

**MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII AL
REPUBLICII MOLDOVA
INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE**

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 663.12:579.6 (043.2)

CHISELIȚA NATALIA

**TEHNOLOGIE DE OBTINERE A β -GLUCANILOR
DIN LEVURI**

167.01 - BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE

Teză de doctor în științe biologice

Conducător științific:

USATÎI Agafia, doctor habilitat
în științe biologice, profesor
cercetător, specialitatea 167.01-
Biotehnologie, bionanotehnologie

Autor:

CHISELIȚA Natalia

CHIȘINĂU, 2018

© Chiselița Natalia, 2018

CUPRINS

ADNOTĂRI.....	6
LISTA ABREVIERILOR.....	9
INTRODUCERE.....	10
1. LEVURILE – SURSE VALOROASE DE β-GLUCANI.....	17
1.1. Oportunitatea studierii β -glucanilor.....	17
1.2. Structura, compoziția chimică și mecanismul de biosinteză a β -glucanilor.....	20
1.3. Modelarea biosintezei β -glucanilor prin varierea factorilor de cultivare.....	25
1.4. Concluzii la capitolul 1.....	42
2. BIOSINTEZA β-GLUCANILOR LA TULPINA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> CNMN-Y-20 ÎN FUNCȚIE DE NECESITĂȚILE NUTRITIVE ȘI CONDIȚIILE DE CULTIVARE.....	44
2.1. Materiale și metode de cercetare.....	44
2.1.1. Obiectul de studiu.....	44
2.1.2. Metode de investigație.....	45
2.2. Eficientizarea metodei de extracție a β -glucanilor.....	47
2.3. Influența surselor de carbon, azot asupra biosintezei β -glucanilor și elaborarea mediului de cultivare a tulpinii <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20.....	51
2.4. Influența temperaturii, aerației și duratei de cultivare asupra biosintezei β -glucanilor la tulpina <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20.....	60
2.5. Procedeu de sporire a conținutului de β -glucani la tulpina <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20 cu aplicarea mediului nutritiv și condițiilor de cultivare optimizate.....	65
2.6. Concluzii la capitolul 2.....	68
3. POTENȚIALUL BIOTEHNOLOGIC A LEVURII <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> CNMN-Y-20 SUB INFLUENȚA NANOPARTICULELOR OXIZILOR METALICI	69
3.1. Materiale și metode de cercetare.....	70
3.2. Efectele nanoparticulelor dioxidului de titan asupra biosintezei β -glucanilor și altor componente celulare a levurii <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20.....	72
3.3. Efectele nanoparticulelor oxidului de zinc asupra biosintezei β -glucanilor și altor componente celulare ale levurii <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20, în funcție de dimensiuni.....	75

3.4.	Efectele nanoparticulelor oxidului de zinc asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20, în funcție de concentrație.....	79
3.5.	Efectele nanoparticulelor oxidului de zinc în combinație cu alcoolul etilic asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20.....	82
3.6.	Procedeu de cultivare a levurii <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20 cu utilizarea nanoparticulelor oxidului de zinc	90
3.7.	Concluzii la capitolul 3.....	91
4.	ELABORAREA TEHNOLOGIEI DE CULTIVARE A TULPINII SACCHAROMYCES CEREVISIAE CNMN-Y-20 ȘI DE OBȚINERE A β-GLUCANILOR.....	92
4.1.	Materiale și metode de cercetare.....	92
4.2.	Acțiunea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra procesului de biosinteză a β -glucanilor	93
4.2.1.	Efectele undelor milimetrice asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20, în funcție de spectrul de frecvență.....	93
4.2.2.	Efectele undelor milimetrice cu frecvența 53,33 GHz asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20, în funcție de durata de iradiere.....	102
4.2.3.	Procedeu de sporire a conținutului de β -glucani la tulpina <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20 cu utilizarea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă.....	109
4.3.	Tehnologia de cultivare a tulpinii <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNMN-Y-20 și de obținere a β -glucanilor.....	110
4.3.1.	Proces tehnologic de cultivare a levurii <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20 și de obținere a β -glucanilor.....	111
4.3.2.	Evaluarea eficienței tehnologiei elaborate.....	117
4.3.3.	Valorificarea bioprodusului Glucan-20, obținut din levura <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20.....	120
4.4.	Concluzii la capitolul 4.....	122
	CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	123

BIBLIOGRAFIE.....	125
ANEXE.....	142
Anexa 1. Brevete de invenție MD 4048, MD 4329, MD 717.....	143
Anexa 2. Act de implementare a tulpinii de levuri <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20.....	146
Anexa 3. Acte de implementare bioprodusului Glucan-20.....	147
Anexa 4. Mențiuni la Saloane de Invenții și Expoziții Internaționale.....	150
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....	156
CV-ul AUTORULUI.....	157

ADNOTARE

Chiselița Natalia „Tehnologie de obținere a β -glucanilor din levuri”. Teză de doctor în științe biologice, Chișinău, 2018.

Teza conține introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 281 titluri, 4 anexe, 124 pagini text de bază, 68 figuri, 11 tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 36 lucrări științifice.

Cuvintele cheie: Tehnologie de cultivare, levuri, *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucani, carbohidrați, proteine, nanoparticule, unde milimetrice cu frecvență extra înaltă.

Domeniul de studiu: 167.01- biotehnologie, bionanotehnologie.

Scopul lucrării constă în elaborarea tehnologiei inovative eficiente de obținere a β -glucanilor din levuri.

Obiectivele lucrării: Selectarea nutrienților și condițiilor optime de cultivare submersă a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în vederea ameliorării biosintezei β -glucanilor; Elucidarea acțiunii nanoparticulelor oxizilor de metale asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituente celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20; Evaluarea efectelor undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituente celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20; Elaborarea tehnologiei de obținere a β -glucanilor din biomasa levuriană.

Noutatea și originalitatea științifică. În premieră se propune o tehnologie inovativă de cultivare a levurii *S. cerevisiae* și de obținere a β -glucanilor, bazată pe procedee avantajoase de sinteză orientată, care contribuie la ameliorarea calității și sinecostului produsului final. Au fost selectați nutrienții preferențiali și elaborate două medii de cultură pentru tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, au fost stabilite condițiile speciale de cultivare pentru sporirea biosintezei β -glucanilor. În premieră s-a demonstrat că nanoparticule TiO_2 și ZnO , utilizate la cultivarea levurii, influențează procesul de biosinteză a β -glucanilor și altor constituente celulare, efectul exprimându-se în funcție de dimensiunile și concentrațiile nanoparticulelor. În premieră a fost elucidat caracterul acțiunii undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra biosintezei β -glucanilor și altor componente celulare în dependență de spectrul de frecvență și durata de iradiere. Pentru prima dată au fost elaborate 2 procedee noi de sporire a conținutului de β -glucani la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, dintre care unul a fost brevetat.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare. Au fost determinați parametrii biotehnologici optimați de cultivare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, ceea ce a contribuit la eficientizarea procedeelelor de sinteză orientată a β -glucanilor, fapt ce a permis elaborarea tehnologiei de obținere a acestor compuși biologic activi valoroși.

Semnificația teoretică. Este fundamentată științific și demonstrată posibilitatea dirijării proceselor biosintetice și sporirii potențialului de producere a β -glucanilor la cultivarea levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 prin tehnologia cu utilizarea nutrienților preferențiali, condițiilor speciale de cultivare, a nanoparticulelor și undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă în calitate de stimulatori.

Valoarea aplicativă. Se propun spre valorificare: tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, brevetată ca sursă de β -glucani; două variante de medii nutritive și două procedee de sinteză orientată cu aplicarea nanoparticulelor oxizilor de metale și undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă ca factori reglatori, care asigură sporirea semnificativă a cantității de β -glucani în biomasa levuriană; metoda de extragere a β -glucanilor, caracterul inovațional al căreia permite de a reduce etapele suplimentare de distrugere a peretelui celular și extragere a β -glucanilor; bioprodusul „Glucan-20” cu activitate fiziologică înaltă.

Implementarea rezultatelor științifice. Tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 a fost depozitată în CNMN a IMB și utilizată în cercetări științifice. Preparatul „Glucan-20” a fost utilizat în furajul pentru puietul și larvele de pești (Acte de implementare: Nr. 1 din 17.07.2014, Nr. 3 din 17.07.2015, Nr. 4 din 10.10.2016, Nr. 85a din 04.09.2017)

АННОТАЦИЯ

Киселица Наталья „Технология получения β -глюканов из дрожжей”. Диссертация кандидата биологических наук, Кишинёв, 2018.

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и рекомендаций, библиографии из 281 наименований, 4 приложений, 124 страниц основного текста, 68 рисунков, 11 таблиц. Результаты исследований опубликованы в 36 работах.

Ключевые слова: Технология культивирования, дрожжи, *Saccharomyces cerevisiae*, β -глюканы, углеводы, белки, наночастицы, миллиметровые волны.

Область исследования: 167.01 – Биотехнология, бионанотехнология.

Цель работы: разработка эффективной инновационной технологии получения β -глюканов из дрожжей.

Задачи работы: отбор питательных веществ и оптимальных условий для глубинного культивирования штамма *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 с целью улучшения биосинтеза β -глюканов; выявление действия наночастиц оксидов металлов на биосинтез β -глюканов и других клеточных компонентов штамма *S. cerevisiae* CNMN-Y-20; определение эффекта высокочастотных миллиметровых волн на биосинтез β -глюканов и других клеточных компонентов штамма *S. cerevisiae* CNMN-Y-20; разработка технологии получения β -глюканов из биомассы дрожжей.

Научная новизна и оригинальность. Впервые предлагается инновационная технология культивирования дрожжей *S. cerevisiae* для получения β -глюканов, основанная на способах направленного синтеза, ведущих к улучшению качества конечного продукта и уменьшению его себестоимости. Отобраны источники питания и оптимальные условия культивирования, оптимизированы две питательные среды с целью увеличения биосинтеза β -глюканов штаммом *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Впервые показано, что наночастицы TiO_2 и ZnO , используемые в культивировании дрожжей, влияют на процесс биосинтеза β -глюканов и других клеточных компонентов, эффект которых зависит от их размера и концентрации. Впервые выявлен характер действия высокочастотных миллиметровых волн на биосинтез β -глюканов и других клеточных компонентов в зависимости от спектра и времени их действия. Впервые были разработаны два новых способа культивирования способствующих увеличению содержания β -глюканов в биомассе *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, один из которых запатентован.

Научная задача, решенная в данной работе. Были определены оптимальные биотехнологические параметры культивирования дрожжей *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, что способствовало оптимизированию способов направленного синтеза β -глюканов и позволило разработать технологию получения этих веществ.

Теоретическое значение. Научно обоснована и доказана возможность управления биосинтетическими процессами в дрожжах *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, а также улучшения потенциала синтеза β -глюканов путем использования отобранных источников питания, оптимальных условий для культивирования, наночастиц и высокочастотных миллиметровых волн в качестве стимуляторов.

Практическое значение: Предлагаются: штамм дрожжей *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, запатентованный как источник β -глюканов; две питательные среды и два способа направленного синтеза с использованием наночастиц оксидов металлов и высокочастотных миллиметровых волн как регулирующих факторов, ведущих к увеличению содержания β -глюканов в биомассе дрожжей; метод экстракции β -глюканов, который позволяет сократить этапы разрушения клеточной стенки и экстракции β -глюканов; биопрепарат „Глюкан-20” с высокой физиологической активностью.

Внедрение результатов. Штамм *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 был депонирован в НКНМ и использован в научных исследованиях. Препарат „Глюкан-20” был использован в кормах для малька и личинок рыб (Акты о внедрении: №1 от 17.07.14, №3 от 17.07.15, №4 от 10.10.16, №85а от 04.09.17)

ANNOTATION

Chiselita Natalia „Technology for obtaining of β -glucans from yeasts”. PhD thesis in biological sciences, Chisinau, 2018.

The thesis consists of an introduction, four chapters, conclusions and recommendations, bibliography list with 281 references, 124 pages of the main content, 68 figures, 11 tables and 4 anexes. The obtained results were published in 36 scientific papers.

Keywords: Cultivation technology, yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucans, carbohydrates, proteins, nanoparticles, extra-high frequency millimeter waves.

Field of study: 167.01- biotechnology, bionanotechnology.

Research goal: to develop an efficient innovative technology for β -glucan obtaining from yeasts.

Objectives: Selection of preferred nutrients and optimum conditions for submerged cultivation of *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 strain to improve the biosynthesis of β -glucans; Elucidation of the action of the metal oxides nanoparticles on the biosynthesis of β -glucans and other cellular constituents of *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast; Evaluation of the extra-high frequency millimeter wave effects on the biosynthesis of β -glucans and other cellular constituents of *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast; Elaboration of technology of obtaining β -glucans from the yeasts biomass.

Scientific novelty of reasearch. For the first time, an innovative technology is proposed for *S. cerevisiae* yeast cultivation and β -glucan production, based on advantageous directed synthesis procedures, which contribute to improving the quality and reducing the cost of the final product. Preferential nutrients and two culture media for *S. cerevisiae* strain CNMN-Y-20 were selected, and specific culture conditions for enhancing β -glucan biosynthesis were established. For the first time, it has been demonstrated that TiO₂ and ZnO nanoparticles used in yeast cultivation influence the biosynthesis process of β -glucans and other cellular constituents, the effect being dependent upon nanoparticle size and concentration. For the first time, the character of extra-high frequency millimeter wave action on the biosynthesis of β -glucans and other cellular components, depending on the frequency spectrum and the duration of irradiation, has been elucidated. For the first time, 2 new procedures for increasing β -glucan content in *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 strain were elaborated, one of which was patented.

Important scientific problem, solved in the scientific work. The optimal biotechnological parameters of *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast cultivation were determined, which has contributed to the efficiency of the targeted synthesis of β -glucans, which enabled the elaboration of the technology for their obtaining.

Theoretical value. It is scientifically justified and demonstrated the possibility to direct the biosynthetic processes and to increase the β -glucan production potential during *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast cultivation by the use of preferential nutrients, special cultivation conditions, nanoparticles and extra-high frequency millimeter waves as stimulators.

Practical value. There are proposed for valorisation: *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast strain, patented as a source of β -glucans; two variants of nutrient media and two directed synthesis processes with application of metal oxides nanoparticles and extra-high frequency millimeter waves as regulating factors, which ensure a significant increase of the β -glucans amount in the yeast biomass; the method of β -glucan extraction, the innovative character of which allows to reduce additional steps of cell wall destruction and β -glucans extraction; the bioproduct „Glucan-20” with high physiological activity.

Implementation of scientific results. The *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 strain was deposited in the CNMN of IMB and used in scientific research. The polysaccharide bioproduct "Glucan-20" has been used in diets of fish larvae and juveniles. (Implementation Acts: Nr. 1 from 17.07.2014, Nr. 3 from 17.07.2015, Nr. 4 from 10.10.2016, Nr. 85a from 04.09.2017).

LISTA ABREVIERILOR

AP	actinoplaști
BIG1	Bad In Glucose protein
B.U.	biomasă uscată
CNMN	Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene
CNMN-Y	Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene – Yeasts
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FKS1	FK506 Sensitivity - 1,3- β -glucan synthase component
FLI	finger-like invagination
FT-IR	Fourier Transform Infrared spectroscopy
FT-Raman	Fourier Transform Raman spectroscopy
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
KNH1	Kre9(Nine) Homolog
KRE5	Killer toxin-Resistance protein 5
KRE6	Killer toxin-Resistance protein 6
KRE9	Killer toxin-Resistance protein 9
MAP kinase	Mitogen-Activated Protein kinase
NP	nanoparticule
PVP	Poli(N-vinilpirolidonă)
RHO1	Ras HOMolog1
ROT1	Reversal Of Tor2 lethality
R-ZZ	Rieder + zaharoză + zinc
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
S.U.	substanță uscată
SKN1	Suppressor of Kre Null β -glucan
UMM	unde milimetrice
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose medium

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța cercetărilor. Importanța β -glucanilor pentru medicină, farmaceutică, industria alimentară și alte domenii ale economiei condiționează dezvoltarea rapidă a industriei de producere a acestor polizaharide complexe constituite din unități de D-glucopiranoză conjugate în pozițiile β -(1-6) și β -(1-3) [234]. Levurile genului *Saccharomyces* se numără printre producători performanți de β -glucani cu proprietăți imunologice deosebite [133]. Interesul înalt față de 1,3- și 1,6- β -glucani este condiționat și de activitatea antibacteriană, antivirală, anticancerigenă, antioxidantă, antimutagenă, hipocolesterolemică, detoxifiantă, etc. [146, 228, 273].

Pentru dezvoltarea biotehnologiilor moderne de obținere a β -glucanilor este evidentă oportunitatea selectării tulpinilor cu calități performante utilizate în producerea industrială. Producția de β -glucani depinde în mod semnificativ de conținutul lor în peretele celular al levurii. În general, schimbările în starea fiziologică a celulei și reacția sa la influența factorilor externi sunt legate de structura peretelui celular. Arhitectura peretelui celular și mecanismele responsabile de sinteza componentelor acestuia pot fi controlate prin compoziția mediului de cultură și condițiile de cultivare [155]. O problemă științifică importantă ține de elaborarea unor formule noi ale mediilor de fermentație și evidențierea condițiilor optime de cultivare în profunzime a tulpinilor de levuri selectate. Conform unor autori, temperatura de cultivare, pH-ul, aerația mediului și durata procesului de cultivare, determină activitatea fiziologică a culturilor și acționează asupra proprietăților și compoziției biochimice a microorganismelor [228, 233].

De asemenea, actuale și importante sunt cercetările destinate studiului influenței asupra levurilor a nanoparticulelor oxizilor de metale și undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă. Mecanismele posibile de influență a nanoparticulelor la nivel celular au fost cercetate parțial de către specialiști în domeniu [110, 178]. Importante sunt rezultatele investigațiilor acțiunii undelor milimetrice asupra dezvoltării și proliferării celulelor, activității enzimelor și altor sisteme biologice. În zona de interes intră și modelarea teoretică a mecanismelor posibile de interacțiune a undelor milimetrice cu obiectele biologice, inclusiv microorganismele [172].

Situația în domeniul de cercetare. Cererea de substanțe naturale biologic active de origine polizaharidică cu efect sanogen a dat un impuls simțitor cercetărilor orientate spre identificarea noilor surse, precum și a procedeelelor și tehnologiilor de obținere a preparatelor sigure pentru utilizare [106]. În ultimii ani în calitate de astfel de surse sunt studiate microorganismele, în special levurile, capabile să sintetizeze un complex de substanțe bioactive, inclusiv β -glucani, care au un rol impunător în activitatea vitală a organismelor vii [253] și obținerea cărora din punct de vedere economic este avantajoasă. Luând în considerație că

biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* este lipsită de efecte toxice asupra organismelor vii, fiind utilizată în hrana omului peste 2000 mii ani și posibilitatea reglării productivității și activității biosintetice a levurilor prin optimizarea condițiilor de cultivare, mediilor nutritive și utilizarea diferitor factori chimici și fizici [74, 184], considerăm oportune cercetările orientate spre elaborarea tehnologiilor de cultivare a acestui obiect biotehnologic și obținere a β -glucanilor.

Reieșind din cele expuse, o soluție inovativă pentru obținerea β -glucanilor din levuri poate fi identificarea noilor procedee de reglare a biosintezei lor, rezultate care vor servi ca bază la elaborarea tehnologiilor microbiene pentru producerea preparatelor cu utilizări polivalente.

Scopul lucrării constă în elaborarea tehnologiei inovative eficiente de obținere a β -glucanilor din levuri.

