

PROCEDEU INOVATIV DE CULTIVARE A LEVURII *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-18 PRODUCĂTOARE DE MANOPROTEINE

Agafia USATÎI, Ludmila BEJENARU, Elena TOFAN

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

Lucrarea oferă informații noi despre influența diferitelor concentrații de nanoparticule TiO_2 și ZnO/MgO asupra conținutului de biomasă și manoproteine la levuri. S-a constatat că nanoparticulele TiO_2 cu dimensiuni de 30 nm, în concentrații de 10 și 15 mg/L, au capacitatea de a stimula biosinteza manoproteinelor în biomasa tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, însușiri care nu le-au manifestat nanoparticulele ZnO/MgO . Se propune un procedeu nou de cultivare a levurii cu aplicarea nanoparticulelor dioxidului de titan ce asigură un conținut sporit de manoproteine.

Cuvinte-cheie: nanoparticule TiO_2 , ZnO/MgO , *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, biomasă, manoproteine.

NEW METHOD FOR CULTIVATION OF MANNOPROTEIN-PRODUCING *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-18 YEAST

The paper provides new information about the influence of different TiO_2 and ZnO / MgO nanoparticle concentrations on biomass accumulation and mannoprotein content in yeasts. It has been found that the TiO_2 nanoparticles of 30 nm in size and of 10 and 15 mg/L concentrations have the ability to stimulate the biosynthesis of mannoproteins in the biomass of the *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 strain, features that have not been shown by the ZnO/MgO nanoparticles. We propose a new method of yeast cultivation with titanium dioxide nanoparticles application that provides enhanced content of mannoproteins.

Keywords: TiO_2 , ZnO/MgO nanoparticles, *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, biomass, mannoproteins.

Introducere

Aplicarea nanoparticulelor anorganice la cultivarea microorganismelor prezintă un domeniu recent în cercetările de nanobiotehnologie. Există ipoteza că nanoparticulele (NPs) influențează dezvoltarea microorganismelor [1]. În lucrările mai multor autori sunt expuse rezultatele efectului diferitelor nanoparticule (oxizi ai Au, Ag, Ti, Si, Zn) asupra celulei microbiene, din care concluzionăm că acestea, în dependență de compoziție și concentrație, pot modifica procesele metabolice la microorganisme [2, 3].

Comparativ cu alți agenți antimicrobieni, TiO_2 prezintă interes pentru cercetători datorită stabilității înalte, nu este toxic pentru mediul înconjurător, este ieftin, posedă activități bioactive etc. Unele mecanisme posibile de influență a nanoparticulelor TiO_2 la nivel celular au fost cercetate de către mai mulți specialiști în domeniu, care au elucidat anumite procese ce au loc în cazul contactului cu nanoparticule [4, 5].

Conform rezultatelor din literatura de specialitate, concentrația minimă inhibitorie (MIC – minimum inhibitory concentration) a nanoparticulelor este variată și depinde de microorganismul cercetat. Spre exemplu, pentru *Escherichia coli* și *Candida albicans* MIC a nanoparticulelor TiO_2 constituie $9,7 \mu g \cdot ml^{-1}$, iar pentru *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* MIC este de $19,0-19,5 \mu g \cdot ml^{-1}$ [6].

În general, schimbările în starea fiziologică a celulei și reacția la influența factorilor externi sunt legate de structura și dinamica peretelui celular. Conform cercetărilor Ya-Nan Chang [7], mecanismul de influență a nanoparticulelor CuO și ZnO asupra celulei microbiene este complex și atrage asupra sa modificări atât în membrana celulară, cât și în citoplasmă. Reieșind din faptul că compoziția biomasei de levuri ar putea fi modificată în mod semnificativ prin intermediul mediului de cultură, este important a evidenția factorii care pot îmbunătăți performanțele biotehnologice ale producătorului.

Cele expuse mai sus determină importanța evaluării efectelor unor nanoparticule asupra tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 și aprecierea perspectivelor de aplicare a acestora în biotehnologia producerii manoproteinelor.

Material și metode

Obiecte de studiu, medii de cultură, condiții de cultivare. În cadrul cercetărilor a fost utilizată tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 selectată ca producătoare de manoproteine [8]. Tulpina este păstrată în colecția Laboratorului Biotehnologia Levurilor și în Colecția de Microorganisme Neputogene a IMB al AȘM.

În cercetări au fost utilizate nanoparticule TiO_2 cu dimensiuni de 30 nm și ale nanocompozitului ZnO/MgO cu dimensiuni de 10,2 nm/11,7 nm, stabilizate în polivinilpirolidon (PVP), puse la dispoziția noastră cu multă amabilitate de către cercetătorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii al AȘM. Concentrațiile nanoparticulelor cercetate în experiențe la cultivarea levurii au constituit 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 și 15 mg/L. În calitate de martor a fost cercetată varianta fără aplicarea nanoparticulelor.

