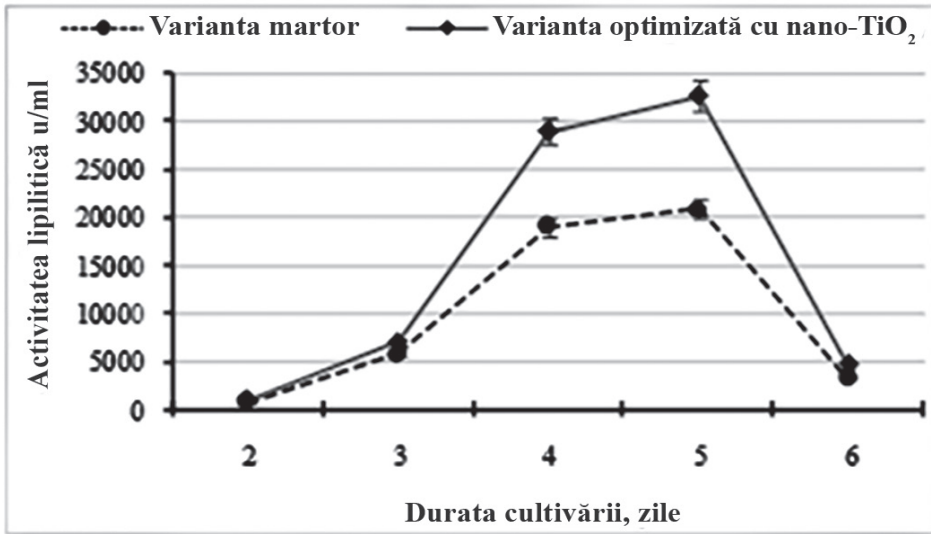


Figura 1. Dinamica activității lipolitice a micromicetei *A. niger* CNMN FD 01 cultivată în prezența 10 mg/l nano- $\text{TiO}_2$  de dimensiunea 40 nm

Varierea pH-ului inițial al mediului de cultivare a generat modificări și în activitatea lipolitică a micromicetei *A. niger* determinată în lichidul cultural al tulpinii în a 5-a zi de cultivare (Tabelul 3). Modificările observate au fost similare pentru probele martor și probele cultivate cu utilizarea nano- $\text{TiO}_2$  în calitate de reglator al procesului de biosinteză enzimatică. Cele mai reduse valori au fost obținute pentru pH-ul inițial 4,0, activitatea lipazelor în probele care au fost suplimentate cu 10 mg/l nano- $\text{TiO}_2$  de dimensiunea 40 nm fiind cu 19,7 % mai înaltă decât în proba-martor. pH-ul inițial neutru 7,2 și bazic 9,0 al mediului de cultivare a prezentat valori mult mai sporite ale activității lipolitice, de 3,51 și 3,24 ori, respectiv, mai ridicate în probele-martor și de 4,38 și 4,22 ori, respectiv, mai ridicate în probele suplimentate cu nano- $\text{TiO}_2$ . Astfel, cele mai semnificative rezultate au fost observate la pH-urile inițiale 7,2 și 9,0, activitatea lipolitică a micromicetei *A. niger* cultivate în prezența nano-oxidului  $\text{TiO}_2$  fiind cu 56,0 % și 55,9 % mai înaltă față de activitatea lipolitică a tulpinii crescute standard în aceleași condiții de pH. Cel mai înalt indice al activității lipolitice a fost determinat, totuși, pentru pH-ul inițial 7,2, activitatea lipazelor în a 5-a zi de cultivare a *A. niger* în prezența nano-oxidului  $\text{TiO}_2$  fiind cu 8,4 % superioară față de probele optimizate cu  $\text{TiO}_2$  la pH-ul inițial 9,0.