Pentru realizarea scopului au fost trasate **următoarele obiective:**

- Selectarea nutrienților și condițiilor optime de cultivare submersă a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în vederea ameliorării biosintezei β -glucanilor;
- Elucidarea acțiunii nanoparticulelor oxidilor de metale asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20;
- Evaluarea efectelor undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20;
- Elaborarea tehnologiei de obținere a β -glucanilor din biomasa levuriană.

Noutatea și originalitatea științifică. În premieră se propune o tehnologie inovativă de cultivare a levurii *S. cerevisiae* și de obținere a β -glucanilor, bazată pe procedee avantajoase de sinteză orientată, care contribuie la ameliorarea calității și sinecostului produsului final. Au fost selectați nutrienții preferențiali și elaborate două medii de cultură pentru tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, au fost stabilite condițiile speciale de cultivare pentru sporirea biosintezei β -glucanilor. În premieră s-a demonstrat că nanoparticule TiO_2 și ZnO , utilizate la cultivarea levurii, influențează procesul de biosinteză a β -glucanilor și altor constituenți celulare, efectul exprimându-se în funcție de dimensiunile și concentrațiile nanoparticulelor. În premieră a fost elucidat caracterul acțiunii undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra biosintezei β -glucanilor și altor componente celulare în dependență de spectrul de frecvență și durata de iradiere. Pentru prima dată au fost elaborate 2 procedee noi de sporire a conținutului de β -glucani la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, dintre care unul a fost brevetat.

Problema științifică importantă soluționată în lucrare. Au fost determinați parametrii biotehnologici optimali de cultivare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, ceea ce a contribuit la

eficientizarea procedeelelor de sinteză orientată a β -glucanilor, fapt ce a permis elaborarea tehnologiei de obținere a acestor compuși biologic activi valoroși.

Semnificația teoretică. Este fundamentată științific și demonstrată posibilitatea dirijării proceselor biosintetice și sporirii potențialului de producere a β -glucanilor la cultivarea levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 prin tehnologia cu utilizarea nutrienților preferențiali, condițiilor speciale de cultivare, a nanoparticulelor și undelor milimetrice în calitate de stimulatori.

Valoarea aplicativă. Se propun spre valorificare: tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, brevetată ca sursă de β -glucani; două variante de medii nutritive și două procedee de sinteză orientată cu aplicarea nanoparticulelor oxizilor de metale și undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă ca factori reglatori, care asigură sporirea semnificativă a cantității de β -glucani în biomasa levuriană; metoda de extragere a β -glucanilor, caracterul inovațional al căreia permite de a reduce etapele suplimentare de distrugere a peretelui celular și extragere a β -glucanilor; bioprodusul „Glucan-20” cu activitate fiziologică înaltă.

Aprobarea rezultatelor științifice. Materialele expuse în teza de doctor au fost comunicate și discutate la: Всероссийский симпозиум с международным участием „Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов”, Москва, 2014; Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare”, Chișinău, 2014; Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, Chișinău, 2015, 2016, 2017; Conferința Științifică Internațională “Științele vieții în dialogul generațiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri”, Chișinău, 2016; Международная научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов „Научные достижения молодежи – решению проблем питания человечества в XXI веке”, Киев, Украина, 2016; International Conference „NANO-2016 Ethical, Ecological and Social Problems of Nanoscience and Nanotechnologies”, Chișinău, 2016; International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 2nd and 3rd editions, Chișinău, 2014, 2016; 40th international invention show, 11th invention and prototype show and student business plan competition Karlovac, Croatia, 2015; Salonul internațional al cercetării, inovării și inventicii „PROINVENT”, Cluj-Napoca, România, 2016; European Exhibition of Creativity and Innovation „EUROINVENT”, Iasi, Romania, 2015, 2016, 2017.

Publicațiile la tema tezei. La tema tezei au fost publicate 36 lucrări științifice: 15 articole în reviste recenzate (3 – în reviste internaționale; 2 – în monoautorat), 12 teze la conferințe internaționale și naționale (6 – în monoautorat), 3 brevete de invenție, 6 materiale la saloane de invenții.

Volumul și structura tezei. Teza constă din patru capitole, are un volum de bază de 124 pagini, conține 11 tabele și 68 figuri. Lista surselor bibliografice citate include 281 titluri.

Cuvintele cheie: Tehnologie de cultivare, levuri, *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucani, carbohidrați, proteine, nanoparticule, unde milimetrice cu frecvență extra înaltă.

Sumarul compartimentelor tezei. Teza constă din 4 capitole, primul dintre care prezintă analiza situației din domeniu, iar următoarele trei reflectă contribuțiile metodice și rezultatele propriilor cercetări.

1. LEVURILE – SURSE VALOROASE DE β -GLUCANI prezintă o analiză amplă și minuțioasă a publicațiilor științifice de ultimă oră la tema de cercetare. În capitol este argumentată oportunitatea studierii β -glucanilor levurieni, care se bazează pe activitatea biologică valoroasă a acestor polizaharide și potențialul lor înalt de utilizare în medicină, farmaceutică, cosmetologie, acvacultură, zootehnie și industria alimentară și pe inofensivitatea și nontoxicitatea lor.

Capitolul include o caracteristică amplă a structurii și componenței peretelui celular la *S. cerevisiae*, inclusiv a componenței sale de bază – β -glucani. Este elucidat mecanismul de biosinteză a β -glucanilor și evidențiate principalele enzime și gene responsabile de biogeneza diferitor modificări ale acestora.

O atenție deosebită se atrage posibilității modelării biosintezei β -glucanilor levurieni prin varierea surselor nutritive și optimizarea condițiilor de cultivare. Este analizată influența nanoparticulelor de diferită natură și a undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra diferitor organisme vii și posibilitatea utilizării acestor factori în calitate de stimulatori ai sintezei β -glucanilor la levuri.

Sunt reflectate diverse metode de extracție și purificare a β -glucanilor, care permit obținerea din biomasa levuriană a preparatelor β -glucanice de calitate și cu activitate înaltă.

Prin analiză amplă a literaturii de specialitate se ajunge la concluzia că levurile *S. cerevisiae* sunt o sursă biotehnologică importantă pentru obținerea preparatelor β -glucanice biologic active, atât datorită componenței biomasei, cerințelor nutritive minime, cât și posibilității dirijării proceselor biosintetice prin varierea diferitor factori de cultivare. În final este formulată problema de cercetare și direcțiile de rezolvare a acesteia, sunt definite scopul și obiectivele cercetării.

2. BIOSINTEZA β -GLUCANILOR LA TULPINA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-20 ÎN FUNCȚIE DE NECESITĂȚILE NUTRITIVE ȘI

CONDIȚIILE DE CULTIVARE este dedicat cercetărilor ce țin de eficientizarea metodei de extragere a β -glucanilor, evaluarea capacităților de acumulare a biomasei și biosinteza a β -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, în funcție de necesitățile nutritive și condițiile de cultivare.

Studiul comparativ a metodelor de dezagregare a celulelor a demonstrat, că cea mai eficientă metodă este omogenizarea cu durata de tratare a biomasei 10 minute. Aplicarea acestui procedeu de preparare a pereților celulari în combinație cu tratarea alcalin-acidă sporește cu 34,5% conținutul de β -glucani extrași din pereții celulari levurieni și reduce durata de extragere cu 24 ore comparativ cu procedeul martor.

Au fost studiate sursele optime de carbon și azot, care asigură obținerea cantităților maxime de β -glucani.

În baza rezultatelor obținute, utilizând metoda planificării matematice a experiențelor, a fost elaborat mediul nutritiv, numit convențional R-ZZ [13], pentru cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, care permite de a obține cu 31,8% mai mulți β -glucani comparativ cu martorul.

În cazul cultivării tulpinii pe mediul YPD modificat – YPD-4, suplimentat cu acetatul de zinc, cantitatea de β -glucani este inferioară martorului cu 5,8-11,4%. În consecință, pentru cercetările ulterioare a fost utilizat mediul YPD-4.

Cercetările destinate evaluării influenței condițiilor de cultivare asupra sintezei β -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 au stabilit că temperatura de 25°C, concentrația O₂ în mediul de cultură – 81,3...83,3 mgL⁻¹ și durata de 120 ore sunt optime pentru cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și producerea β -glucanilor pe mediul optimizat R-ZZ.

Astfel, au fost stabiliți metoda de extragere a β -glucanilor, nutrienții preferențiali și condițiile optime de cultivare a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pentru obținerea biomasei cu conținut sporit de β -glucani. În baza acestor rezultate se propune un procedeu de cultivare a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 [22].

3. POTENȚIALUL BIOTEHNOLOGIC A LEVURII SACCHAROMYCES CEREVISIAE CNMN-Y-20 SUB INFLUENȚA NANOPARTICULELOR OXIZILOR METALICI prezintă rezultatele cercetărilor proprii ce țin de elucidarea influenței nanoparticulelor oxizilor de metale asupra proprietăților morfo-culturale, viabilității, producției de biomasă, activității biosintetice și enzimatică a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Au fost testate nanoparticulele de TiO₂ și ZnO. Efecte de stimulare a sintezei β -glucanilor au fost obținute pentru nanoparticulele de ZnO cu dimensiunea 30 nm în concentrație de 5-10 mg/L.

Nanoparticulele de ZnO de asemenea s-au manifestat în calitate de remediu ce înlătură efectele negative ale alcoolului. Datele obținute au confirmat că nanoparticulele ZnO nu pot înlătura efectul negativ al concentrațiilor înalte de alcool etilic asupra multiplicării celulelor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și producției de biomasă, în același timp influențează pozitiv procesul de biosinteză a β -glucanilor, carbohidraților și proteinelor. Nanoparticulele ZnO (30 nm), aplicate în procesul de cultivare a levurii, pot fi precăutate ca un factor eficient pentru a spori producția de β -glucani sub aspect industrial. S-a constatat că ponderea conținutului de β -glucani este maximală în cazul cultivării tulpinii în prezența a 5 mg/L nanoparticule ZnO și 2% alcool etilic. Rezultatele obținute au stat la baza elaborării unui procedeu nou de stimulare a biosintezei β -glucanilor, care permite de a obține cu 30,7% mai mulți β -glucani față de martor [11, 88].

4. ELABORAREA TEHNOLOGIEI DE CULTIVARE A TULPINII *S. CEREVISIAE* CNMN-Y-20 ȘI DE OBTINERE A β -GLUCANILOR este dedicat elaborării unei tehnologii integrate de obținere a β -glucanilor, care include utilizarea undelor milimetrice cu frecvența extra înaltă.

Studiul ce reflectă acțiunea undelor milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz în funcție de durata de iradiere a demonstrat, că în intervalul de 15-20 minute de iradiere tulpina acumulează activ carbohidrați, inclusiv β -glucani și proteine. Între conținutul de biomasă, carbohidrați, β -glucani, proteine și activitatea catalazei la tulpina de levuri iradiată s-a stabilit un grad înalt de dependență (coeficienții de determinare variază în limitele $R^2=0,633...0,949$), fapt ce demonstrează că sinteza acestor componente celulare este influențată de același factor, undele milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz. În baza acestor rezultate a fost elaborat un procedeu de stimulare a biosintezei β -glucanilor, bazat pe iradierea tulpinii cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz timp de 20 minute. Avantajul procedeuului propus constă în majorarea conținutului de β -glucani cu 25,7% față de martor. Procedeu este brevetat [7].

Cercetările ce țin de influența undelor milimetrice asupra tulpinii studiate au permis elaborarea tehnologiei de producere a β -glucanilor, bazat pe utilizarea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă în calitate de factor reglator.

Tehnologia elaborată asigură un spor al cantității de β -glucani de până la 25,2% față de tehnologia martor.

În baza β -glucanilor obținuți conform tehnologiei a fost elaborat preparatul biologic activ Glucan-20, care în componența rațiilor furajere, majorează cu 22,0-26,7% supraviețuirea larvelor, cu 16,9-24,0% masa medie a unei larve, cu 45,2-56,3% ihtiomasă generală medie.

Rezultatele obținute la crescătoriile de pești au fost brevetate [8] și sunt documentate prin acte de implementare.

Astfel, această lucrare dezvăluie mai multe aspecte, scopul final al cărora este selectarea mediului și condițiilor optime de cultivare a producătorului, evaluarea stimulatoarelor chimici și fizici ai sintezei β -glucanilor, elucidarea metodelor eficiente de extracție a β -glucanilor, elaborarea tehnologiei de obținere a acestora, testarea lor în practică și deci prezintă atât importanță teoretică, cât și valoare aplicativă.

1. LEVURILE – SURSE VALOROASE DE β -GLUCANI

1.1. Oportunitatea studierii β -glucanilor la levuri

În ultimele decenii biotehnologiile microbiene au influențat tot mai mult întreaga activitate umană, iar comunitatea științifică internațională acordă o atenție deosebită studiilor de estimare a biodiversității microorganismelor și utilizare a acestora în diverse procese biotehnologice. O problemă actuală este căutarea noilor surse de materie primă pentru elaborarea preparatelor medicamentoase și profilactice, suplimentelor furajere și alimentare biologic active. În ultimii ani în calitate de astfel de surse sunt studiate microorganismele și în special drojdiile, capabile să sintetizeze un complex de substanțe bioactive, inclusiv polizaharide, cu un rol important în activitatea vitală a organismelor vii [253], obținerea cărora este mult mai avantajoasă din punct de vedere economic în comparație cu cele de origine animală și vegetală.

Producerea microbiologică a polizaharidelor biologic active este una din ramurile biotehnologiilor ce se dezvoltă rapid. În prezent industria microbiologică produce un spectru larg de polizaharide valoroase: WGP (whole glucan particles), Zymosan, Curdlan, dextran, xantan, etc. [121]. Însă toate aceste preparate sunt importate în Republica Moldova, fapt ce evidențiază necesitatea și actualitatea cercetărilor ce țin de elaborarea tehnologiilor autohtone de obținere a polizaharidelor naturale.

Printre producători de polizaharide se regăsesc reprezentanți ai diferitor clase, familii, genuri și specii de microorganisme. Însă cei mai mulți aparțin regnului *Fungi* printre care pot fi menționate macromicetele cei din genurile *Lentinus*, *Ganoderma*, *Agaricus*, [119] și micromicetele din genurile *Candida*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Neurospora*, *Rhodotorula* și *Saccharomyces*, care conțin până la 40-55% polizaharide intracelulare [234]. În acest context, un mare interes științifico-practic, la momentul actual, îl prezintă polizaharidele de bază ale peretelui celular al levurilor, și anume glucanii.

Deși printre levurile producătoare de polizaharide, utilizate în alimentație, se regăsesc reprezentanți ai genurilor *Zygosaccharomyces*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, totuși *Saccharomyces cerevisiae* rămâne o sursă majoră de β -glucani [49, 78, 184].

β -glucanii obținuți din levuri au fost aprobați de Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară ca ingrediente alimentare noi [106] și recunoscute ca fiind sigure GRAS (Generally Recognized as Safe) de către Administrația SUA pentru Alimente și Medicamente [120, 253, 275].

Saharomicetele sunt utilizate în producerea alimentelor și băuturilor fermentate timp de mii de ani și sunt cele mai detaliat studiate microorganisme, ale căror condiții de cultivare sunt foarte

bine cunoscute și pot fi optimizate pentru a maximiza randamentul de producere a β -glucanilor. Din punct de vedere biotehnologic ele au avantajul de a produce o cantitate mare de biomasă cu cheltuieli minime. Biomasă de levuri în calitate de produs secundar al producției de bere, vin ar putea fi de asemenea utilizată ca materie primă pentru obținerea β -glucanilor [257].

β -glucanii sunt polizaharide ale monomerilor de D-glucoză legați prin legături β -glicozidice. În calitate de fibre dietetice, β -glucani se găsesc într-o varietate largă de surse naturale: drojdii, ciuperci, bacterii, alge, orz și ovăz [280]. Aceștea posedă mai multe proprietăți benefice grație cărora și-au găsit aplicație în diverse domenii. Pe lângă perspectiva utilizării lor în medicină, β -glucanii prezintă interes major pentru industria alimentară, cosmetică, farmaceutică, chimică, veterinarie și producerea furajelor [117, 281]. Obținuți din diferite surse naturale, posedă activitate biologică înaltă, ceea ce îi face indispensabili pentru obținerea diferitor produse medicamentoase, alimentare și de uz veterinar.

Efectul antiviral și antibacterian [37, 55, 64], proprietățile imunomodulatoare [70, 71, 235], imunostimulatoare [80, 133, 252], și anticancerigene [51, 83, 84, 137] a β -glucanilor permit utilizarea lor la elaborarea medicamentelor anticancerigene și evidențiază semnificația biomedicală deosebită a acestora. Recent s-au confirmat proprietățile hipocholesterolemice [149, 263], antimutagene [169], antiinflamatorii [105, 135] și antioxidante [165, 183] ale β -glucanilor, lărgind și mai mult spectrul de utilizare a acestor compuși în medicină și farmaceutică.

Utilizarea β -glucanilor și altor polizaharide biologic active de origine naturală deschid noi perspective privind tratamentul și prevenirea bolilor alergice. Mecanismele de acțiune a acestor substanțe se bazează pe activarea răspunsului limfocitelor T_H1 , suprimarea paralelă a reacțiilor alergice imune ale organismelor vii și restabilirea echilibrului limfocitar $T_H1/T_H2/T_H17$. Imunomodularea prezintă pe viitor o abordare eficientă în prevenirea și tratamentul astmului bronșic și altor boli alergice [136, 240].

Rezultate promițătoare au fost obținute privind posibilitatea reglării nivelului de zahăr în sânge cu ajutorul β -glucanilor. Astfel, efect benefic asupra indicelui glicemic a avut ingestia de β -glucani, din *S. cerevisiae* și alte surse naturale, de către animale [95, 96, 161] și om [126].

1,3- β -glucan liniar din *Saccharomyces cerevisiae* stimulează proliferarea fibroblaștilor, creșterea numărului de plasmocite, contribuind la cicatrizarea rănilor și vindecarea mai rapidă a ulcerului venos la om. Rezultatele sugerează că β -glucanii sunt stimulatori ai procesului de vindecare naturală a rănilor. Însă pentru a elucida mecanismele de acțiune și a evalua beneficiile terapeutice a acestor polizaharide sunt necesare studii detaliate suplimentare [220].

Tulpinile de levuri *S. cerevisiae* din diferite subspecii și variante pot fi incluse în grupul microorganismelor prebiotice din care face parte *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*. Rezultatele unor studii recente a Jawhara et al. [135] confirmă acest fapt, iar activitatea biologică înaltă a acestor tulpini, se datorează prezenței β -glucanilor în peretele celular [140, 154]. Aceste tulpini prezintă o activitate biologică semnificativă, care constă în prevenirea adeziunii tulpinilor de microorganisme patogene la epiteliul intestinal, inhibarea activității toxinelor bacteriilor patogene, prevenirea diareelor după tratament cu antibiotice, imunostimulare și activitate anti-inflamatorie.

Micotoxinele, produse de multe specii de *Aspergillus* (predominant *Aspergillus flavus* și *Aspergillus parasiticus*), reprezintă un pericol eminent pentru organismele vii, fiind unul din cei mai persistenți contaminanți ai hranei. Aceste toxine au efecte adverse semnificative asupra sănătății animalelor și a omului. Astfel de toxine cresc susceptibilitatea la infecții, compromit sistemul imunitar. Expunerea permanentă la micotoxine cauzează necroza hepatică acută, care poate duce la ciroză sau carcinoma ficatului. Insuficiența hepatică acută se manifestă prin hemoragie, edem, modificări ale digestiei, absorbției și metabolismului nutrienților. Studiile recente sugerează posibilitatea utilizării β -glucanilor în calitate de detoxifinanți pentru reducerea și evitarea efectelor negative cauzate de agenții toxici din mediu [72, 163, 202, 259].