Pentru inoculare și cultivarea submersă a levurii a fost utilizat mediul de fermentație specific YPD [9]. Cultivarea submersă a fost efectuată 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 însemănat în volum de 5% cu inocul 2×10^6 celule/ml.

Metode de cercetare. Biomasa levuriană a fost determinată gravimetric potrivit procedurii descris în [10]. Conținutul de manoproteine a fost determinat gravimetric conform metodei descrise în [11].

Prelucrarea statistică a rezultatelor s-a efectuat computerizat cu utilizarea programului Excel, cu calcularea erorilor standard pentru valorile relative și medii și a pragului de semnificație $p < 0,05$.

Rezultate și discuții

Din punct de vedere biotehnologic, este important a stabili gradul de modificare a capacităților biosintetice ale culturii de levuri sub acțiunea nanoparticulelor aplicate în procesul de cultivare. Studiul privind conținutul de biomasă uscată obținută după 120 ore de cultivare în profunzime a relevat că concentrațiile 0,5, 1,0 și 5,0 mg/L de nanoparticule ale TiO_2 și ale nanocompozitului ZnO/MgO sunt tolerate de către tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 (Fig.1). Cantitatea de biomasă în probele experimentale variază în limitele $5,25 \pm 0,01 \dots 5,61 \pm 0,08$ g/L s.u., rezultate care sunt apropiate matorului ($5,32 \pm 0,11$ g/L s.u.). Totodată, cercetările experimentale au demonstrat că în concentrații de 10 și 15 mg/L nanocompozitul ZnO/MgO sporește cu 20-25% producția de biomasă.

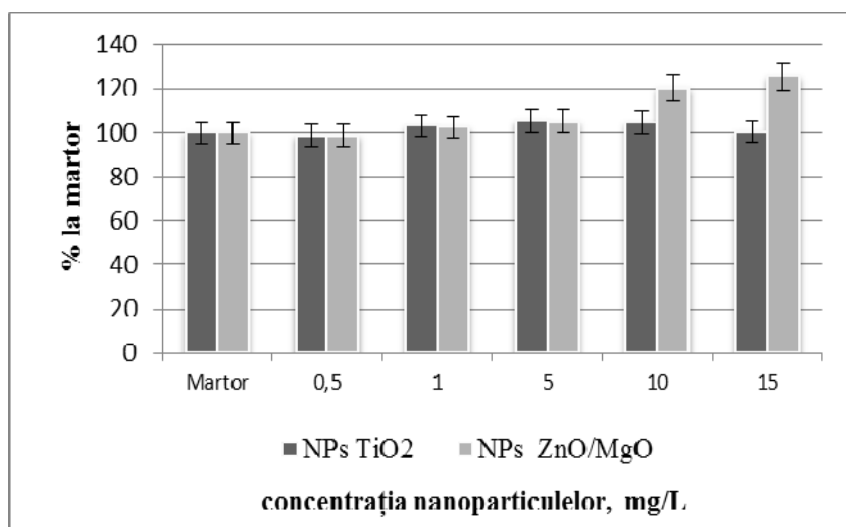


Fig.1. Cantitatea de biomasă *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, la cultivare în prezența nanoparticulelor TiO_2 și a nanocompozitului ZnO/MgO.

În scopul aprecierii efectului nanoparticulelor asupra proceselor biosintetice ale levurii au fost realizate experimente de determinare a conținutului de manoproteine. Analiza rezultatelor conținutului de manoproteine în biomasa culturii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, la cultivare pe mediul YPD suplimentat cu nanoparticule, indică o stabilitate relativă. La concentrații mici (0,5, 1,0 și 5,0 mg/L) de nanoparticule ale ZnO/MgO, cultura de levuri acumulează practic aceeași cantitate de manoproteine, ca și în condiții standard. În cazul nanoparticulelor TiO_2 la concentrațiile de 10 și 15 mg/L are loc o creștere evidentă cu 19,0 - 22,6% a conținutului de manoproteine față de mator (Fig.2).

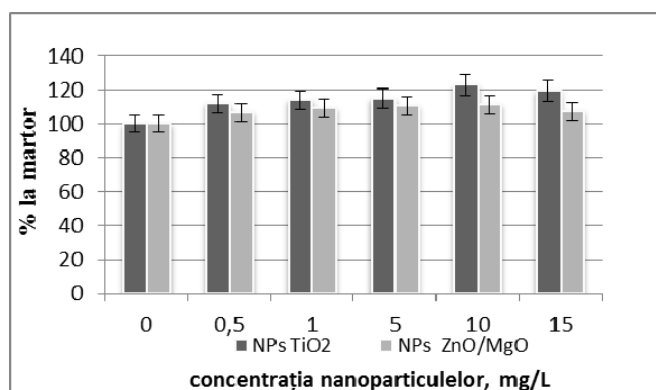


Fig.2. Conținutul de manoproteine în biomasa *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, cultivată în prezența nanoparticulelor TiO₂ și a nanocompozitului ZnO/MgO.