Tabelul 3. Influența pH-ului inițial al mediului de cultivare asupra activității lipolitice a *A. niger* CNMN FD 01 cultivată în prezența 10 mg/l nano- $\text{TiO}_2$  (40 nm)

pH-ul inițial	Varianta martor, u/ml	Varianta optimizată, u/ml	% față de martor
4,0	5395	6458	119,7
7,2	18958	29583	156,0
9,0	17500	27292	155,9

În baza rezultatelor a fost elaborat un procedeu de cultivare submersă a tulpinii de funghi *Aspergillus niger* CNMN FD 01 – producătoare de lipaze, care include pregătirea suspensiei de spori a tulpinii crescute timp de 14 zile pe mediu de malț-agar înclinat; inocularea ei pe un mediu nutritiv cu compoziția, g/L: făină de soia – 35,0,  $K_2HPO_4$  – 5,0,  $(NH_4)_2SO_4$  – 1,0; cultivarea la temperatura de 28-30 °C timp de 96 ore. Caracteristic pentru acest procedeu este faptul, că suspensia de spori înainte de inoculare se tratează cu nanoparticule de dioxid de titan  $TiO_2$  cu dimensiunea de 40 nm, în concentrație de 0,0010 %.

Avantajul invenției constă în sporirea nivelului de biosinteză a lipazelor sintetizate de micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 01 cu 55,3-57,5 % față de probele-martor, prezentând, astfel, o activitate lipolitică de 35330 u/ml și 33862 u/ml, respectiv [4].

La etapa ulterioară au fost integrate rezultatele de determinare a condițiilor optime de cultivare a tulpinii de funghi *A. niger* CNMN FD 01 cu utilizarea nano-oxidului  $TiO_2$  de dimensiunea 40 nm și concentrația 10 mg/l ca factor de influență, dar și cele anterioare de stabilire a condițiilor optime de recuperare a enzimelor lipolitice din lichidul cultural al micromicetei prin fracționarea cu alcool etilic de 96 % [2] și a fost preparată o mostră de preparat lipolitic optimizat.

Proprietățile lipolitice ale preparatului optimizat cu nano- $TiO_2$  obținut din *A. niger* CNMN FD 01 prezintă activitate lipolitică totală și activitate lipolitică specifică sporită comparativ cu preparatul enzimatic obținut în condiții similare, la fel optime pentru cultura dată, dar în lipsa aplicării nano-oxidului  $TiO_2$  ca factor de influență (Tabelul 4). Activitatea lipolitică a preparatului optimizat a fost mai înaltă cu 50,0 %, iar activitatea specifică cu 58,8 % față de preparatul-martor. Conținutul determinat de proteine a fost nesemnificativ mai sporit în preparatul-martor, cu 5,8 % mai ridicat decât în probele optimizate.

**Tabelul 4. Proprietățile lipolitice ale preparatelor obținute din *A. niger* CNMN FD 01**

Varianta	Proteine, %	Activitate lipolitică, u/g	Activitate specifică, u/mg proteină
Preparat optimizat cu 10 mg/l nano- $TiO_2$ (40nm)	34	750000	2205,8
Preparat-martor	36	500000	1388,8

În baza rezultatelor obținute a fost elaborată schema integrată de obținere a unui preparat lipolitic din tulpina *Aspergillus niger* CNMN FD 01 cu utilizarea nano-oxidului  $TiO_2$  ca factor de influență (Figura 2).

Procedeu respectiv asigură obținerea preparatelor lipolitice cu un grad de puritate de 10x acceptabil pentru zootehnie, industria alimentară, industria ușoară și în procesele de bioremediere [39].

SDS-electroforeza proteinelor extrase din preparatele lipolitice obținute din *Aspergillus niger* CNMN FD 01 (Figura 3) a prezentat numeroase benzi polipeptidice, caracteristice preparatelor cu un grad de puritate 10x, obținute prin sedimentare cu etanol 96% și a dezvăluit asemănări și deosebiri între probele cultivate în lipsa și în prezența NPs  $TiO_2$ . Dintre benzile polipeptidice identice au fost observate cele cu masa moleculară aparentă de 100,5 kDa, 87 kDa, 54,5 kDa, 45 kDa, 43 kDa. Diferență evidentă au prezentat polipeptidele cu masa moleculară 27,5 kDa, în probele optimizate cu nano- $TiO_2$ , și polipeptidele cu masa moleculară 39 kDa și 22,5 kDa, în probele martor.