În prezent tot mai des se discută despre utilizarea biomasei de levuri *S. cerevisiae* și a derivatelor acesteia de natură polizaharidică la remedierea siturilor poluate cu metale grele: Cd, Cu, Hg, Pb, Cr, Cs, Ni, U, Sr, Zn, etc. Mecanismul de biosorbție este bazat pe interacțiunea ionilor metalici cu peretele celular al levurilor [166, 218, 226, 231].

Actualmente, grație proprietăților antioxidante, de vindecare a plăgilor, protecție de radiațiile ultraviolete și reducere a ridurilor, efectului de hidratare a tenului și măririi permeabilității pielii, este discutată pe larg posibilitatea utilizării β -glucanilor din diferite surse naturale în cosmetologie [53, 104]

Investigațiile de ultimă oră reliefează perspectiva utilizării glucanilor în zootehnie și acvacultură, domenii ale economiei ce prezintă interes deosebit pentru Republica Moldova. Dezvoltarea intensivă a acvaculturii și zootehniei este indispensabil însoțită de creșterea numărului de boli cauzate de diverse microorganisme. Pentru a preveni și controla aceste boli se utilizează diferite medicamente, produse chimice sintetice și vaccinuri. O abordare alternativă este aplicarea unor compuși naturali pentru stimularea sistemului imunitar al peștilor și animalelor. Acești compuși sunt cunoscuți ca imunostimulatori, rolul benefic al căror în managementul bolilor deja e stabilit. Astfel, e demonstrat că atât biomasa *S. cerevisiae* cât și derivatele acesteia, în special β -glucanii, suplimentate la nutrienții specifici îmbunătățesc

calitatea furajelor, stimulează răspunsul imun, creșterea și dezvoltarea organismelor, majorează supraviețuirea animalelor nou-născute și a puietului de pește [25, 34, 71, 148, 174, 177, 200, 262].

Potențialul înalt de utilizare a β -glucanilor și altor derivate a biomasei de levuri ca hidrocoloizi în industria alimentară se bazează în principal pe proprietățile lor reologice, adică capacitatea lor de gelifiere și capacitatea de a mări viscozitatea soluțiilor apoase. Astfel, β -glucani din diferite surse naturale sunt utilizați ca agenți de îngroșare pentru a modifica textura, aspectul și parametrii organoleptici ai produselor alimentare [49, 69, 119]. În plus, ei pot fi utilizați ca stabilizatori în fabricarea produselor dietice cu conținut scăzut de grăsimi, cum ar fi sosurile pentru salate, biscuiți, înghețată, iaurturi și brânză [153, 212, 251, 275, 281]. β -glucanii și manoproteinele de levuri au fost de asemenea examinați în calitate de substituenți ai grăsimilor în maioneză și în alte produse alimentare [260, 265].

Astfel, activitatea biologică înaltă și diversitatea domeniilor de utilizare a β -glucanilor fungici, în special a celor din levuri, evidențiază oportunitatea studierii acestor compuși, care posedă potențial înalt în promovarea sănătății umane și elaborarea preparatelor biologic active cu utilizări polivalente.

1.2. Structura, compoziția chimică și mecanismul de biosinteză a β -glucanilor

Peretele celular este vital pentru creșterea, supraviețuirea și morfogeneza fungilor. El este o barieră de protecție împotriva unei game largi de condiții nefavorabile ale mediului, cum ar fi temperaturile joase și înalte, deshidratarea și stresul osmotic, precum și împotriva altor microorganisme. Proteinele receptori ai peretelui celular permit fungilor să evalueze și să răspundă la schimbările mediului înconjurător. Polizaharidele mediază proprietățile adezive ale celulei fungice și permite colonizarea mediilor noi. Peretele celular este, de asemenea, esențial pentru participarea unei game largi de fungi la formarea biofilmului - nișă ecologică importantă pentru multe microorganisme. Pentru fungii patogeni, peretele celular determină virulența și patogenitatea lor, le ajută la invazia țesutului gazdă și le oferă protecție față de mecanismele de apărare ale gazdei.

Sursele naturale majore de β -glucani sunt bacteriile, drojdiile, algele, ciupercile și plantele [256]. Levurile sunt microorganisme bine cunoscute care se utilizează în biotehnologie din cele mai vechi timpuri, și prezintă o sursă sigură și importantă de β -glucani [264].

Pereții celulari ai fungilor sunt compuși din glucani, chitină și chitosan, manoproteine și/sau galactomanani și glicoproteine. Componentele de bază a peretelui celular al *S. cerevisiae* sunt manoproteinele, 1,3-; 1,6- β -glucanii și chitina (Figura 1.1). O varietate largă de glucani: 1,3- β ; 1,4- β ; 1,6- β ; 1,3- α ; 1,4- α) și diferite combinații a acestora s-au identificat în pereții celulelor

fungice. Acești polimeri sunt sintetizați pe membrană plasmatică cu ajutorul glucan sintazelor și apoi exudați în spațiul peretelui celular [234].

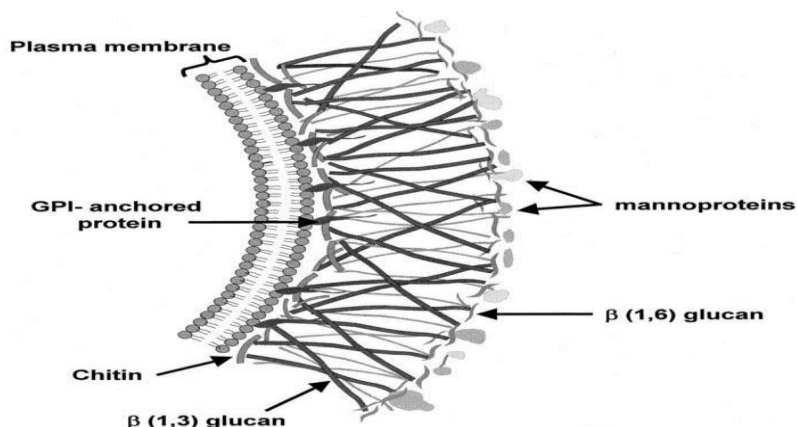


Fig. 1.1. Structura peretelui celular la *S. cerevisiae* [225].

Dintre cele 3 componente majore ale levurilor (lipide, proteine și carbohidrați), anume carbohidrații și-au găsit cea mai largă aplicare în practică, în special β -glucanii.

Structura chimică nativă a β -glucanilor depinde de sursa din care sunt izolați. Fiecare tip de β -glucan, derivat din diferite surse, are o structură unică în care unitățile de glucoză sunt legate între ele în mod diferit [115, 239].

Polizaharidul β -D-glucan din levura este un biopolimer al D-glucozei. Acesta constituie un element structural major al peretelui celular de levuri. Celălalt element structural principal al peretelui celular sunt manoproteinele, constituite din polimeri ai manozei și fracțiuni de proteine [152]. În peretele celular al levurii, se regăsesc două tipuri principale de β -D-glucani: 1,3- β -D-glucan liniar, componenta principală (85%), reprezentând mai mult de 50-55% din peretele celular și 1,6- β -D-glucan ramificat - (15%) (Figura 1.2) [155, 175]. În general, peretele celular reprezintă până la 30% din masa uscată a celulelor levuriene [48].

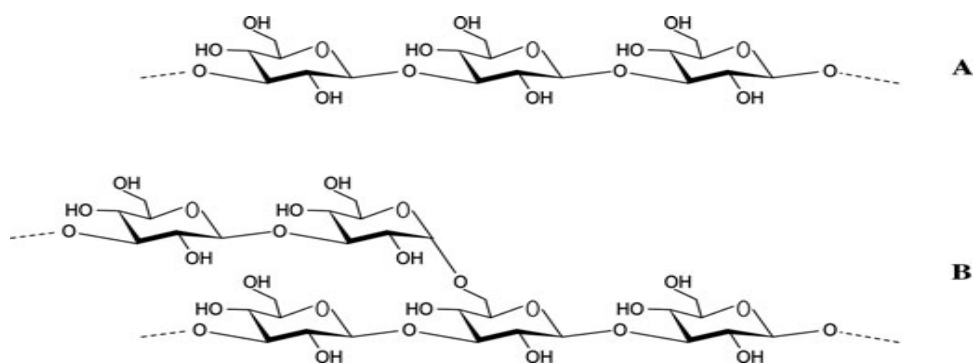


Fig. 1.2. Structura 1,3- β -D-glucanului liniar (A) și 1,6- β -D-glucanului ramificat (B) al levurilor *S. cerevisiae* [115].

În literatura de specialitate în mod frecvent sunt descrise trei clase de β -glucani a levurilor, bazate pe proprietățile lor de solubilitate: 1,3- β -glucan alcalin-insolubil-acid acetic insolubil,

care este responsabil de proprietățile mecanice și structurale ale peretelui celular de levuri; 1,3- β -glucan solubil în alcalii ce conferă flexibilitate peretelui celular; 1,6- β -glucan solubil în alcalii, care stă la baza structurii macromoleculare a peretelui celular de levuri, asigurând interconectarea dintre catenele liniare de 1,3- β -glucan, chitină și manoproteine [266]. Această structură complexă asigură rigiditatea și insolubilitatea peretelui celular de levuri. [270] Încă un polimer, 1,4- α -D-glucan, similar glicogenului, reprezentând 3-7% din peretele celular, poate fi asociat la β -glucani prin legături covalente, formând complecși α , β -glucanici [151].

În peretele celular al levurilor *S. cerevisiae* 1,3- β -glucanul se organizează într-o structură complexă, compusă din lanțuri helix simple sau asociate în triplu helix, stabilizată prin legături de hidrogen (Figura 1.3) [153].

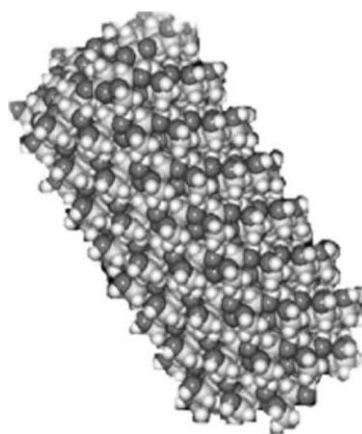


Fig. 1.3. Structura Triplu-Helix a 1,3- β -D-glucanilor din peretele celular al *S. cerevisiae* conform [276].

Moleculele de glucan asociate prin legături de hidrogen laterale formează subunități microfibrilare similare cu cele de celuloză sau de xilan. La rândul lor, microfibrilele de glucan se asociază, organizând în interiorul matrixului parietal o rețea cu o arhitectură și topografie complicată. Experiențele cu protoplaștii de levuri au arătat că aceștia regenerează pe suprafața lor o structură reticulară glucanică, dar care pare să difere de glucanii insolubili ai peretelui nativ, ce rămân după extracția manoproteinelor [150]. Astfel, 1,3- β -glucanul este foarte potrivit pentru a servi ca bloc major de construcție a peretelui celular.

Sinteza peretelui celular la levuri are loc pe membrana plasmatică și este dependentă de proteinchinazele secretorii și controlată de un sistem enzimatic echilibrat, care conține hidrolaze, glicozidaze, glicoziltransferaze și transglicozilaze. Acest sistem numit GH72, ce conține 72 de enzime, este prezent în organismele fungice și posedă funcția importantă de sinteză a unităților de structură și alungire a lanțurilor de 1-3-; 1-6- β -glucan. Cu toate acestea, mecanismele moleculare care controlează echilibrul între hidroliză și transglicozilare în aceste sisteme nu sunt pe deplin elucidate [124, 132, 224].

1,3- β -glucanul este sintetizat de 1,3- β -glucan sintază, o enzimă asociată cu membrana plasmatică situată în multiple domenii transmembranare. Enzima utilizează UDP-glucoza citoplasmatică ca substrat și adaugă monomeri de glucoză la capătul polimerului glucanic liniar. *S. cerevisiae* posedă trei gene răspunzătoare de producerea 1,3- β -glucan sintetazei, dar principală este FKS1, care funcționează ca sintetază de bază a 1,3- β -glucanilor în timpul creșterii și dezvoltării levurii [143].

FKS1 se găsește în asociere cu proteină G RHO1, care funcționează ca subunitate de reglementare pentru FKS1. Funcția RHO1 în sistemul de transducție a semnalelor este controlul căilor de semnalizare a MAP (mitogen-activated protein) chinazei, care reglează creșterea celulelor și integritatea peretelui celular. Asocierea FKS1 cu G RHO1 este necesară pentru a activa sau inhiba sinteza 1,3- β -glucanului în condiții normale sau de stres [143, 155, 242]. Mobilitatea FKS1 1,3- β -glucan sintetazei, necesară pentru sinteza și asamblarea uniformă a peretelui celular, este asigurată de o proteină structurală numită actină. Aceasta se află în AP (actinoplaști) în anumite locații a membranei plasmatică fiind de tip FLI (finger-like invagination), în care are loc sinteză și asamblarea lanțurilor de 1,3- β -glucan în triplu-helix (nanofibrile elementare) și în microfibrile [144, 191]. Datorită importanței sale în biogeneza peretelui celular, 1,3- β -glucan sintetaza este o țintă primordială pentru acțiunea agenților antifungici [85].

β -glucanii reprezintă aproximativ 30-60% din masa uscată a peretelui celular al *S. cerevisiae*, manoproteinele și chitina constituie 20-50% și respectiv 1-2%. Moleculele de 1,3- β -glucan sunt formate din aproximativ 1500 monomeri de glucoză, iar ponderea acestui polimer în conținutul total de glucan atinge 65-90%. 1,6- β -glucanul este un polimer cu greutate moleculară mică, constituit în medie din 130-150 fragmente de glucoză [152, 155].

1,6- β -glucanul este o componentă specifică esențială a peretelui celular al *S. cerevisiae* care interconectează toate celelalte componente structurale într-un grilaj. Eforturi considerabile au fost îndreptate la identificarea și caracterizarea etapelor biosintezei sale din punct de vedere genetic și biochimic. Studiile arată că acest polimer joacă un rol central în structura peretelui, și leaga lanțurile de glucan 1,3- β - cu chitina de manoproteine. Cercetările genetice au identificat genele ce codifică pentru enzimele responsabile de sinteza 1,6- β -glucanului, defectarea cărora duce la diverse modificări în structura 1,6- β -glucanului, de multe ori cu consecințe letale.

Acestea includ genele responsabile de sinteze proteinelor specifice cu același nume KRE5, BIG1 și ROT1, care au fost localizate în reticulul endoplasmatic și controlează împachetarea și transportul moleculelor în aparatul Golgi. Proteinele KRE6 și SKN1 sunt de asemenea necesare pentru sinteza normală a 1,6- β -glucanului. Secvența și structura lor sugerează că aceste proteine

sunt glicozilhidrolaze sau transglicozidaze și au menirea de a forma rețeaua de 1,6- β -glucanul în peretele celular. Studiile asupra proteinelor KRE6 și SKN1 indică că acestea sunt localizate în aparatul Golgi. KRE1 este o proteină glicosilphosphatidilinositol GPI ancorată care deasemenea este necesară pentru sinteza normală a peretelui celular și are funcția de a alungi lanțul de 1,6- β -glucan. KRE9 și KNH1 sunt o pereche dublă de proteine a peretelui care nu sunt legate de GPI și au funcția de a direcționa corect încorporarea 1,6- β -glucanului în peretele celular, depistarea 1,6- β -glucan sintazei în membrana plasmatică și legarea polimerilor componenți ai peretelui între ei [155, 242]. Pierderea ambelor, KRE9 și KNH1, este letală. Sinteza 1,6- β -glucanului este localizată pe membrana plasmatică, iar 1,6- β -glucan sintetaza funcționează similar și 1,3- β -glucan sintetaza [234].

Produsele activității acestor gene au fost localizate în întreaga cale secretorie și la suprafața celulelor. Cu toate acestea, activitatea majorității genelor identificate rămâne necunoscută, ceea ce face neclar în ce măsură și mod acestea contribuie la modificarea compoziției β -glucanilor. Date curente structurale și genetice au permis dezvoltarea unor modele pentru a prezice procesele biosintetice. Pe baza cunoștințelor despre sinteza glucanilor și a chitinei, este probabil că cea mai mare parte a lor se sintetizează la suprafața celulelor, dar necesită în prealabil evenimente cheie intracelulare [164].

Conținutul de polizaharide și manoproteine, gradul lor de polimerizare și structura chimică sunt caracteristici individuale ale fiecărei tulpini, în funcție de condițiile de creștere și timpul de cultivare [96]. Structura macromoleculară a polimerilor izolați din pereții celulari a diferitor specii de levuri se caracterizează prin grad diferit de polimerizare și ramificare. Astfel de parametri ca greutatea moleculară, gradul de ramificare și structura primară, determină proprietățile fizice și chimice (de exemplu, solubilitatea) a β -glucanilor și manoproteinelor de care depinde activitatea lor biologică [57, 207]. Greutatea moleculară a polizaharidelor este corelată cu activitatea lor antitumorală. Polizaharidele, în special de tip glucan - 1,3- β - și 1,6- β -cu greutate moleculară mare, posedă activitate biologică înaltă, comparativ cu cele cu greutate moleculară mică.

Insolubilitatea în apă a β -glucanilor din levuri limitează în mod substanțial aplicarea lor în practică. Pentru a facilita utilizarea practică, a majora și diversifica activitatea biologică a β -glucanilor au fost elaborate diverse metode pentru obținerea derivaților β -glucanilor naturali. Aceste metode includ prepararea de derivați esterificați, sulfatați, fosforilați și carboximetilați ai β -glucanilor levurieni [112, 277].

Așadar, utilizarea practică a elementelor structurale ale pereților celulari ai levurilor depinde de specia și chiar de tulpina de fungi, precum și de metodele de cultivare a lor, metoda de izolare și preparare a polizaharidelor [77].

Astfel, putem concluziona că structura β -glucanilor levurieni este foarte diversă și ține de varietatea taxonomică a microorganismelor din care sunt obținuți, iar activitatea lor biologică în mare măsură depinde atât de structura primară și terțiară, greutatea moleculară, gradul de ramificare cât și de metoda de izolare și preparare.

1.3. Modelarea biosintezei β -glucanilor prin varierea factorilor de cultivare

Funcționalitatea polizaharidelor și randamentul de producere a acestora sunt extrem de dependente de varietatea taxonomică a producătorului, compoziția mediului nutritiv, condițiile de cultivare, cum ar fi temperatura, pH-ul, aerația și durata acesteia [56, 74, 147].

Din punct de vedere biotehnologic, eficiența procesului poate fi mărită prin stimularea biosintezei acestor polizaharide și/sau obținerea unei productivități mai mari a biomasei de levuri. Acest lucru poate fi realizat printr-o selecție adecvată a compoziției mediului de cultură și a condițiilor de cultivare. Optimizarea acestor parametri în procesele de biosinteză a metabolitului dorit este unul dintre cele mai importante aspecte ale biotehnologiei industriale. Costurile întregului proces biotehnologic sunt determinate în primul rând de costul mediului nutritiv [190].

Un parametru important ce caracterizează mediul de cultură este raportul carbon:azot:fosfor (C:N:P) și carbon:azot (C:N). Disponibilitatea și proporția corectă dintre elementele menționate mai sus sunt importante din punct de vedere al cultivării și utilizării biomasei microbiene, optimizării condițiilor pentru biosinteza anumitor produse ale metabolismului microbial. În producerea biomasei levuriene, raportul cel mai favorabil de carbon, azot și fosfor (C:N:P) este de aproximativ 6,25:1:0,125 [210].