În scopul aprecierii impactului nanoparticulelor asupra culturii de *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18, au fost calculați coeficienții de determinare, care reflectă corelarea dintre conținutul de manoproteine în biomasa și concentrațiile nanoparticulelor. Analiza legăturii dintre parametrii conținutului de manoproteine și concentrațiile nanoparticulelor TiO₂ și ZnO/MgO adăugate în mediul de cultură YPD a stabilit o legătură ascendentă a unei valori care implică, la rândul său, o tendință ascendentă a celeilalte valori. Legătura dintre ele, identificată ca $R^2 = 0,5565$ pentru TiO₂, sau 0,55% din variația valorilor acumulării manoproteinelor, argumentează ipoteza existenței unei legături moderate în baza căreia pot fi pronosticate valorile uneia în raport cu valorile celeilalte pe baza ecuației de regresie (Fig.3). Calculul coeficientului de determinare pentru conținutul de manoproteine în variantele experimentale în care s-a adăugat nanoparticulele ZnO/MgO a relevat o asociere neesențială. Coeficientul de determinare constituie $R^2 = 0,1763$.

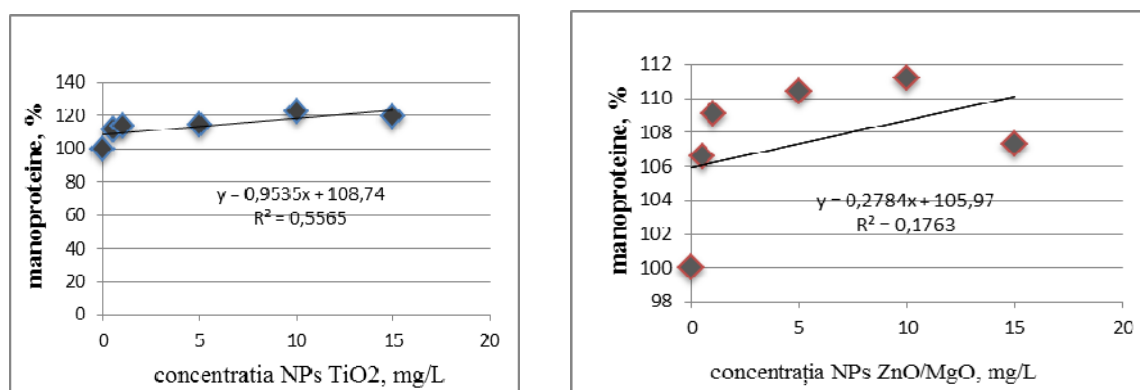


Fig.3. Relația dintre conținutul de manoproteine și concentrația de nanoparticule TiO₂ și ZnO/MgO la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18.

În așa mod, studiul influenței a două tipuri de nanoparticule TiO₂ și ZnO/MgO asupra culturii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 a stabilit lipsa efectului vizibil al concentrațiilor 0,5, 1,0, și 5,0 mg/L asupra producției de biomasa și doar concentrațiile de 10 și 15 mg/L ale nanoparticulelor ZnO/MgO sporesc cantitatea de biomasa cu 20-25%. În cazul conținutului de manoproteine, rezultatele obținute denotă că nanoparticulele dioxidului de titan, în concentrații de 10 și 15 mg/L, au o tendință stabilă de a majora cu până la 23% cantitatea acestora. Examinarea relației dintre cantitatea de manoproteine și concentrațiile nanoparticulelor adăugate în mediu de cultură YPD a demonstrat un grad de dependență mediu pentru TiO₂ și un grad mic pentru nanoparticulele ZnO/MgO.

Pornind de la faptul că efectul nanoparticulelor TiO₂ este unul pozitiv asupra biosintezei manoproteinelor, este considerat oportun de a elabora un procedeu de cultivare a levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 cu aplicarea nanoparticulelor în scopul sporirii performanței biotehnologice. În contextul acestui deziderat, propunem următorul procedeu.

Se prepară mediul nutritiv YPD cu componența, g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de levuri – 10,0. La acest mediu se adaugă suplimentar o cantitate de 10 mg/L nanoparticule TiO₂. pH-ul mediului se

ajustează la valori între 5,5 și 6,6. În mediul preparat se introduce inoculul (cultură de levuri cu vârsta de 24 ore) în volum de 5% (2×10^6 celule/ml). Cultivarea în profunzime derulează la temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ și la agitare permanentă (gradul de aerare 80,0...83,0 mg/L oxigen solvit); durata de cultivare submersă 120 de ore.