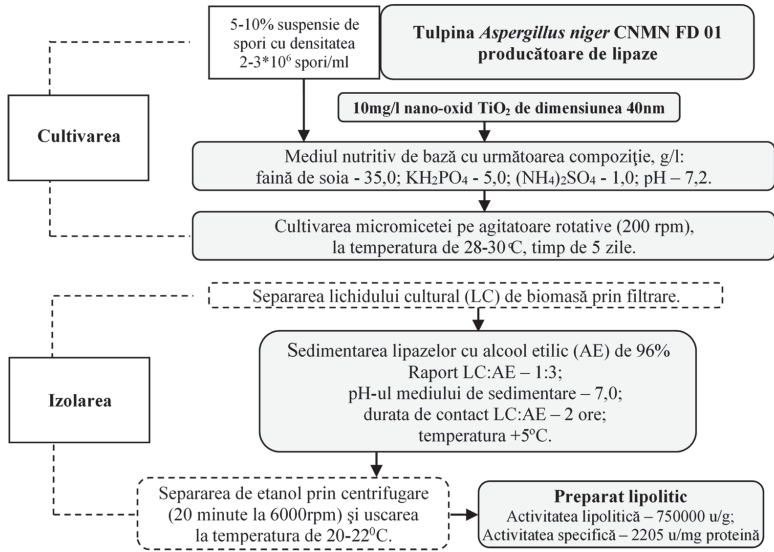


Figura 2. Schema integrată de obținere a unui preparat lipolitic în baza micromicetei *A. niger* CNMN FD 01

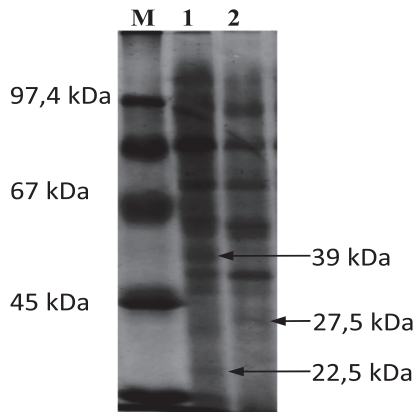


Figura 3. SDS-electroforeza proteinelor extrase din preparatele lipolitice obținute din *A. niger* CNMN FD 01. M. Marker; 1. Martor; 2. Proba cu NPs TiO<sub>2</sub>

### Concluzii

A fost elaborată schema integrată de obținere a unui preparat enzimatic lipolitic cu grad de puritate 10x cu o activitate lipolitică de 750000 u/g și o activitate specifică de 2205 u/mg proteină, ce include cultivarea tulpinii fungice *Aspergillus niger* CNMN FD 01 în prezența a 10 mg/l nano-oxid TiO<sub>2</sub> de dimensiunea 40 nm, urmată de separarea lipazelor prin sedimentare cu alcool etilic de 96 %.

Spectrul polipeptidic al preparatelor obținute din micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 01 cultivate standard și în prezența nano-oxidului TiO<sub>2</sub> prezintă atât asemănări, cât și deosebiri.

### Bibliografie

1. Bivol, C., Ciloci, A., Tiurina, J., Labliuc, S., Clapco, S., Dvornina, E., Guțul, T., Rusu, E. Effect of nano-oxides TiO<sub>2</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger* CNMN-FD-01 micromycete. Buletinul AȘM, Seria Științele vieții. 2017, 2(332), p. 125-130.