La *S. cerevisiae*, modificări ale compoziției carbohidraților peretelui celular apar atunci când celulele cresc în diferite condiții. În general, schimbările în starea fiziologică a celulei și reacția sa la condițiile externe ar putea fi atribuite structurii dinamice a peretelui celular, în timp ce, arhitectura și mecanismele celulare responsabile pentru sinteza acestuia pot fi controlate prin compoziția mediului de cultură [67]. Astfel, Aguilar-Uscanga și François au confirmat că conținutul de β -glucani și manoproteine în peretele celular al levurilor este strâns legat de condițiile de creștere și biosinteză a polizaharidelor levuriene, fiind influențat mult de tipul sursei de carbon și azot, pH-ul mediului, temperatura de cultivare, gradul de oxigenare a mediului, precum și faza de dezvoltare celulară [48].

Creștere semnificativă (10-20%) a conținutului de polizaharide, exprimat în greutate uscată, în peretele celular al levurilor de bere *S. cerevisiae* R9 a fost observată la cultivare în mediu cu glicerol în concentrație de 2-5% și pH 4,0. Conținut maxim de carbohidrați (58%) la tulpina probiotică *S. cerevisiae var. boulardii* a fost depistat la cultivare în mediu cu 3% de glicerol și pH 5,0. Peretele celular al levurii probiotice era caracterizat printr-un conținut ridicat de manoproteine, comparativ cu peretele celular al levuriilor de bere *S. cerevisiae* R9, compus în special din β -glucani. După cultivare în mediu nutritiv cu 2 și 3% de glicerol, celula de levuri de bere conținea cea mai mare cantitate (36% S.U.) de 1,3-/1,6- β -glucani. Glicerolul în concentrație de 3 și 5% intensifica biosinteza manoproteinelor în peretele celular al *S. cerevisiae* R9, cantitatea lor ajungând la 29% S.U., comparabilă cu cea din levurile cu proprietăți prebiotice, cultivate într-un mediu cu pH-ul 5,0 cu 3% de glicerol [77].

Modificări în structura peretelui celular la tulpina de levuri furajere *Candida utilis* ATCC 9950 au fost observate în funcție de mediul de cultură. Mediul nutritiv în bază de suc de cartofi deproteinizat cu pH-ul 5,0 suplimentat cu 5 și 10% glicerol a intensificat semnificativ biosinteza 1,3/1,6- β -glucanilor în peretele celular al levurii studiate. Celule pe acest mediu erau caracterizate prin pereți celulari mai groși, cu conținut de β -glucani de aproximativ 44-45% la S.U., fiind semnificativ mai mare în comparație cu cel determinat după cultivare în mediul YPD (aproximativ 31%) [75].

Mediile de cultură diferențiale trebuie să conțină substanțe care pot facilita dezvoltarea levurilor fără a afecta viabilitatea lor. Cercetările științifice au arătat că mediile nutritive pentru cultivarea *S. cerevisiae* includ sursă de carbon și azot, agenți de creștere, săruri minerale și microelemente.

Astfel, Naruemon M. și colaboratorii au studiat efectul aditivilor SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), NaCl și a diferitor combinații dintre acestea asupra producției de β -glucani la *S. cerevisiae* Angel®. Rezultatele au arătat că toate mediile completate cu aditivii studiați majorează producția de β -glucani cu o eficiență de 7-40% față de martor. Levura cultivată în mediul YPD suplimentat cu 100 mg/L SDS a produs cea mai mare cantitate de β -glucan: cu 40% mai mult față de martor. În același timp, conținutul de proteine a scăzut semnificativ, probabil din cauza proprietății SDS de a extrage proteinele din peretele celular. În alte variante deasemenea s-a determinat o majorare a conținutului de β -glucani, însă diferența față de martor nu era atât de semnificativă 15-27% [184]. Bazându-se pe studiile altor cercetători [271] ei susțin că stimularea biosintezei β -glucanilor este un răspuns al celulelor la stres, care, în condiții nefavorabile, în acest caz cauzate de SDS, prin diferite căi de semnalizare își activează mecanismele enzimatice pentru a proteja celula de deteriorare. Sub acțiunea SDS

are loc activarea (FKS1) β -glucan sintetazei și redistribuirea ei pe suprafața membranei plasmatică pentru a repara deteriorările apărute în peretele celular [155].

Descoperirea multiplelor căi de semnalizare, implicate în reglarea organizării peretelui celular de levuri ca răspuns la diferite semnale de mediu, a condus la recunoașterea biogenezei peretelui celular ca un proces dinamic, complex și la o nouă înțelegere a naturii interdependente a proceselor de remodelare a peretelui celular [156, 201].

Sursele de carbon utilizate pentru fermentarea levurilor includ glucoza, zaharoza, lactoza, fructoza, maltoza, și amidonul, din care glucoza este sursa optimă a *S. cerevisiae* și este utilizată pentru a spori randamentul levurilor [86].

Glucoza este un compus indispensabil și strict necesar pentru bună sinteză a peretelui celular și funcția sinergică a glucozidazelor și tuturor enzimelor implicate în acest proces. Ea este responsabilă de activarea enzimelor membranei plasmatică, cu rol multiplu în organism: mediază fluxul de ioni și protoni în membrana celulară, reglând pH-ul și protejează celula de cationii toxici [63, 79].

Calea pentru catabolismul glucozei în *S. cerevisiae* este glicoliza, caracteristică și pentru alți carbohidrați. Fructoza și glucoza sunt ușor fosforilate și intră în glicoliză în mod direct, în timp ce galactoza și manoza sunt mai întâi convertite în glucoză-6-fosfat și fructoză-6-fosfat, respectiv, înainte de a intra în glicoliză. Di-, tri- și oligozaharidele trebuie să fie hidrolizate în monozaharide, care pot intra în calea glicolitică. Zaharoza, prin urmare, este hidrolizată în glucoză și fructoză de către invertază, maltoza în glucoză de către maltaze (α -D-glucozidază) și melibioza în galactoză de către melibiaze (α -D-galactozidaze). Poli- și trizaharidele constând din unul sau mai multe tipuri de monomeri sunt hidrolizate în monozaharide printr-o combinație de enzime. Rafinoza, de exemplu, este redusă în monozaharidele galactoza, glucoza și fructoza prin eforturile combinate ale melibiazei și invertazei. Amidonul necesită glucoamilaze pentru a fi hidrolizat până la glucoză [65].

Ca și în cazul surselor de carbon, *S. cerevisiae* a dezvoltat mecanisme care permit utilizarea rapidă și optimă a mai multor surse de azot și reprimarea utilizării surselor de azot mai puțin favorabile. Acest fenomen și mecanismul său de bază au fost denumite „regulamentul de azot”. Surse de azot, precum amoniacul, glutamatul și glutamina sunt descrise ca surse de azot preferențiale, care asigură o rată de creștere mult mai ridicată decât sursele considerate sărace, cum ar fi prolina, arginina sau ureea [113]. Sursele de azot organic pentru fermentarea *S. cerevisiae* sunt peptona, cazeina și extractul de levuri, în același timp levurile sunt capabile să utilizeze și surse de azot anorganic așa ca sulfatul de amoniu, azotatul de potasiu. În același timp Zeng și colaboratorii au descoperit că microorganismele ar putea fi afectate în mod semnificativ

de utilizarea concomitentă a două surse de azot diferite, ca de exemplu peptona și extractul de levuri [278]. Pentru a utiliza orice compus care conține azot, celulele levuriene trebuie să-l transforme în glutamină sau glutamat. Compușii azotați se sintetizează în celulele de levuri, folosind produsele asimilării sursei de carbon și glutamatul sau glutamina ca donor de azot [243].

Astfel, levurile *S. cerevisiae* sunt capabile să utilizeze o gamă largă de surse de carbon și azot, dar nu toate dintre acestea sunt utilizate cu o eficiență egală.

Factorii fizici ai mediului de cultură au, de asemenea, o influență semnificativă asupra creșterii și metabolismului microorganismelor. Temperatura de cultivare, pH-ul, aerația mediului și durata procesului de cultivare determină activitatea fiziologică a culturilor și acționează asupra proprietăților și compoziției biochimice a microorganismelor.

Cercetările privind influența temperaturii, pH-ului și aerației mediului de cultivare asupra sintezei polizaharidelor de către *Ganoderma lucidum* au arătat, că temperatura de +25-30°C este optimală pentru aceste procese. Cultura posedă capacitate de a crește într-un spectru larg de valori ale pH-ului de la 3,0 până la 7,5 și mai sus. Productivitatea maximală după biomasă s-a determinat la un pH inițial de 6,0-7,0 și o aerație a mediului de 0,155-0,325 g O₂/l oră. Scăderea pH-ului de la 6,0 la 4,0 și a aerației până la 0,155 g O₂/l oră a dus la intensificarea sintezei polizaharidelor. Optimizarea condițiilor de cultivare nu a avut nici un efect asupra compoziției calitative a polizaharidelor, glucanii constituind partea principală a lor [28].

Prin varierea pH-ului de la 3,5 la 6,5 și temperaturii de cultivare de la +20 la 40°C, pe un mediu nutritiv mineral în care glicerolul (50 gL⁻¹) a servit ca unică sursă de carbon, Chagas B. și colaboratorii au determinat intervalele optime de sinteză a polizaharidelor peretelui celular la *Komagataella (Pichia) pastoris* DSM 70877. Varierea parametrilor în aceste limite nu a influențat semnificativ productivitatea de biomasă, însă a modificat esențial raportul dintre polizaharidele peretelui celular al tulpinii. Astfel, în intervalul de pH 4,5-5,8 și temperatură +26-38°C raportul dintre conținutul de chitină și glucani era de 14:86, în timp ce o reducere drastică a chitinei până la 6% a fost observată în afara acestor intervale [81].

În baza unor cercetări vaste, cu utilizarea metodelor de planificare matematică a experiențelor, a fost optimizată componența mediului de cultură pentru producerea mananilor de tulpina *S. cerevisiae* 2.0016-S. Astfel, stimularea esențială a sintezei mananilor s-a obținut la utilizarea în calitate de surse de carbon și azot a zaharozei, peptonei de soia, glicerolului și extractului de levuri în concentrație de 4,98; 4,39; 3,10 și 2,21 g la 100 ml de mediu respectiv. Mediul de cultură optimizat a permis majorarea conținutului de manani de la 82,7 până la 162,5 mg la 100 ml de mediu nutritiv. Deasemenea a fost evaluată și influența pH-ului inițial, volumului de inocul, temperaturii de cultivare și volumului mediului nutritiv. Condițiile optime

s-au dovedit a fi următoarele: pH inițial - 5; volumul inoculului - 5 ml; temperatura - 32°C; și volumul mediului de cultură - 40 ml. Producția maximă de manani a fost de 258,5 mg per 100 ml mediu nutritiv la respectarea parametrilor optimi [129].

Conform datelor din literatura de specialitate, este cunoscut procedeul de cultivare submersă a tulpinilor de levuri pe medii care conțin precursori ai biosintezei β -glucanilor (monozaharide, extracte din șroturi, etc.) [100]. Un alt procedeu propus constă în cultivarea tulpinii de levuri saharomicete ce include prepararea materialului semincer pe must de bere la temperatura de 20°C și durata de cultivare de 72 ore, inocularea germenilor în mediul de fermentație steril YPD sau Rieder, cultivarea ulterioară în profunzime pe agitator (200 rot/min), la temperatura de 20°C timp de 120 ore. Cultivarea tulpinii utilizând mediile de fermentație și condițiile indicate asigură acumularea a 15,38-19,66% β -glucani în biomasa uscată a levurii [4].

Concentrația inițială a inoculului de $2,5 \times 10^6$, pH-ul - 5,7; temperatura de 30°C au fost stabiliți drept factori importanți pentru producerea componentelor peretelui celular al tulpinii *S. cerevisiae* T7. În condiții optime de cultivare, pe mediul YPD, după 24 de ore, protoplaștii *S. cerevisiae* T7 produc 0,91 mg/ml β -glucani, cu o activitate de necroză tumorală de aproximativ 1,3 ori mai mare decât cea a preparatului 1,3/1,6- β -glucan din celule de levuri de brutărie disponibil comercial [127].

Șocul termic duce la schimbări radicale în metabolismul celulei, provocând deteriorarea membranelor, denaturarea și agregarea proteinelor celulare. Majorarea temperaturii induce sinteza proteinelor și tregalozei, care protejează celula de aceste deteriorări. Datele din literatură ne indică faptul, că în timpul șocului termic la levurile *S. cerevisiae* crește esențial concentrația formelor active a oxigenului ce conțin anioni superoxidanți (O_2^-), peroxid de hidrogen (H_2O_2) și radicali hidroxili (OH^-) toxici pentru celulă. Sinteza acestor compuși toxici duce la distrugerea membranelor, denaturarea proteinelor și ADN-ului și moartea celulelor [156].

Temperaturile optime de dezvoltare și biosinteză a substanțelor biologic active variază de la o grupă taxonomică de microorganisme la altă. Astfel, temperatura optimă de acumulare a biomasei de către *Agaricus blazei* este de +28°C, iar de biosinteză a polizaharidelor - de +30°C. Însă polizaharidele sintetizate la această temperatură se caracterizează printr-o activitate biologică scăzută, în comparație cu cele sintetizate la temperatura de +24°C. Acest fapt se datorează conținutului sporit de β -glucan în polizaharidele sintetizate la temperatura mai joasă [87].

Procesele de acumulare a biomasei și polizaharidelor la cultivarea submersă a culturii *Bacillus subtilis* practic coincid în timp și depind mult de temperatura de cultivare și de pH-ul inițial al mediului nutritiv [40].

Deasemenea o mare importanță pentru sinteza substanțelor biologice active și acumularea biomasei are faza de dezvoltare a microorganismului. Experiențele asupra ciupercii *Aspergillus niger* au demonstrat, că cantitatea și calitatea glucanilor și chitinei depinde de stadiul ontogenezei și că acumularea complexului chitino-glucanic este strâns legată de stoparea proceselor de multiplicare. Prin urmare, procesul de majorare a cantității de chitină și glucani în celulă este o reacție de răspuns a acesteia la acțiunea factorilor nefavorabili ai mediului, adică a factorilor de stres [43].

Celule de levuri *S. cerevisiae* prezintă o durată de viață finită, care este în general dependentă de numărul de diviziuni suportate. Drept consecință a îmbătrânirii, celulele de levuri suferă modificări fiziologice, morfologice și de expresie a genelor. Aceste caracteristici influențează absorbția de zahăr, producția de metaboliți, proprietățile de floclulare, care depind de structura peretelui celular. Proprietățile de fermentare, potențialul de floclulare și hidrofobic al celulelor de levuri cresc odată cu vârsta. Toți acești parametri în final determină eficacitatea industrială a tulpinilor de levuri [90].

Studiul analitic al literaturii de specialitate evidențiază posibilitatea reglării potențialului biosintetic și productiv al microorganismelor prin utilizarea nanoparticulelor diferitor metale și al oxizilor acestora.

Nanoparticulele, datorită dimensiunilor reduse (1-100 nm) și proprietăților unice chimice și fizice, pot induce modificări substanțiale în diferite sisteme biologice. Astfel, conform datelor unor autori utilizarea nanoparticulelor în biotehnologia cultivării microorganismelor asigură sporirea capacității de absorbție a nutrienților necesari și implicit se pot produce modificări în procesele metabolice [59, 93, 209].

Aplicarea nanoparticulelor la cultivarea microorganismelor reprezintă un domeniu inovativ în cercetările de nanobiotehnologie [185, 206, 209, 272].

Funcționalitatea nanoparticulelor (NPs) este expusă în diferite publicații în care se menționează eficiența utilizării acestora în industria alimentară, medicină, microbiologie, la producerea vopselelor, pigmentilor, aplicarea în cosmetologie. Există ipoteza că mai multe nanocompozite posedă activități toxice, dar și stimulatorii asupra microorganismelor, care se manifestă în dependență de compoziția nanostructurilor și concentrația aplicată.

Proprietățile unice și utilitatea NPs permit de a le aplica în diferite domenii: biologie, medicină, chimie, fizică etc. [18, 181, 238].

Dezvoltarea științei și tehnologiei în ultimul deceniu se caracterizează prin studii intensive asupra proprietăților obiectelor nanodimensionale și prin elaborarea diferitor tehnologii de aplicare a acestora în practică. Analiza și generalizarea literaturii de specialitate [54, 171],

sugerează că progresul în această direcție va contribui la rezolvarea multor probleme cu care se confruntă omenirea. În același timp, nu există dubii că aplicarea pe scară largă a nanotehnologiilor, care înseamnă, de fapt trecerea la un nou nivel, mai înalt al progresului științific și tehnologic, are și reversul său, cu noi pericole, legate de cercetarea insuficientă a proprietăților, caracteristicilor și acțiunilor necunoscute ale obiectelor nanometrice.

Unul dintre aceste pericole, recunoscut astăzi de majoritatea cercetătorilor, este insuficiența informației privind influența nanomaterialelor asupra organismelor vii, inclusiv a omului. Astfel, devine important să se determine condițiile utilizării unor nanotehnologii sigure pentru sistemele vii, în special pentru om, problemă care este frecvent discutată în numeroase lucrări științifice [180, 237]. Merită evidențiat faptul că proprietățile unice ale nanoparticulelor, cum ar fi dimensiunile mici, suprafața specifică mare și reactivitatea ridicată oferă posibilități largi de aplicare a acestora în practică, pentru binele omului, dar în același timp pot ascunde riscuri grave pentru om. În așa mod, rezultă că pentru a estima pericolele și a reduce riscurile posibile, sunt necesare studii biologice sistematice ale efectelor nanoparticulelor și nanomaterialelor asupra organismelor vii.

Deși este studiată influența nanoparticulelor asupra diferitor obiecte biologice, cele mai des utilizate sunt microorganismele [107]. Astfel, a fost studiată influența diferitor nanoparticule asupra creșterii, dezvoltării și activității enzimatică a micromicetelor [230], bacteriilor [99, 219] și levurilor [14, 194].

Despre efectele de stimulare a NPs se comunică în publicațiile autorului Kiran [142], care menționează că utilizarea nanoparticulelor de fier în concentrație de 10 mg/l sporește cu 80% producția glicolipidelor biosurfactante la cultura marină *Nocardiopsis sp.* MSA13A.

Activitatea biologică a nanoparticulelor depinde atât de caracteristicile principale ale acestora: dimensiunea, forma, suprafața de contact, compoziția și structura stratului de stabilizare, cât și de varietatea taxonomică a microorganismului care servește în calitate de cultură de referință [107]. Acest fapt ne sugerează că utilizarea nanoparticulelor în orice scop, necesită studii detaliate și abordare specifică în fiecare caz concret, privind evidențierea parametrilor optimi.

În prezent sunt descrise diferite tipuri de nanoparticule, cum ar fi nanoparticulele metalice, nanoparticulele de oxizi metalici, nanoparticulele polimerice. Dintre toate acestea, nanoparticulele oxizilor metalici sunt precăutate drept cele mai versatile materiale, datorită proprietăților și funcționalității lor diverse. Dintre nanoparticulele de oxizi metalici, cele mai utilizate sunt nanoparticulele oxidului de zinc (ZnO), datorită aplicațiilor lor diverse [258]. În special, nanoparticulele oxidului de zinc sunt, frecvent, utilizate ca bioprodus antimicrobian. La

fel, nanoparticulele ZnO cu dimensiunile medii de $\sim 50 \pm 10$ nm, testate pe ciuperci patogene în concentrație de 100 mg/L, au demonstrat efect antimicotic evident [109]. Oxidul de zinc (ZnO), datorită proprietăților sale antimicrobiene este încorporat într-o varietate de produse farmaceutice cu aplicații dermatologice, în creme, loțiuni și unguente [173].

În prezent, ZnO este unul dintre cei cinci compuși de zinc, care figurează ca un material sigur (GRAS) în general recunoscut de către US Food and Drug Administration (21CFR182.8991 FDA, 2011) [199]

Compuși anorganici de nano-dimensiuni prezintă activitate antibacteriană înaltă în concentrații mici, datorită raportului mare suprafață:volum și proprietăților unice chimice și fizice [208]. Ei sunt, de asemenea, mult mai stabili în condiții extreme, cum ar fi temperatura și presiunea înaltă [222], iar unii sunt considerați non-toxici și chiar conțin elemente minerale esențiale pentru organismul uman [214].