Biomasa se colectează prin centrifugare la 3000 rpm., timp de 15 minute.

Procesul de extragere a manoproteinelor din biomasa levuriană se efectuează aplicând metoda Hong Zi Liu [8], în modificarea noastră:

10 g drojdie proaspătă (30% s.u.), la care se adaugă 10 ml apă sterilă, se supune autolizei la 50°C timp de 24 de ore. După autoliză amestecul se încălzește la 80°C timp de 15 min., se răcește, se centrifughează. Depozitul obținut (pereții celulari) se tratează cu 1 N NaOH, timp de 2 ore la temperatura de $80 \pm 5^\circ\text{C}$; supernatantul se colectează. Supernatantul se concentrează la 1/5 din volumul inițial, se adaugă etanol absolut în volum triplu pentru precipitarea manoproteinelor. Precipitatul manoproteic se dizolvă în apă, se centrifughează, supernatantul se tratează din nou cu alcool (1:3), se centrifughează. Sedimentul alb se spală de două ori cu etanol absolut, se usucă la $50 \pm 5^\circ\text{C}$. Produsul obținut este manoproteina.

În cazul aplicării prezentului procedeu se obțin $5,58 \pm 0,02$ g/L biomasă uscată ce conține $12,87 \pm 0,03\%$ manoproteine. În probele martor fără aplicarea nanoparticulelor conținutul de biomasă constituie $5,32 \pm 0,11$ g/L ce conține $10,5 \pm 0,05\%$ manoproteine. Procedeu propus este mai eficient datorită aplicării nanoparticulelor TiO_2 ; ca rezultat, se obțin cu 22,6% mai multe manoproteine.

Concluzii

1. Nanoparticulele TiO_2 au demonstrat capacitatea de a modifica conținutul de manoproteine în biomasa levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 și corelează cu concentrațiile utilizate. Efectul pozitiv maxim este exprimat de concentrația 10 mg/L care sporește acumularea manoproteinelor cu 22,6% comparativ cu varianta martor.
2. Nanoparticulele ZnO/MgO manifestă efect de stimulare a productivității levurii, în concentrații de 10 și 15 mg/L, acumularea biomasei celulare sporește cu 20-25%.
3. Procedeu elaborat asigură obținerea biomasei levuriene cu un conținut sporit de manoproteine echivalent cu $12,87 \pm 0,03\%$.

Referințe:

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. In: *Letters in Applied Microbiology*, 2003, vol.37, p.268-274.
2. BAN, D.K., PAUL, S. Zinc Oxide Nanoparticles Modulates the Production of β -Glucosidase and Protects its Functional State Under Alcoholic Condition in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, vol.173, p.155-166.
3. CHANG, Y.N., ZHANG, M., XIA, L., ZHANG, J., XING, G. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. In: *J. Materials*, 2012, vol.5, p.2850-287.
4. EL-DIASTY, E.M., AHMED, M.A., NAGWA, O., SALWA, F.M., SAMAA, I. EL-DEK., HANAA, M. ABD EL-KHALEK, MARIAM, H.Y. Antifungal activity of Zinc Oxide Nanoparticles against dermatophytic lesions of cattle. In: *Romanian J. Biophys.*, Bucharest, 2013, vol.23, no.3, p.191-202.
5. EL-SAID K.S., EHAB, M.A., KOKI, K., AKIYOSHI, T. Molecular mechanism of DNA damage induced by titanium dioxide nanoparticles in toll-like receptor 3 or 4 expressing human hepatocarcinoma cell lines. In: *Journal of Nanobiotechnology*, 2014, p.1-10.
6. Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. *Tulpină de drojdie Saccharomyces cerevisiae – producătoare de manani*: brevet MD nr.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, nr.4.
7. LIU, H.Z., WANG, Q., LIU, Y. et al. Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009, no.14, p.577-583.
8. LIU, H.Z., WANG, Q., YIN, H.E. Immunoactivities and antineoplastic activities of *Saccharomyces cerevisiae* manoprotein. In: *Carbohydrate Polymer*, 2011, vol.83, p.1690-1695.
9. MINJU, J., JEONG, M.P., EUN, J.L., YEA, S.C., CHUNGHYUN, L., JEONG, M.K., SANG, S.H. Cytotoxicity of Ultra-pure TiO_2 and ZnO Nanoparticles Generated by Laser Ablation. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2013, vol.34, no.11, p.3301-3306.
10. PIȘKIN, S., ARZU, P., MÜGE, S.Y. Antimicrobial Activity of Synthesized TiO_2 Nanoparticles. In: *International Conference on Emerging Trends in Engineering and Technology*, Patong Beach, Phuket (Thailand), 2013.
11. RAI, M., DURAN, N. *Metal Nanoparticles in Microbiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, p.299.

Prezentat la 23.02.2016