2. Bivol, C., Ciloci, A., Tiurina, J., Labliuc, S., Dvornina, E., Clapco, S., Guțul, T., Rusu, E. Strategie de izolare a lipazelor sintetizate de micromiceta *Aspergillus niger* CNMN FD 01 cultivată în prezența nano-dioxidului TiO<sub>2</sub>. Buletinul AȘM, Seria Științele vieții. 2019, 1(337), p. 148-154.
3. Choudhury, P., Bhunia, B. Industrial application of lipase: a review. //Biopharm Journal, 2015, 1(2), p. 41-47.
4. Ciloci, A., Bivol, C., Tiurina, J., Guțul, T., Clapco, S., Labliuc, S., Dvornina, E., Rusu, E. Procedeu de cultivare a tulpinii de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 01 producător de lipase. Brevet de invenție MD 4566, BOPI nr. 5/2018.
5. Deependra, K. B., Subhankar, P. 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, p. 155-166.
6. Deseatnic-Ciloci, A., Sîrbu, T., Tiurina, J., Labliuc, S. Tulpină de fungi *Aspergillus niger* producătoare de enzime lipolitice. Brevet de invenție MD 2362, BOPI 2004.01.31.
7. Deseatnic-Ciloci, A., Tiurina, J., Guțul, T., Clapco, S., Bivol, C., Labliuc, S., Dvornina, E., Nicorici, A., Rusu, E. Procedeu de cultivare a tulpinii *Trichoderma koningii* CNMN FD 15. Brevet de invenție MD 4445, BOPI nr. 11/2016.
8. Dobias, J. Nanoparticles and microorganisms: from synthesis to toxicity. These nr. 5614 pour obtention du grade de docteur es sciences. Suisse: Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, 2013. p. 139.
9. El-Batal, A. I. et al. Biodiesel production by *Aspergillus niger* lipase immobilized on barium ferrite magnetic nanoparticles. Bioengineering. 2016. 3(14), doi:10.3390/bioengineering3020014.
10. Kareem, S. O. et al. Purification and characterization of lipase from *Aspergillus flavus* PW2961 using magnetic nanoparticles. Nig. J. Biotech. 2017. 32. p. 77-82.
11. Karigar, C.H., Rao, S.S.12. Role of Microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review.//Enzyme Research, 2011, p.1-11.
12. Komkrit, S. et al. Role of surface area, primary particle size, and crystal phase on titanium dioxide nanoparticle dispersion properties. Nanoscale Res. Lett. 2011. 6. p. 27.
13. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970. 227(5257). p. 680-685.
14. Lowry, O.H. et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. Journal of Biological Chemistry. 1951. 48. p. 17-25.
15. Rai, M., Duran, N. Metal nanoparticles in microbiology. New York: Springer, 2011, 305 p.
16. Suman, R. et al. Role of nanomaterials in symbiotic fungus growth enhancement. Current Science. 2010. 99(9-10). p. 1189-1191.
17. Takamoto, T., Shirasaka, S., Uyama, H., Kobayashi, S. 18. Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent.//Chem. Lett., 2001, no.6, p. 492-493.
18. Usatii, A., Bejenaru, L. Reaction of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain to the action of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie. 2017. 24(1). p. 25-29.
19. Vertegel, A.A., Reukov, V. Maximov, V. Enzyme-nanoparticle conjugates for biomedical application. Methods Mol. Biol. 2011. 679. p. 165-182.
20. Андрусихина, И.Н. и др. Структура, свойства и токсичность наночастиц оксидов серебра и меди. Biotechnologia Acta. 2011. 4(6). с. 51-59.
21. Грачёва, И.М., Грачев, Ю.П. и др. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М.: Легкая и пищ. пром., 1982. с. 75-76.
22. Доспехов, Б. 21. Планирование полевого опыта и статистическая обработка данных. М.: Колос, 1985, с. 192-196.
23. Нанотехнологии и наноматериалы для биологии и медицины. Сб. материалов науч.-практ. конф. с междунар. участием. Ч. 2. Новосибирск, 2007. с. 204.

**Cercetările au fost realizate în cadrul Proiectului pentru tineri cercetători 16.80012.51.12A**