Studiile recente oferă o nouă perspectivă cu privire la potențialul utilizării nanoparticulelor ZnO ca un supliment pentru a spori producția industrială de β -glucosidază - enzimă importantă în *S. cerevisiae*, cultivat atât în condiții normale, cât și în condițiile stresului alcoolic, precum și producerea levurii de panificație în cantități mai mari [59].

Mudasir A. și colegii 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* [182].

Se consideră că nanoparticulele de Fe, Zn, Mg, în calitate de elemente esențiale cu proprietăți noi, pot modifica căile metabolice la organismele vii [125]. Nanomateriale pe bază de nanoparticule ale oxizilor metalici (CuO și F_3O_4) se propun a fi utilizate în medicină ca remedii cu efect citotoxic [9, 246].

Un număr mare de experiențe sunt destinate studiului influenței nanoparticulelor dioxidului de titan cu scopul obținerii unor medicamente eficiente și inofensive pentru om și mediu. Se știe că dioxidul de titan posedă activitate antibacteriană și antivirală. A fost testată influența nanoparticulelor TiO_2 cu dimensiunea 4-5 nm asupra virusului gripei H3N2. Experiențele au demonstrat, că deja peste 15 minute nanoparticulele TiO_2 aderă la suprafața virusului și provoacă leziunile ei. Efectul dioxidului de titan depinde de timpul incubării, concentrația virusului și concentrația de nanoparticule. Moartea virusului este cauzată de deteriorarea membranei sale. [38]. Posibile mecanisme de influență a nanoparticulelor TiO_2 la nivel celular au fost cercetate de către mai mulți specialiști în domeniu [110, 178], care au elucidat unele procese ce au loc în cazul aplicării NPs.

Astfel, căutarea noilor căi pentru dezvoltarea biotehnologiilor microbiene inovative este de o importanță majoră. La moment, posibilitatea stimulării proceselor metabolice la levuri prin aplicarea nanoparticulelor este insuficient studiată. Cercetările efectuate asupra mai multor specii de levuri s-au soldat cu rezultate contradictorii. Luând în considerație inofensivitatea produselor levuriene pentru organismul uman și perspectiva utilizării nanomaterialelor în diverse domenii, prezintă interes studiul influenței oxizilor metalici nanostructurați asupra potențialului biosintetic al levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, în vederea elaborării unor procedee eficiente de obținere a biomasei cu conținut biochimic pronosticat.

Cercetările destinate evidențierii unor noi căi de sporire a productivității microorganismelor și obținere a biomasei cu un conținut înalt, prognozat de substanțe biologic active rămân a fi actuale și capătă o răspândire tot mai largă. Cercetătorii preocupați de investigarea proceselor de sinteză a substanțelor biologic active de către microorganisme și elaborarea tehnologiilor eficiente de obținere a acestora au marcat mai multe posibilități de a spori eficiența proceselor biotehnologice menționate. În calitate de stimulatori se propun diferiți compuși chimici, inclusiv coordinați [23, 42, 215, 255].

Pe lângă utilizarea factorilor chimici, o modalitate relevantă și actuală de a stimula creșterea și dezvoltarea microorganismelor este utilizarea factorilor fizici, care influențează activitatea fiziologică a microorganismelor. O atenție deosebită se acordă posibilității de utilizare a radiației undelor milimetrice ca mijloc de stimulare a proceselor biologice. Acest tip de radiație poate avea un efect semnificativ asupra diferitor obiecte biologice, inclusiv microorganisme, care în acest aspect sunt puțin studiate. Utilizarea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă în aceste scopuri prezintă o direcție neexplorată, care poate oferi beneficii evidente industriei de producere a substanțelor biologic active microbiene, în primul rând prin intensificarea proceselor tehnologice.

Undele milimetrice cu frecvență extra înaltă sunt alinate la tipul de iradiere neionizantă și se referă la oscilațiile electromagnetice de frecvență $f=30-300$ GHz care ocupă diapazonul lungimii de undă $\lambda=1-10$ mm [245].

Undele milimetrice de intensitate joasă și frecvență extra înaltă sunt un factor de mediu foarte răspândit. Ele sunt utilizate în sistemele de telecomunicații, practicile terapeutice și protecția produselor alimentare. În industria medicamentelor și alimentelor sunt utilizate, în special, pentru efectele lor bactericide [249, 268].

UMM își găsește o aplicare largă în diverse domenii, în special medicină și biotehnologie. Un număr impresionant de cercetări științifice fundamentale, experimentale și aplicative privind acțiunea câmpului electromagnetic milimetric asupra microorganismelor și animalelor de

laborator, efectului în tratamentul bolilor cu diferite etiologii, aplicării în diverse biotehnologii, s-au desfășurat cu succes și sunt în derulare în Federația Rusă, Ucraina, Italia, Cehia, Australia, Spania, Croația, Finlanda, etc. [31, 91, 97, 172, 203]. Aceste studii demonstrează manifestarea efectelor UMM asupra dezvoltării și proliferării celulelor, activității enzimelor, funcționării membranelor celulare și altor sisteme biologice [250].

Multitudinea datelor experimentale, cu privire la eficacitatea undelor milimetrice, au pus baza utilizării lor în medicină [29].

În practica terapeutică, se utilizează de regulă trei frecvențe: $f = 42,25; 53,57; 61,2$ GHz ($\lambda = 7,1$ mm; 5,6 mm; 4,9 mm). Dacă primele două lungimi de undă au fost determinate experimental, în experiențele cu microorganisme și animale, apoi a treia $\lambda = 4,9$ mm corespunde liniei de absorbție a oxigenului molecular al aerului [32].

Undele milimetrice se utilizează cu succes la tratarea unui spectru larg de afecțiuni cardiovasculare, neurologice, urologice, ginecologice, dermatologice, gastro-intestinale, dentare, oftalmologice, oncologice [52, 213, 247, 267].

De asemenea este bine cunoscut și studiat efectul imunostimulator, imunomodulator și antiinflamator al undelor milimetrice asupra organismului uman [35, 168].

Actualmente, acțiunea undelor milimetrice asupra organismelor vii este pe larg utilizată în așa domenii ca medicina veterinară (tratarea diferitor boli la animale), fitotehnia (protecția plantelor de diferite boli, stimularea germinării semințelor etc.) și biotehnologia [27, 103].

Rezultate promițătoare, ce pun baza utilizării undelor milimetrice în piscicultură, au fost obținute în experiențele asupra peștilor. Astfel, s-au demonstrat efecte pozitive a câmpurilor electromagnetice asupra creșterii, dezvoltării, imunității nespecifice și rezistenței la boli păstrăvului *Oncorhynchus mykiss* [141].

Efectul acțiunii undelor milimetrice depinde de frecvență, timpul și puterea iradierii, dar și de însăși obiectul biologic. Oscilațiile undelor milimetrice suprapuse cu vibrațiile proprii ale celulei, pot iniția diverse răspunsuri, atât pozitive, cât și negative [41, 61, 118].

Actualmente există mai multe ipoteze privind mecanismele primare de interacțiune dintre undele milimetrice și obiectele biologice. Potrivit celei mai plauzibile, efectul interacțiunii undelor milimetrice cu organismele vii se datorează absorbției de rezonanță a radiației milimetrice la nivel celular, în rezultatul căreia se formează o reacție adecvată de răspuns a organismului viu. Această ipoteză se bazează pe caracterul informațional al acțiunii undelor milimetrice (iradierea extremă imită semnalele proprii de control al funcțiilor vitale ale organismelor vii), iar influența undelor milimetrice se datorează formării pe membranele celulare a unor „substructuri” proteice, responsabile de restabilirea activității vitale [216, 261].

Efectele înregistrate nu întotdeauna se păstrează pe o durată lungă de timp, de aceea, pentru intensificarea proceselor fiziologice, în cazul studiului acțiunii undelor milimetrice, este important de a stabili durata optimă de acțiune a acestora asupra organismului. În cazul lipsei iradierii exterioare aceste substructuri, sub acțiunea mișcării browniene, treptat revin la starea inițială [41, 122].

Un moment important în studierea mecanismelor de interacțiune a câmpului electromagnetic de diapazon milimetric cu obiectele biologice, prezintă evidențierea unității structurale care reacționează nemijlocit la acțiunea factorului extern [41, 118]. Este demonstrat că efectul undelor milimetrice asupra organismelor vii se poate manifesta la diferite niveluri de organizare a materiei vii: molecular, celular, de substructuri celulare și de organism [139, 279].

Punctele de bază ale interacțiunii acestor unde cu celulele vii sunt apa, membrana celulară și genomul. Schimbările în structura și proprietățile clusterului de apă duc la creșterea activității chimice sau hidratarea proteinelor și a altor structuri celulare, modificarea activității enzimatică. Aceste efecte pot fi specifice și pe termen lung. Mai mult, este modificată structura de suprafață, transportul substanțelor și procesele energetice ale membranei celulare. Consecințele interacțiunii undelor milimetrice cu microorganismele se manifestă prin modificarea sensibilității lor față de diverse substanțe chimice [232].

Conform unor autori, rolul principal în formarea reacțiilor de răspuns la influența factorilor fizici externi le revine membranelor celulare, capabile de reglarea proceselor energetice și biochimice în celulă, prin modificarea nivelului de difuzie a ionilor și altor substraturi [36]. Vastul material științific, acumulat experimental, confirmă că mecanismul interacțiunii undelor milimetrice atât cu organismele unicelulare, cât și cu cele pluricelulare, vizează aspectele esențiale vitale ale animalelor, plantelor și microorganismelor.

Datorită unui șir de particularități ale interacțiunii undelor milimetrice cu obiectele biologice, utilizarea lor în biotehnologia microbiologică este de mare perspectivă. Deoarece microorganismele sunt parte integrantă a proceselor de producere utilizate în industria alimentară, agricultură și alte domenii ale economiei, stimularea creșterii, îmbunătățirea parametrilor tehnologici și optimizarea proceselor de cultivare a acestora sunt sarcini actuale și relevante, rezolvarea cărora are o mare importanță practică.

Reieșind din necesitățile optimizării indicilor tehnologici, este important de a evidenția frecvențele optime ale undelor milimetrice la care reacționează obiectul biologic. Se știe, că obiectele biologice sunt mai receptive la anumite frecvențe [31, 32].

Prin alegerea corectă a parametrilor de iradiere, utilizarea undelor milimetrice poate îmbunătăți în mod semnificativ capacitatea de reglementare a proceselor metabolice din culturile

microbiene. Mai mult, utilizarea acestui tip de iradiere nu are efect negativ asupra mediului, nu lasă reziduuri toxice, este sigur pentru viața umană [187, 188].

A fost acumulat un material științific variat referitor la efectul undelor milimetrice asupra microorganismelor din diferite grupe taxonomice. În prezent, în literatura de specialitate, sunt disponibile date cu privire la efectul undelor electromagnetice milimetrice asupra organismelor fotosintetizante - cianobacterii, micro- și macro-alge, plante superioare [39, 205, 241], actinomicete [33, 73].

Sunt descrise timpul, frecvența, și regularitatea acțiunii radiației undelor milimetrice asupra organismelor fotosintetice procariote și eucariote precum și efectele fiziologice care rezultă din interacțiunea acestora. Este demonstrat efectul stimulator al iradierii asupra creșterii și acumulării de biomasă, transportului de ioni și excreției din celulă a substanțelor biologic active la organisme procariote și eucariote.

Cercetările savanților au demonstrat că undele milimetrice influențează asupra viabilității microorganismelor și această acțiune are un caracter selectiv [50].

Undele milimetrice provoacă modificări în membrana plasmatică a microorganismelor gram-pozitive și gram-negative. Astfel, au loc diverse modificări fizico-chimice: hiperpolarizarea membranelor, schimbarea potențialului de suprafață, majorarea activității respiratorii etc. [192].

Deasemenea sunt studiate unele aspecte ale influenței undelor milimetrice asupra ciclului vital, particularităților morfologice și a capacităților biosintetice a levurilor [91, 116, 118, 122, 145].

Este evident însă, că pentru a utiliza undele milimetrice în biotehnologia cultivării dirijate a levurilor și obținerii produselor bioactive de diversă natură, sunt necesare cercetări suplimentare detaliate privitor la sensibilitatea celulelor la acest tip de unde, influența lor asupra ciclului vital, activității fiziologice și biosintetice. Studiul în dinamică a derulării ciclului mitotic și biosintezei principiilor bioactive sub influența undelor milimetrice, poartă un caracter teoretic și practic. Pentru aplicațiile practice a undelor milimetrice în microbiologie și biotehnologie este esențială cunoașterea procesului de creștere a culturii ca răspuns la acțiunea factorului extern. Obiectele biologice posedă sensibilitate diferită la iradiere, deaceia în vederea caracterizării reacției de răspuns a levurilor este important de a depista timpul când celula își sincronizează activitatea la frecvența undelor milimetrice aplicate. Un indice important al ameliorării calităților tehnologice ale tulpinilor de levuri este caracteristica bioproductivă – producția de biomasă, conținutul de proteine, carbohidrați, polizaharide, alte principii bioactive.

Astfel, o soluție inovațională pentru obținerea β -glucanilor este identificarea noilor procedee de reglare a biosintezei lor, bazate pe optimizarea mediilor nutritive, condițiilor de cultivare și utilizarea materialelor nanodimensionale și a undelor milimetrice în calitate de stimulatori ai biosintezei.

Metode de extracție, purificare și tehnologii de obținere a β -glucanilor

Apariția biotehnologiei moderne a transformat fundamental modul în care oamenii de știință precaută microorganismele și substanțele pe care acestea le produc. Microorganismele pot sintetiza o cantitate mare de substanțe, inclusiv polizaharide, în condiții de producție optime, simple, dar în unele cazuri costisitoare. Un număr mare de polizaharide produse de microorganisme fie sunt deja adoptate ca produse comerciale, fie au un potențial înalt de comercializare. Principalul dezavantaj care limitează dezvoltarea tehnologiilor de obținere a polizaharidelor este lipsa unor procedee eficiente pentru extragerea completă și purificarea lor. Metodele existente în prezent nu oferă posibilitatea de a extrage toate polizaharidele microbiene. Cu toate acestea, biotehnologiile noi din agronomie, industria alimentară, medicină, farmaceutică cosmetologie etc. ar putea da un imbold puternic pentru dezvoltarea lor [121].

Peretele celular al levurilor este ținta principală a metodelor de extracție a β -glucanilor. Deși metodele de lezare a peretelui celular și extracție a componentelor diferă semnificativ între ele, toate afectează cu grad diferit de gravitate randamentul final, puritatea, greutatea moleculară, solubilitatea, activitatea biologică, și alte proprietăți biologice și funcționale ale β -glucanului extras. Metodele de dezagregare a celulelor microbiene pot fi clasificate, în principal, în cele mecanice și non-mecanice [159]. Toate metodele mecanice existente (ultrasunet, omogenizare la presiuni înalte, măcinarea cu bile) se bazează pe forța de rupere, cele non-mecanice se divizează în fizice (termoliza, șoc osmotic, congelare-decongelare), chimice (alcalii, acizi) și enzimatică (enzime litice, glucanaze, autoliza) de perturbare a integrității peretelui celular. La următoarea etapă are loc purificarea fracțiunilor de pereți celulari prin eliminarea manoproteinelor, lipidelor, proteinelor, obținându-se diferite fracțiuni de β -glucani cu grad divers de puritate [256]. Majoritatea metodelor de purificare utilizează diferențierea componentelor celulare, pe baza solubilității lor diferite în soluții alcaline și/sau acizi anorganici, unde conținutul de carbohidrați din peretele celular este de regulă determinat prin utilizarea soluției fenol-acid sulfuric [114] sau a reactivului antron [111].

Privitor la eficiența metodelor de distrugere a pereților celulari ai levurilor, printre specialiștii în domeniu nu există unanimitate. Unii susțin că mai eficiente sunt metodele care prevăd utilizarea unui singur procedeu de distrugere a peretelui celular: enzimatic [134], autoliza [274], ultrasunetul [227] și extragerea și purificarea cu alcalii și acizi, alții optează pentru

metodele ce prevăd diferite combinații dintre metodele fizice și chimice [108, 189, 223]. Cert este că selectarea corectă a metodei influențează semnificativ randamentul extracției, puritatea, solubilitatea, viscozitatea și activitatea biologică a β -glucanilor, de care depinde utilizarea ulterioară a produsului finit.

Randamentul final de extracție a β -glucanilor prin utilizarea diferitor metode este foarte variat. La utilizarea celor chimice și enzimatică variază de la 17,9 la 86,3%, ultimele fiind mai eficiente [170].

Pentru evaluarea eficienței lizei pereților celulari sunt aplicate diverse metode. Metodele microscopice directe permit evaluarea numărului de celule lezate sau dezintegrate, în timp ce metodele indirecte măsoară eliberarea componentelor intracelulare specifice rezultate din solubilizarea biomasei. Pentru a observa modificările celulelor de levuri ca urmare a proceselor de dezintegrare, se utilizează microscopia electronică de transmisie sau de scanare. Astfel, utilizând aceste metode, s-a stabilit că pereții celulari ai diferitor levuri își păstrează forma de bază, aspectul de suprafață și integritatea în timpul autolizei. Aceasta se datorează probabil faptului că 1,3- β -glucanii nu au degradat. Conform autorilor menționați, pierderea de manoproteine din peretele celular nu afectează integritatea peretelui, ci modifică porozitatea lui, fapt care facilitează eliberarea macromoleculelor intracelulare. Liu X. și colaboratorii [160] au observat prin aceleași metode că, după autoliză, a avut loc separarea peretelui celular de citoplasmă, păstrându-se integritatea peretelui celular levurian. Astfel, autoliza nu a afectat pereții celulari, dar a contribuit la eliminarea substanțelor intracelulare nedorite în timpul pregătirii lor.

În rezultatul unor cercetări vaste ce țin de evaluarea eficienței diferitor metode de liză a peretelui celular și obținere a β -glucanilor (autoclavarea, autoliza, omogenizarea într-o moară cu bile, ultrasonarea și diferite combinații a lor), Anna Bzducha-Wrobel și colaboratorii [76] au stabilit că o cantitate maximă de preparate de pereți celulari de levuri *S. cerevisiae* cu cel mai înalt grad de puritate au fost produse la omogenizarea cu bile de sticlă de zirconiu (0,5 mm în diametru), timp de 30 de minute. Acest lucru a fost confirmat de cea mai mare cantitate de material biologic solubilizat (aproximativ 64-67%) în soluție tampon. Preparatele produse astfel au avut un conținut total de monozaharide de cca 60%, 1,3/1,6- β -glucani 13-14% și aproximativ 35% de proteine. Variantele experimentale au fost executate în apă cu pH-ul 5,0 și 7,0 și soluție tampon Tris-HCl cu pH 8,0. Rezultate similare s-au obținut după autoliză cuplată cu măcinarea cu bile sau cu ultrasunet, doar că timpul necesar pentru aceste procese a fost mai mare. Astfel, prin aceste 2 metode combinate s-a obținut 52,6-62,9% material solubil, cu conținut total de monozaharide de 60,5-61,2%, 1,3/1,6- β -glucani 14,5-15,5% și proteine 36,5-36,7%. Însă,

utilizarea morilor cu bile are și neajunsurile sale, exprimate prin obținerea particulelor de dimensiuni foarte mici, care cauzează probleme majore la următoarele etape de purificare, și duc la majorarea costurilor de producere [58].

Li Zhang și colaboratorii au reușit să optimizeze parametrii de dezintegrare a pereților celulari ai levurilor prin ultrasunet, pentru a obține cantități maxime de produs solubil cu puritate înaltă. Eficiența acestei metode, exprimată prin cantitatea de material solubil obținut și raportul dintre cantitatea de proteină și β -glucani, este în mare măsură dependentă de durata procesului, temperatura și puterea ionică a soluției. Cel mai semnificativ efect asupra eficienței metodei a avut temperatura. Ultrasonarea efectuată la temperaturi ridicate favorizează eliberarea polizaharidelor. Este stipulat că mecanismul de bază constă în denaturarea termică și coagularea proteinelor care conduc la scăderea eliberării acestora în preparatul obținut [157]. Dar și această metodă are unele neajunsuri ce țin de formarea în mediu a bulelor de aer, creșterea exagerată a temperaturii și presiunii pe gradient, care în ansamblu duc la formarea radicalilor liberi OH^\cdot , HO_2^\cdot și O_2^\cdot [98].

Una din cele mai eficiente metode de obținere a β -glucanilor este considerată cea bazată pe utilizarea enzimelor. Prin aplicarea lor e posibilă obținerea preparatelor β -glucanice cu o puritate de cca 90% [160, 167]. Astfel, Chema Borchani și colaboratorii au obținut un randament de extracție a β -glucanilor de 18,0% la substanță absolut uscată cu o puritate de cca 79,0%, printr-un tratament inițial cu apă caldă, urmat de hidroliza enzimatică cu savinaze și lipaze. La prima etapă s-a realizat îndepărtarea manoproteinelor, evitând degradarea lanțului β -glucanic, iar prin aplicarea enzimelor purificarea de proteinele remanente și lipide. În opinia autorilor, această metodă are un potențial înalt de utilizare practică, pentru obținerea preparatelor glucanice de calitate din *S. cerevisiae* la scară industrială [68].

Prin utilizarea metodei combinate de dezintegrare a peretelui celular, care constă din 2 etape: hidroliza enzimatică și ultrasonarea ulterioară a biomasei de *S. cerevisiae*, Tran M. T. și colaboratorii au obținut preparate de pereți celulari levurieni cu un conținut de β -glucani de 72,06% și proteină de 15,38% la B.A.U. Modificarea consecutivității etapelor sau utilizarea numai a uneia dintre ele, rezulta în micșorarea esențială a conținutului de β -glucani și majorarea substanțială a celui de proteine în preparate [251].

Rezultate remarcabile au fost obținute de către Huang Gangliang și Li Jing, care prin extracție alcalin-acidă și deproteinizare alcalină, fără a utiliza alte metode de dezintegrare a peretelui celular, au obținut din pereții celulari a levurilor *S. cerevisiae* un preparat cu un conținut de 84,4% β -glucani și 5,3% proteine. În rezultatul purificării (deproteinizării) acești parametri au atins valori de 95,6 și respectiv 0,7% [131].

Condițiile de extragere din diferite obiecte biologice a glucanilor pot afecta structura și compoziția acestora. Denaturarea structurii β -glucanilor are loc la temperaturi și pH ridicate - factori fizici specifici procesului de extragere. Pachetul de macromolecule a β -glucanilor depinde de conformația lor, care determină prezența de structuri ordonate sau dezordonate. Se consideră că preparatele biologice active trebuie să conțină β -glucani în conformația triplu-helix [15].

Cunoașterea proprietăților fizico-chimice, morfologice și mecanice a β -glucanilor, de exemplu, forma suprafeței, porozitatea, viscozitatea, permite aprecierea adecvată a materialului vizat, precum și posibilitatea elucidării căilor de utilizare. Pentru caracterizarea polizaharidelor pot fi utilizate metode fizice moderne, spectroscopie (FT-IR și FT-Raman), microscopie electronică de baleaj (SEM) [228], microscopie de forță atomică (AFM) [45, 102].

În literatura de specialitate este stipulat că diverse modificări chimice și fizice simple pot modifica esențial activitatea biologică a β -glucanilor levurieni. Astfel, modificarea chimică elementară (fosforilarea sau carboxilarea) fragmentelor de glucoză la pozițiile O-2 sau O-6 conduce la solubilizarea 1,3- β -glucanului și majorarea activității sale biologice. Metodele fizice aplicate pentru obținerea, purificarea și păstrarea preparatelor β -glucanice deasemenea modifică activitatea lor biologică. Ca exemplu pot servi cercetările savanților din Cehia care au determinat că uscarea preparatelor β -glucanice levuriene este o metodă fizică simplă de a majora activitatea lor imunostimulatoare [130]. În același timp uscarea nu modifică structura și conținutul de β -glucani în preparate, iar majorarea activității biologice se datorează creșterii purității lor, fapt ce a fost confirmat prin FT-IR spectroscopie [158]. Însă, atât uscarea cât și liofilizarea, au și unele neajunsuri exprimate prin agregarea particulelor de β -glucani și formarea aglomeratelor. Pentru a minimiza aceste efecte se utilizează uscarea prin pulverizare în combinație cu ultrasonarea preparatelor [274].

Actualmente, în baza diferitor metode și procedee de dezintegrare a pereților celulari, fracționare și purificare a polizaharidelor levuriene sunt elaborate diverse tehnologii de obținere a preparatelor β -glucanice biologice active. Unul din primele preparate de acest gen, obținut din biomasa levurilor *S. cerevisiae* prin fierbere și tratare cu tripsină, este extractul insolubil Zymosan, compus din polizaharide, proteine, lipide și microelemente, substanța activă a cărei o constituie β -glucanii [211]. Aceste constatări inițiale au dat un imbold puternic cercetărilor privind evaluarea activității biologice a β -glucanilor.

Utilizarea practică a particulelor de β -glucani WGP (Whole glucan particle) era restricționată din cauza insolubilității acestora în apă. În consecință au fost elaborate o serie de metode pentru solubilizarea 1,3- β -glucanilor. Glucanii solubili în apă sunt denumiți glucani PGG (Poli-(1-6)- β -D-glucopiranozil-(1-3)- β -D-glucopiranoză). Astfel, Jamas și colaboratorii de la

Alpha-Beta Technology Inc., apoi și de la Biopolymer Engineering, Inc. au elaborat o serie de metode pentru solubilizarea particulelor β -glucanice.

Tehnologia obținerii Betafectin PGG (Alpha-Beta Technology Inc.) este bazată pe tratamentul consecutiv al WGP cu acizi și alcalii urmate de o serie de etape de filtrare și ultracentrifugare pentru a obține un preparat netoxic, solubil în apă la pH neutru [197]. Betafectin PGG are structură triplu-helix, greutate moleculară de 150 kDa, stimulează sistemul imun și hematopoeza, este eficient la tratarea bolilor infecțioase și cancerului [138].

Tot acești cercetători au descris și alte metode pentru prepararea β -glucanilor solubili. Astfel, au fost obținuți β -glucanii neutri – NSG (neutral soluble glucan) [198], cu structură helix singular, greutate moleculară mai mică ca 20 kDa, ce declanșează un răspuns specific al celulelor imune [138].

Yestimun® este un produs al companiei Leiber GmbH (Germania) în baza levurilor de bere *S. cerevisiae*, aprobat pentru utilizare în industria alimentară ca supliment, ce inițiază și stimulează răspunsurile imune înnăscute și adaptive. Biomasa este obținută la cultivare pe mediu nutritiv must de bere și apă de izvor. După autoliza ușoară a biomasei, precipitatul insolubil (pereții celulari) se separă de supernatant și se supune purificării cu utilizarea soluțiilor alcaline slabe. Procesul de hidroliză cu acizi este omis, ceea ce permite obținerea β -glucanilor cu structura intactă. Tehnologia permite obținerea a 22% de β -glucani la S.U. cu o puritate de cca 85% [235].

MacroGard® (Biorigin, Brazilia), cel mai bine cercetat produs β -glucanic utilizat ca aditiv furajer în acvacultură, hrana animalelor de fermă și de companie, posedă un dosar științific vast care prezintă efectele lui benefice. Atât studiile *in vitro*, cât și cercetarea *in vivo* cu mai multe specii de animale au demonstrat efectele benefice asupra parametrilor imuni și sănătății animalelor. Acest produs este un preparat insolubil de 1,3/1,6- β -glucani, obținut prin autoliză și purificare enzimatică din biomasa unei tulpini selecte *S. cerevisiae* și conține minim 60% β -glucani, lipide 13-18%, proteine 5-7% [176]. O alternativă a acestui preparat sunt produsele MacroGard®Pet, MacroGard®AquaSol, MacroGard® Immersion Grade, MacroGard® Adjuvant și MacroGard® Fl Suspension, cu un grad diferit de puritate, în care conținutul de lipide și proteine scade, iar cel de β -glucani ajungând la 95-99% [196].

Imunoglucan - 1,3- β -glucopiranoză (HEBRON Farmaceutica, Recife, Brazilia) este un polizaharid solubil, obținut din *S. cerevisiae* extras și purificat timp de 18 zile, cu utilizarea enzimelor și soluțiilor alcaline, care este utilizat subcutanat la copiii astmatici pentru a modula stările alergice [221]. Administrat pe cale orală, Imunoglucanul modulează activitatea imunomieloopoietică și sporește rezistența animalelor bolnave de cancer [248].

β -glucanii industriali din levuri, cum ar fi BetaRight® și WGP® (Biotheras, Inc.) sunt utilizați ca ingrediente în copturi, băuturi, iaurturi, sucuri de fructe, ciocolată și ca agenți de îngroșare în sosuri pentru salate, înghețată, maioneză, sosuri și cașcavaluri. Majoritatea acestor tehnologii au fost brevetate [244, 275].

Astfel, luând în considerație diversitatea metodelor de extracție și purificare a β -glucanilor, activitatea lor biologică impunătoare, potențialul înalt de utilizare în diverse domenii ale economiei și faptul că necesitățile consumatorilor locali sunt acoperite prin import, devine evidentă necesitatea dezvoltării unor strategii de izolare și purificare cât mai eficiente în vederea elaborării tehnologiilor autohtone de producere a biopreparatelor β -glucanice cu efecte sanogene.

1.4. Concluzii la capitolul 1

1. Activitatea biologică înaltă și diversitatea domeniilor de utilizare a β -glucanilor fungici, în special a celor din levuri, evidențiază oportunitatea studierii acestor compuși, care posedă potențial înalt în promovarea sănătății umane și elaborarea preparatelor biologic active cu utilizări polivalente.

2. Structura β -glucanilor levurieni este foarte diversă și ține de varietatea taxonomică a microorganismelor din care sunt obținuți, iar activitatea lor biologică în mare măsură depinde atât de structura, greutatea moleculară, gradul de ramificare cât și de metoda de izolare și preparare.

3. O soluție inovațională pentru obținerea β -glucanilor este identificarea noilor procedee de reglare a biosintezei lor, bazate pe optimizarea mediilor nutritive, condițiilor de cultivare și utilizarea materialelor nanodimensionale și a undelor milimetrice în calitate de stimulatori ai biosintezei.

4. Diversitatea metodelor de extracție și purificare a β -glucanilor, activitatea lor biologică impunătoare, potențialul înalt de utilizare în diverse domenii ale economiei și faptul că necesitățile consumatorilor locali sunt acoperite prin import, evidențiază necesitatea dezvoltării unor strategii de izolare și purificare cât mai eficiente în vederea elaborării tehnologiilor autohtone de producere a β -glucanilor cu efecte sanogene.

Analiza surselor bibliografice relevante la tema tezei a permis de a formula ***problema de cercetare*** a acestei lucrări care constă în determinarea parametrilor biotehnologici optimali de cultivare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, ceea ce a contribuit la eficientizarea procedeelelor de sinteză orientată a β -glucanilor, fapt ce a permis elaborarea tehnologiei de obținere a acestor compuși biologic activi valoroși.

Direcțiile de rezolvare a problemei de cercetare au constat în selectarea surselor de carbon, azot, sărurilor minerale și condițiilor optime de cultivare submersă, care asigură stimularea biosintezei β -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20; eficientizarea metodei de extragere a β -glucanilor în vederea simplificării procesului de obținere a produsului finit; elaborarea procedeeelor specifice pentru obținerea β -glucanilor, utilizând în calitate de reglatori ai biosintezei nanoparticulele oxizilor de metale și undele milimetrice cu frecvența extra înaltă; elaborarea tehnologiei de obținere a β -glucanilor din biomasa levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Scopul lucrării a constat în elaborarea tehnologiei inovative eficiente de obținere a β -glucanilor din levuri.

Obiectivele lucrării au fost următoarele: 1) Selectarea nutrienților și condițiilor optime de cultivare submersă a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în vederea ameliorării biosintezei β -glucanilor; 2) Elucidarea acțiunii nanoparticulelor oxizilor de metale asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20; 3) Evaluarea efectelor undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20; 4) Elaborarea tehnologiei de obținere a β -glucanilor din biomasa levuriană.

2. BIOSINTEZA β -GLUCANILOR LA TULPINA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-20 ÎN FUNCȚIE DE NECESITĂȚILE NUTRITIVE ȘI CONDIȚIILE DE CULTIVARE

Producția de β -glucani depinde în mod semnificativ de conținutul lor în peretele celular al levurii. În general, schimbările în starea fiziologică a celulei și reacția sa la influența factorilor externi sunt determinate inclusiv de structura și de modificările peretelui celular. Arhitectura peretelui unei celule și mecanismele responsabile de sinteza componentelor acestuia pot fi controlate de compoziția mediului de cultură [155].

Mediile de cultură trebuie să conțină substanțe inductoare care pot facilita dezvoltarea levurilor și care nu afectează viabilitatea lor. Cercetările au arătat că pentru *S. cerevisiae*, este necesar ca în mediul de cultură să fie incluse surse de carbon, azot, alți factori de creștere [48]. În calitate de sursă de carbon utilizată pentru fermentare și sporirea randamentului producerii de β -glucani de către *S. cerevisiae* pot fi nominalizate glucoza, zaharoza, lactoza, fructoza, maltoza, manoza, amidonul. Glucoza este cotate ca cea mai importantă sursă pentru biosinteza β -glucanilor [63].

În calitate de sursă de azot organic pentru fermentare se aplică peptona și extractul de drojdii, combinate cu surse de azot anorganic cum sunt sulfatul de amoniu, azotatul de potasiu, cazeina [17, 195].

Reieșind din faptul că compoziția biomasei de levuri poate fi modificată în mod semnificativ prin intermediul mediului de cultură, pentru producția înaltă de β -glucani este important de a optimiza factorii specifici producătorilor identificați.

Astfel, **scopul cercetărilor** în acest capitol constă în eficientizarea metodei de extracție a β -glucanilor, selectarea nutrienților preferențiali și condițiilor optime de cultivare submersă a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în vederea stimulării biosintezei β -glucanilor.

2.1. Materiale și metode de cercetare

Rezultatele investigațiilor prezentate în această lucrare au fost obținute în perioada anilor 2012-2016 în laboratorul Biotehnologia levurilor.

2.1.1. Obiect de studiu

În calitate de *obiect de studiu* a servit tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, brevetată ca producător de β -glucani, depozitată în colecția laboratorului Biotehnologia Levurilor și în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei [4].

Pentru *cultivarea levurii* au fost utilizate următoarele medii de cultură:

YPD: 1% extract de drojdie, 2% peptonă, 2% glucoză, apă potabilă 1L, pH-5,5 [48].

Rieder: 30,0 g/L glucoză; 3,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,7 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L NaCl; 0,4 g/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 1,0 g/L KH_2PO_4 ; 10 ml autolizat de drojzii; apă potabilă 1L; pH-5,0-6,0 [1].

Cultivarea submersă s-a efectuat în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 L, pe agitator cu viteza de rotație 200 rot/min, 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 însămânțat 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.

Metoda de preparare a inoculului (material semincer). O colonie levuriană perfect izolată se suspendă în 50 ml bulion (must de bere). Suspensia de celule se cultivă pe agitator (200 r.p.m.) timp de 24-48 ore, la temperatura de 25°C, iluminare permanentă. Concentrația finală a inoculatului se determină spectrofotometric la lungimea de undă $\lambda=600$ nm [217]. De regulă, preparatul nativ de inocul se examinează microscopic între lamă și lamelă. Pe preparatele native sunt evidențiate existența celulelor levuriene, forma și mobilitatea celulelor, puritatea inoculului.

Multiplicarea, productivitatea și activitatea biosintetică a tulpinii au fost modificate prin:

1) utilizarea reglatorilor și stimulatorilor:

- surse de carbon: glucoza, zaharoza, fructoza, manoza, melasa, etanolul în concentrații de (w/v): 1%, 2%, 3%, 4%, 5%.
- surse de azot: sulfatul de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ și hidrogenofosfat de amoniu $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, în concentrații de (w/v): 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%.
- acetati: acetatul de zinc $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Zn}$ în concentrații de (w/v): 5, 10, 20, 30 mg/L.

2) varierea condițiilor de cultivare:

- durata de cultivare în profunzime: 48, 72, 96, 120, 144, 168 ore.
- influența temperaturilor de: 15, 20, 25, 30°C.
- influența conținutului de oxigen (prin varierea volumului baloanelor): cultivare în profunzime la 200 rot/min și staționar.

2.1.2. Metode de investigație

Numărul de celule dezvoltate pe mediul lichid s-a determinat spectrofotometric conform metodelor cunoscute. Pentru determinarea acestora din probele martor și cele experimentale s-au preluat mostre la începutul cultivării, după 6, 24, 48 ore de cultivare [179].

Viabilitatea celulelor s-a stabilit prin cuantificarea numărului de colonii formate pe plăcile cu YPD agarizat prin însămânțarea suspensiei de celule, exprimată în UFC/ml (Unități de colonii formate la 1 ml suspensie) [217]. Pentru aflarea numărului de germeni viabili existenți în materialul examinat se utilizează formula de calcul:

$$\text{UFC/ml} = \text{numărul de colonii} \times \text{factorul diluției} \times 10 \quad (2.1)$$

Examinarea formei și dimensiunii celulelor. Forma și dimensiunile celulelor s-au examinat în culturi pe mediul nutritiv YPD, recomandat pentru levuri. După însămânțare, tulpinile s-au incubat la 25-28°C. Din cultură, după 6, 24, 48 ore de cultivare, s-au făcut preparate de levuri (celule fixate). Frotiurile cu celule fixate s-au colorat utilizând tehnica de colorare cu soluție de violet de gențiană. Cu ajutorul microscopului XSZ-500, obiectiv 100x/1,25 OIL, 160/0,17 și camera video – MEM1300, utilizând programul special Future WinJoe, s-a notat forma celulelor, modul de înmugurire, s-au stabilit dimensiunile celulelor.

Biomasa levurii a fost determinată prin separarea de la lichidul cultural, prin centrifugare la 3000 rot/min timp de 15 minute, resuspendarea depozitului cu apă distilată sterilă, centrifugare repetată. Această procedură s-a repetat până s-a obținut un supernatant străveziu [129].

Metoda de determinare a substanței uscate prin cântărire. Metoda se bazează pe eliminarea apei din biomasa levuriană prin încălzire la temperatura de 100-110°C. Proba de biomasă se introduce într-o capsulă de porțelan sau de platină și se încălzește în etuvă. După răcire capsula cu produs se cântărește. Operația se repetă până se ajunge la o masă constantă. Conținutul de substanță uscată se calculează utilizând relația:

$$\% \text{ substanța uscată} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (2.2)$$

în care:

m_1 = reprezintă masa fiolei și a produsului analizat (g);

m_2 = masa fiolei și a rezidului după uscarea (g);

m_0 = masa fiolei (g) [129].

Prepararea pereților celulari de levuri s-a efectuat conform metodei propuse de Hong-Zhi L., et al. [129].

Carbohidrații totali în biomasa de levuri au fost determinați la spectrofotometru PG T160 VIS Spectrophotometer, la lungimea de undă 620 nm cu utilizarea reactivului antron și D-glucozei în calitate de standard [101]. Metoda este bazată pe deshidratarea hexozelor în prezența acidului sulfuric concentrat, urmat de condensarea acestora cu Antron, care rezultă o dată cu obținerea unei colorații albastre-verzui și măsurarea intensității acesteia la lungimea de undă 620 nm.

Pregătirea reactivului antronic (soluție antron de 0,05% în acid sulfuric 66%). În eprubete se toarnă fie 0,5 ml (sau 5 mg) de probă analizată și câte 0,5 ml soluție de 50, 100 și 200 mg glucoză (pentru construirea curbei de calibrare); în eprubeta – martor se toarnă 0,5 ml apă. La conținutul eprubetelor se adaugă câte 5 ml reactiv antron. Se agită ușor și se pune timp de 10 – 15 minute la baie de apă la temperatura camerei. Se transferă la baie de apă fierbând timp de 15 minute. Eprubetele se răcesc sub getul de apă la robinet și se lasă la întuneric timp de 30 minute. Cantitatea de carbohidrați din probele respective se determină după curba de calibrare. Rezultatele finale ale conținutului de zahăr sunt considerate mediile aritmetice ale datelor repetărilor, calculate după formula:

$$c(\%) = X/m \cdot 100\%, \text{ unde:} \quad (2.3)$$

X – conținutul glucozei după curba de calibrare;

m – masa probei absolut uscate (mcg)

c% – cantitatea de carbohidrați în % la BAU.

Determinarea conținutului de β -glucani s-a realizat gravimetric [244], adaptată de Usatii A., Chiselița N. [19] și este descrisă în subcapitolul 2.2.

Optimizarea componenței mediului de nutriție s-a efectuat conform metodelor de planificare matematică a experiențelor [17].

Prelucrarea statistică a rezultatelor a fost efectuată cu ajutorul setului de programe Statistica 7, veridicitatea în comparație cu martorul - $p \leq 0,05$.

2.2. Eficientizarea metodei de extracție a β -glucanilor

Extragerea eficientă a β -glucanilor din pereții celulari levurieni, ce posedă o structură complexă, este posibilă numai prin alegerea metodelor eficiente de distrugere a acestora. În majoritatea cazurilor, pentru dezagregarea pereților celulari, se aplică procedee cu aplicarea ultrasunetului, congelării-decongelării, autolizei, măcinării în mori cu bile, precum și a enzimelor. Parametrii variabili la extragerea β -glucanilor din biomasa levuriană sunt: solvenții și concentrația acestora, temperatura, durata de extracție, etc. [115, 128, 167].

Metoda de extragere a β -glucanilor include două faze:

- a) Dezagregarea celulelor;
- b) Extracția de β -glucani din pereții celulari prin intermediul tratării cu baze și acid în diferite proporții.

Inițial, pentru extragerea β -glucanilor din biomasa levuriană de *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, s-a efectuat studiul comparativ al metodelor de dezagregarea celulară. Pentru ruperea pereților celulari s-au studiat comparativ cinci metode de fragmentare:

- Autoliza - la 50°C timp de 24 ore, martor [244];
- Autoliza la 55°C timp de 8 ore;
- Ultrasonare efectuată la frecvența de 22 Hz timp de 3 minute;
- Omogenizare la 15000 rot/min 10 minute;
- Congelare-decongelare (3 cicluri +20°C/-20°C).

Eficiența metodelor de fragmentare s-a apreciat prin următoarele analize: studierea sedimentelor prin microscopie optică; determinarea viabilității celulelor de drojdie din sediment; determinarea conținutului de carbohidrați totali în sediment.

Analiza sedimentelor prin microscopie optică a demonstrat că practic în toate variantele testate se observă celule de diverse dimensiuni, ceea ce demonstrează că citoplasma este eliminată parțial (Figura 2.1). Informația dată necesită studii suplimentare în vederea constatării gradului de dezintegrare a peretelui celular. În acest sens s-a studiat viabilitatea celulelor.

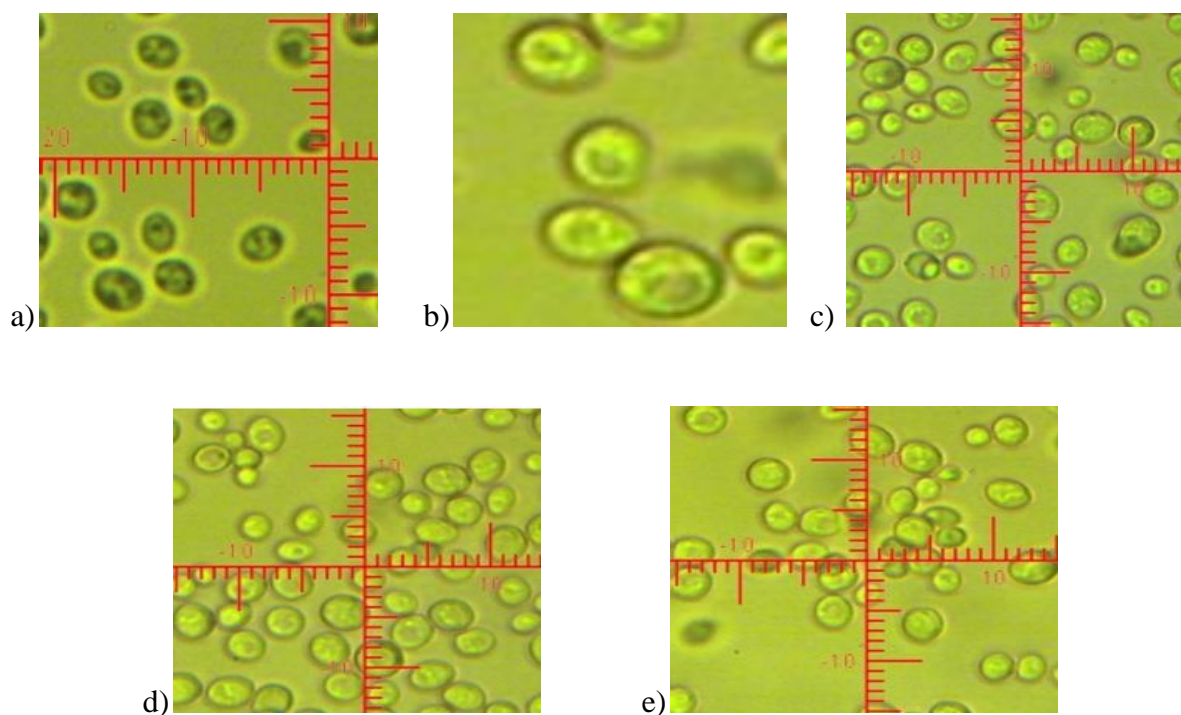


Fig. 2.1. Celule de *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 supuse diferitor procedee de dezintegrare a peretelui celular, (puterea de mărire 640).

Legenda: a - autoliză la 50°C timp de 24 ore (martor), b - autoliză la 55°C timp de 8 ore, c - ultrasonare 3 minute, d - omogenizare 10 minute, e - congelare/decongelare.

Viabilitatea celulelor s-a stabilit prin însămânțarea pe mediu YPD agarizat a 0,1 ml suspensie (20 mg sediment + 2 ml apă distilată sterilă) din sedimentele obținute după procedura de centrifugare.

Rezultatele obținute după aplicarea diferitor metode de dezintegrare sunt reflectate în Figura 2.2, din care concluzionăm că gradul de rupere a pereților celulari este cel mai înalt la aplicarea autolizei la 55°C timp de 8 ore (celule viabile lipsesc), urmat de procedeul omogenizare 10 minute, ultrasonare 3 minute, cu un grad de distrugere a celulelor de 90-95% (viabilitatea constituie 4,6-11,0% comparativ cu varianta martor). Procedeul congelare-decongelare este mai puțin eficient, gradul de distrugere a celulelor este de 80,7% (viabilitatea constituie 19,3% comparativ cu varianta martor).

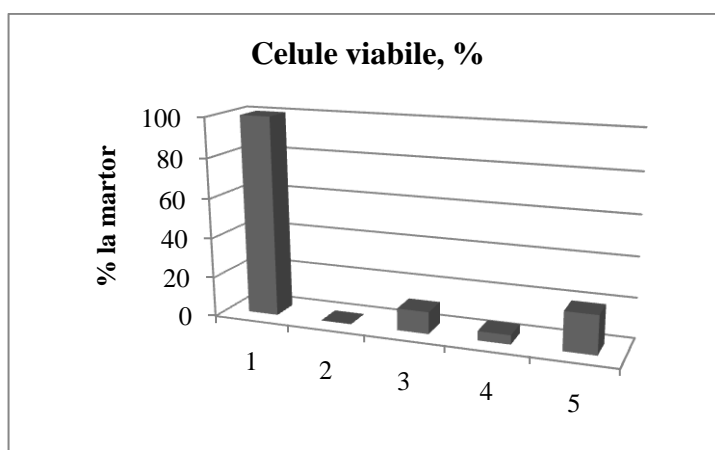


Fig. 2.2. Viabilitatea celulelor levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 supuse dezintegrării cu aplicarea diferitor procedee.

Legenda: 1 - autoliză la 50°C timp de 24 ore (martor), 2 - autoliză la 55°C timp de 8 ore, 3 - ultrasonare 3 minute, 4 - omogenizare 10 minute, 5 - congelare/decongelare.

În continuare, în vederea obținerii β -glucanilor din pereții celulari, s-au aplicat variante de lucru, ce îmbină metodele testate de dezagregare celulară cu modificarea volumului de extragenți și duratei de extragere:

I. Proba martor: Metoda constă în autoliza suspensiei de drojdie (15% w/w conținut uscat cu pH-5), la 50°C timp de 24 ore, agitare moderată. Autolizatul se supune încălzirii la 80°C timp de 15 minute, răcirii până la temperatura camerei și centrifugării la 3565 rot/min timp de 10 minute, sedimentul se colectează. Procedura de extracție a β -glucanilor constă în tratarea pereților celulari cu 1N NaOH (raport 1:5) la temperatura de 80±5°C timp de 2 ore, separarea, urmată de extracția cu acid acetic de 0,5N (raport 1:5) la temperatura de 75±5°C timp de 1 oră. Extractul se centrifughează la 3565 rot/min timp de 10 minute la temperatura camerei, sedimentul se spală de 3 ori cu apă distilată și se usucă la 50±5°C. Pasta obținută de β -glucani este de culoare cafeniu-deschis [244].

Variante experimentale:

II. Autoliză cu durată de 8 ore. Amestecul din 10 g drojdie (30% S.U.) și 10 ml apă sterilă se supune autolizei la 55°C timp de 8 ore și se centrifughează la 3500 rot/min 10 minute. Sedimentul (pereții celulari) se tratează cu 50 ml 1N NaOH timp de 1 oră la temperatura de 90±5°C, se separă și se tratează cu 0,5N acid acetic în raport de 1:5, la 75±5°C timp de 1 oră (în scopul eliminării glicogenului), apoi se spală de 2 ori cu apă distilată, se centrifughează la 3500 rot/min timp de 10 minute la temperatura camerei, se usucă la 50±5°C. Produsul obținut sunt β-glucanii.

III. Ultrasonare cu durată de 3 minute. Amestecul din 10 g drojdie (30% S.U.) și 20 ml apă sterilă se supune timp de 3 minute acțiunii ultrasunetului la frecvența de 22 KHz. Amestecul se centrifughează la 3500 rot/min 10 minute. Procedul de extragere a β-glucanilor din pereții celulari se desfășoară conform procedurii descris în varianta II.

IV. Omogenizare cu durată de 10 minute. Amestecul din 10 g drojdie (30% S.U.) și 20 ml apă sterilă se omogenizează 10 minute la viteza de rotație 15000 rot/min (6F volum 30 ml), umiditatea relativă 85%. Amestecul se centrifughează la 3500 rot/min 10 minute. Procedul de extragere a β-glucanilor din pereții celulari se desfășoară conform procedurii descris în varianta II. Omogenizarea biomasei levuriene s-a efectuat la aparatul Silent Crusher M, Heidolph (2010).

V. Congelare-decongelare: 10 g drojdie (30% S.U.) se supun congelării/decongelării la -20°C/+20°C (3 cicluri), se centrifughează 10 minute la 3500 rot/min. Procedul de extragere a β-glucanilor din pereții celulari se desfășoară conform procedurii descris în varianta II.

La analiza conținutului de carbohidrați totali se observă unele fluctuații, care nu indică legități, ce ar permite evaluarea randamentului procedurilor de dezintegrare a pereților celulari. Conținutul mai mic de carbohidrați în variantele experimentale comparativ cu probele martor se explică prin dizolvarea monozaharidelor solubile în apă adăugată la probele de biomasă celulară supusă procedurilor de autoliză, omogenizare, ultrasonare sau congelare/decongelare. Menționăm faptul că conținut sporit de carbohidrați 32,36% la S.U. s-a observat în varianta IV de distrugere a peretelui celular (omogenizare cu durată de 10 minute), ceea ce constituie 7,8% comparativ cu proba martor (Figura 2.3).

Eficiența metodelor de extragere s-a apreciat prin determinarea conținutului de β-glucani. În urma analizei rezultatelor obținute s-a stabilit, că condițiile optime de extragere a β-glucanilor sunt create la aplicarea variantei IV (omogenizarea biomasei celulare timp de 10 minute) și variantei V (procedura de congelare/decongelare a biomasei celulare în 3 cicluri). La utilizarea acestor metode se extrag circa 25,5% respectiv 25,28% β-glucani la S.U. (cu 35,6 și respectiv

34,5% mai mult față de proba martor), în varianta martor (autoliza 24 ore) conținutul de β -glucani extrași constituie 18,8% (Figura 2.3). Rezultatul tehnic pozitiv specific variantei cu aplicarea omogenizării biomasei celulare se exprimă prin faptul că concomitent cu cantitatea mai mare de β -glucani extrași se reduce cu 24 ore comparativ cu procedeul martor și durata procesului de extragere a β -glucanilor.

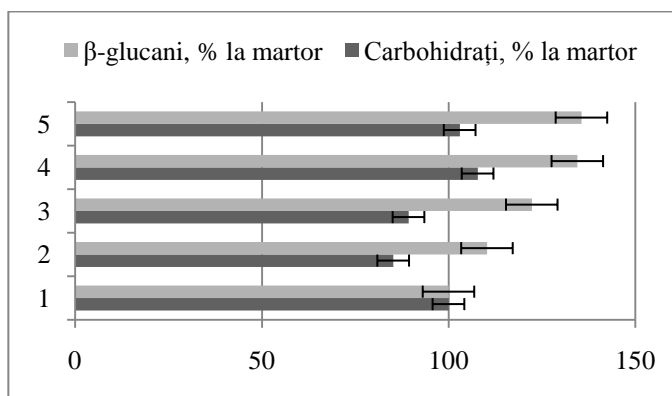


Fig. 2.3. Eficiența metodelor de extragere a β -glucanilor din pereții celulari ai *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Legenda: 1 - autoliză la 50°C timp de 24 ore (martor), 2 - autoliză la 55°C timp de 8 ore, 3 - ultrasonare timp de 3 minute, 4 - omogenizare timp de 10 minute, 5 - congelare/decongelare.

Astfel, în rezultatul cercetărilor se propune un procedeu simplificat pentru extragerea β -glucanilor din biomasa levuriană, care constă din următoarele etape:

- omogenizarea biomasei celulare la 15000 rot/min timp de 10 minute;
- separarea pereților celulari prin centrifugare la 3500 rot/min 10 minute;
- tratarea pereților celulari cu 1N NaOH în raport 1:5, încălzirea la 90°C timp de 1 oră;
- tratarea cu acid acetic de 0,5N (raport 1:5) la temperatura de 75±5°C timp de 1 oră;
- centrifugarea la 3500 rot/min timp de 10 minute la temperatura camerei;
- spălarea sedimentului de β -glucani de 2 ori cu apă distilată;
- uscarea β -glucanilor la 50±5°C.

2.3. Influența surselor de carbon, azot asupra biosintezei β -glucanilor și elaborarea mediului de cultivare a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20

Carbohidrații au importanță deosebită în procesele de biosinteză a principiilor bioactive. Glucoza (dextroza) sau zahărul de struguri ($C_5H_{11}O_5CHO$) este componenta de bază din care sunt construite mai multe polizaharide - β -glucanii, glicogenul, amidonul, celuloza. Glucoza intră

în componența zaharozei, maltozei, lactozei, ușor se absoarbe în sânge. O altă monozaharidă – manoză ($\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}$), este componenta mai multor polizaharide, în special a mananilor.

În scopul selectării surselor adecvate de carbon pentru sinteza β -glucanilor au fost efectuate cercetări de evaluare a efectelor diferitor compuși ai carbonului adăugat în mediile de fermentație YPD și Rieder în diferite concentrații.

Drept criterii de evaluare au servit conținutul de biomasă celulară (gL^{-1} mediu de cultură), conținutul de carbohidrați totali (% la B.U.), conținutul de β -glucani (% la B.U. și gL^{-1} mediu de cultură).

Studiul efectelor glucozei, zaharozei, fructozei, manozei, melasei, etanolului în concentrații de (w/v) 2% incluse în mediul de fermentație YPD și 3% - în mediul Rieder a demonstrat că pe mediul de cultură YPD cantitățile de biomasă sunt semnificativ superioare celor obținute pe mediul Rieder (Figura 2.4a). De menționat că conținutul de carbohidrați totali pentru toate sursele de carbon testate este mai înalt pe mediul Rieder comparativ cu mediul YPD. Maximul de carbohidrați 71,64% - 65,92% la B.U. s-a obținut la suplimentarea mediului cu melasă sau manoză (Figura 2.4b).

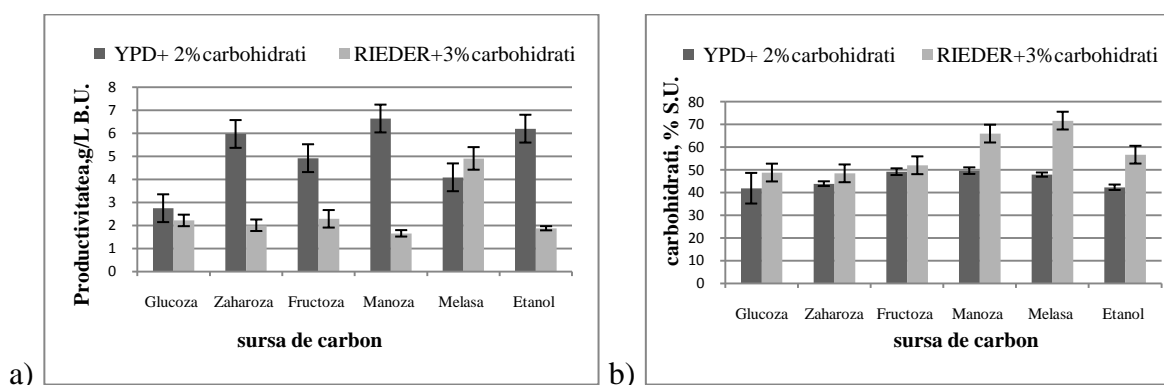


Fig. 2.4. Efectul surselor de carbon asupra conținutului de biomasă (a) și carbohidrați (b) la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Cantitatea de β -glucani în toate variantele mediului YPD are valori de 15,27...18,91% din B.U., maximul fiind specific glucozei. În cazul cultivării levurii pe mediul Rieder conținutul de β -glucani se află în limitele 14,16...19,85% la B.U., conținutul maxim s-a obținut în variantele de mediu suplimentate cu glucoză, zaharoză și manoză (Figura 2.5a).

Comparând randamentele de producere a β -glucanilor de către tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, putem afirma că etanolul, manoză și zaharoză incluse în mediul YPD au cel mai semnificativ rezultat – 0,937...1,129 gL^{-1} mediu de cultivare (Figura 2.5b).

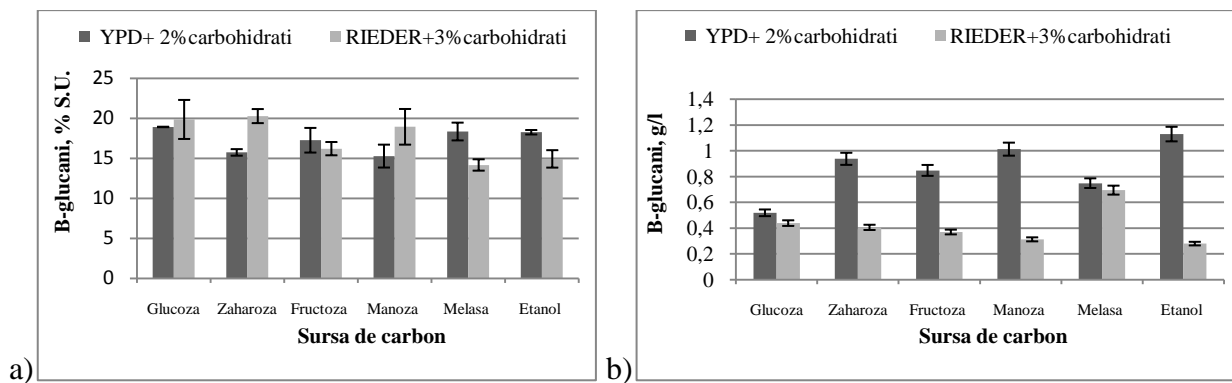


Fig. 2.5. Efectul surselor de carbon asupra conținutului de β -glucani la tulpina

S. cerevisiae CNMN-Y-20.

Pentru optimizarea mediului de cultură sunt necesare experiențe de selectare a concentrațiilor optime a sursei de carbon. În experiențele cu tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, au fost evaluate efectele diferitor concentrații, (w/v): 1%, 2%, 3%, 4%, 5% de glucoză adăugate la mediul YPD și de zaharoză – la mediul Rieder.

Concentrațiile surselor de carbon au fost selectate din diferite informații bibliografice, care indică că valorile mai mari de 6% pot reprimă multiplicarea levurilor [17].

În cazul utilizării diferitor concentrații de glucoză observăm o curbă în creștere atât a biomasei, cât și a carbohidraților totali, sincronizată cu creșterea concentrațiilor sursei de carbon de la 1% la 4% (Figura 2.6a).

Același efect de stimulare s-a constatat în experiențele de evaluare a influenței diferitor concentrații de glucoză asupra cantităților de β -glucani în biomasa tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 (Figura 2.6b). Conținutul maximal de β -glucani (19,23-19,8% la B.U.) s-a înregistrat în variantele de mediu YPD cu 3-4% glucoză. Randamentul maxim de producere a β -glucanilor exprimat la 1L de mediu s-a obținut la utilizarea glucozei în concentrație de 4%.

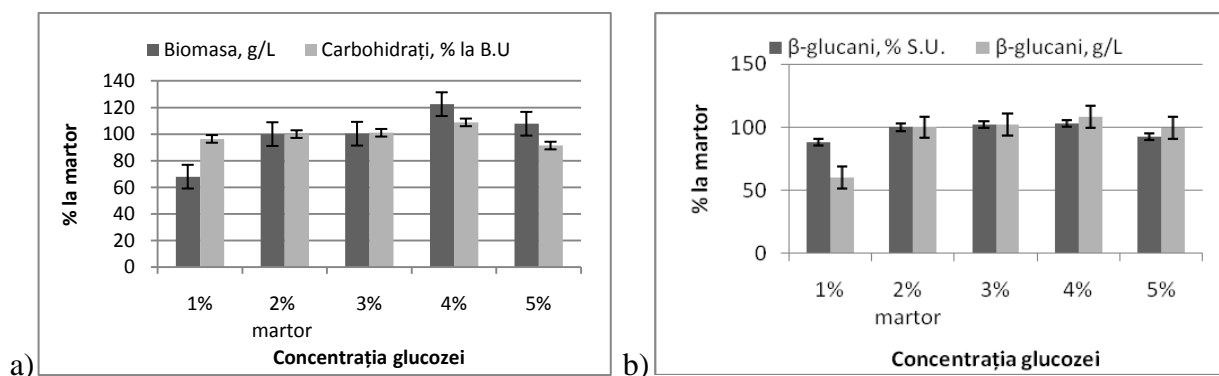


Fig. 2.6. Efectul diferitor concentrații de glucoză asupra acumulării biomasei, carbohidraților totali (a) și conținutului de β -glucani (b) la cultivare tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pe mediul YPD.

În continuare, în mod similar a fost studiat efectul diferitor concentrații de zaharoză, care au substituit glucoza din mediul Rieder. În calitate de martor a servit mediul Rieder clasic cu 3% de glucoză. Rezultatele sunt reflectate în Figura 2.7a, din care observăm o creștere a cantităților de carbohidrați până la 60,14...63,0% la B.U. în variantele de mediu suplimentat cu 3, 4 sau 5% zaharoză. Cantitatea de biomasă acumulată variază în limitele 3,69...4,77 gL⁻¹ mediu de cultură. Aprecierea conținutului de β -glucani în biomasa uscată a evidențiat modificări ne semnificative în dependență de concentrațiile zaharozei incluse în mediul de cultivare Rieder. Maximul procentual 21,16% la B.U., cu 6,6% mai mult față de martor, s-a observat în varianta de mediu cu 3% zaharoză, minimul procentual 15,28% la B.U. – în varianta cu 5% zaharoză. În probele martor conținutul de β -glucani constituie 19,85% la B.U. (Figura 2.7b). Recalculul conținutului de β -glucani la 1L mediu de cultură evidențiază superioritatea variantei experimentale în care zaharoză s-a introdus în concentrația de 3%.

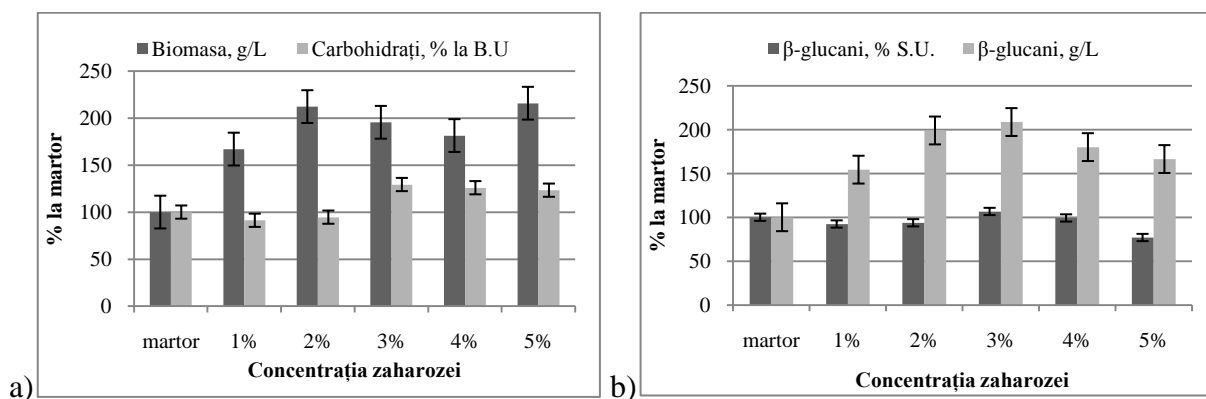


Fig. 2.7. Efectul diferitor concentrații de zaharoză asupra acumulării biomasei, carbohidraților totali (a) și conținutului de β -glucani (b) la cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pe mediul Rieder.

Din analiza comparativă a rezultatelor privitor la conținutul de β -glucani obținut pe mediile YPD și Rieder se poate afirma că pentru cercetările în vederea sporirii producerii de β -glucani este oportună utilizarea mediului YPD cu conținutul de glucoză în concentrație de 4%, codificat – YPD-4 sau a mediului Rieder cu aplicarea a 3% zaharoză, codificat Rieder-M.

Studiul ce urmează este consacrat evaluării acțiunii diferitor surse de azot. Azotul este un element esențial pentru toate speciile de microorganisme și joacă un rol relevant într-o serie de procese biologice implicate în creșterea și dezvoltarea organismului. Sursa preferată de azot este sulfatul de amoniu, utilizat practic de toate microorganismele [195].

În vederea identificării efectelor azotului asupra acumulării biomasei, carbohidraților totali și β -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 au fost testate - sulfatul de amoniu

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ și hidrogenofosfatul de diamoniu $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, în concentrație de (w/v): 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5% la cultivarea levurii pe mediul YPD.

Analiza datelor obținute la determinarea conținutului de biomasă celulară a demonstrat prezența unor cantități importante în variantele de mediu YPD suplimentat cu hidrogenofosfatul de amoniu. Pentru concentrațiile cercetate a sursei de azot s-au înregistrat valori de 5,75...6,61 gL^{-1} biomasă uscată, cu 20,8...38,9% mai mult față de martor. În varianta martor conținutul de biomasă constituie 4,76 gL^{-1} (Figura 2.8a).

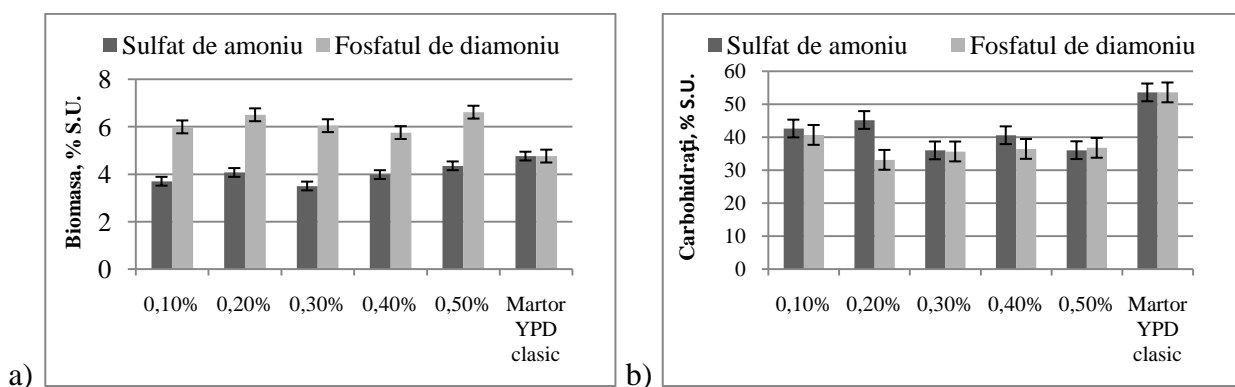


Fig. 2.8. Efectul diferitor concentrații de azot asupra acumulării biomasei (a) și sintezei carbohidraților totali (b) la cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pe mediul YPD.

Pentru ambii compuși de azot implicați în cercetare au fost obținute rezultate asemănătoare ce indică diminuarea conținutului de carbohidrați totali comparativ cu mediul martor. Rezultatele obținute în cazul utilizării sulfatului de amoniu și cel al hidrogenofosfatului de amoniu sunt reflectate în Figura 2.8b. Pentru toate concentrațiile utilizate ale compușilor azotați au fost obținute cantități de 33,12...45,19% la B.U. carbohidrați totali, valori care sunt inferioare martorului - 53,56% la B.U.

Privitor la conținutul de β -glucani în biomasă levurii, menționăm o deosebire semnificativă pentru variantele de mediu YPD cu sulfat de amoniu comparativ cu cel obținut în variantele cu hidrogenofosfat de amoniu.

Cantitatea de β -glucani în toate variantele de mediu suplimentate cu sulfat de amoniu ating valori de 15,19...19,58% la B.U., față de 8,22...13,73% la B.U. obținute în experimentele cu hidrogenofosfatul de amoniu și au tendință de diminuare odată cu creșterea concentrației sursei de azot (Figura 2.9a). Deoarece conținutul procentual al β -glucanilor în biomasă uscată este mai mic în variantele experimentale comparativ cu martorul, concluzionăm că odată cu activizarea procesului de multiplicare a levurii, biosinteza principiilor bioactive, în special a

carbohidraților totali și a β -glucanilor, se diminuează, astfel se obțin cantități mari de biomasă cu conținut mic de β -glucani.

Cercetările, rezultatele cărora sunt reflectate în Figura 2.9b, confirmă concluzia că utilizarea surselor de azot, implicit a sulfatului de amoniu sau hidrogenofosfatului de amoniu, duce la diminuarea eficienței mediului de cultură la producerea β -glucanilor.

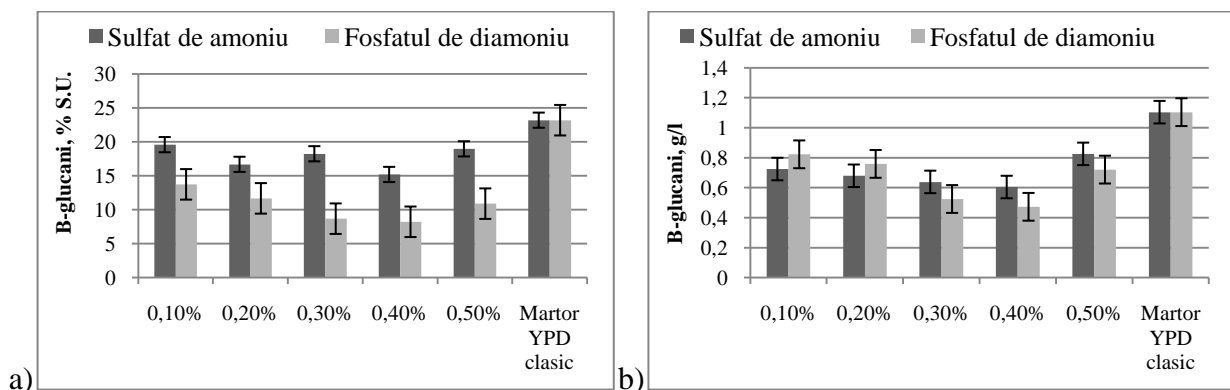


Fig. 2.9. Efectul diferitor concentrații de azot amoniacal asupra conținutului de β -glucani la cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pe mediul YPD.

În baza cercetărilor efectuate putem afirma că din sursele de azot testate, numai hidrogenofosfatul de amoniu asigură rentabilitate mediului de cultivare YPD pentru tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, datorită creșterii esențiale, cu 20,8...38,9% față de mediul martor, a producerii de biomasă celulară. Sulfatul de amoniu și hidrogenofosfatul de amoniu în concentrații de 0,1...0,5%, diminuează semnificativ conținutul de carbohidrați totali și β -glucani la tulpina de levuri comparativ cu mediul martor.

Este cunoscut că sărurile minerale joacă un rol deosebit în procesele de biosinteză și se evidențiază prin aceea că acești compuși pot reprezenta surse de elemente constitutive, intermediari ai reacțiilor de oxido-reducere, reglatori ai permeabilității membranelor celulare, cofactori ai sistemelor enzimatice - metaloenzime. Sărurile furnizoare de microelemente sunt de obicei sulfatii, fosfații, nitrații, acetatii [17]. Un element important în metabolismul microorganismelor este zincul, semnificativ pentru activitatea enzimelor zinccomponente.

În experiențele noastre s-a urmărit influența acetatului de zinc asupra producerii β -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Compusul s-a adăugat în concentrații de 5, 10, 20, 30 mgL⁻¹ medii nutritive: YPD-4 – YPD modificat (glucoza 4%) și Rieder-M – Rieder modificat (glucoza substituită cu 3% zaharoză). În calitate de martor au servit mediile enunțate fără completarea cu acetat de zinc.

Analiza rezultatelor a arătat, că efectul acetatului de zinc este variabil și depinde de concentrație și mediul de cultivare. Spre exemplu, acetatul de zinc în concentrații de 5, 10, 20, 30 mgL⁻¹ mediu de cultură YPD-4 și Rieder-M micșorează nesemnificativ conținutul de biomasă și carbohidrați, comparativ cu martorul (Figura 2.10). Valorile conținutului de biomasă uscată în variantele experimentale cu mediul YPD-4 constituie 5,36...5,62 gL⁻¹ (Figura 2.10a). Majorarea concentrațiilor de acetat de zinc adăugat la mediul YPD-4 a determinat diminuarea conținutului de carbohidrați totali de la 46,93 (varianta cu 10 mgL⁻¹ acetat de zinc) la 43,97% la B.U. (varianta cu 30 mgL⁻¹ acetat de zinc).

În cazul cultivării tulpinii pe mediul Rieder-M, la care s-au adăugat diferite concentrații de acetat de zinc, biomasă celulară constituie 1,24...1,81 gL⁻¹, în varianta martor - 2,0 gL⁻¹. Carbohidrații totali mențin aceeași tendință de micșorare a conținutului lor legată de sporirea concentrațiilor de acetat de zinc (Figura 2.10b).

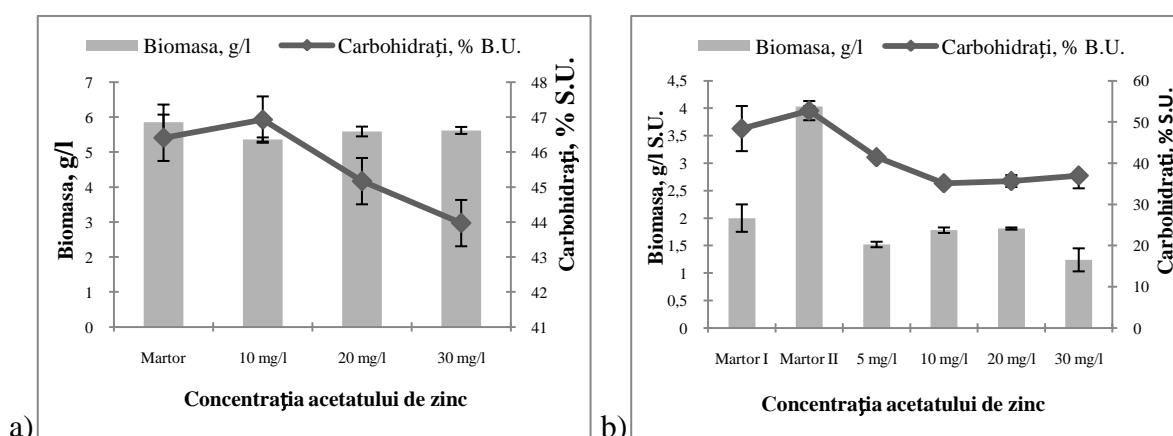


Fig. 2.10. Influența acetatului de zinc asupra acumulării biomasei și carbohidraților la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare pe mediul YPD-4 (a) și Rieder-M (b).

Legenda: martor I – mediul Rieder, martor II – mediul M-4086.

Efect similar al acetatului de zinc a fost înregistrat în studiul conținutului de β -glucani la cultivarea tulpinii pe mediul YPD-4. Cantitatea de β -glucani în variantele de mediu completat cu compusul studiat este inferioară martorului cu 5,8-11,4% (Figura 2.11a). De aceea în continuare pentru cercetări a fost folosit mediul YPD-4.

Un aspect total diferit prezintă datele obținute ca rezultat al studiului de evaluare a influenței acetatului de zinc asupra conținutului de β -glucani la cultivarea tulpinii pe mediul Rieder-M. La cultivarea tulpinii pe mediul nominalizat se constată că acetatul de zinc stimulează biosinteza β -glucanilor. Valorile maxime ale conținutului acestora constituie 23,38...27,46% la B.U., ceea ce este cu 23,4...44,1% mai mult față de martor (Figura 2.11b). De rând cu efectul

stimulator exercitat asupra conținutului de β -glucani în biomasa levurii, dozele 10 și 20 mgL^{-1} acetat de zinc intensifică randamentul mediului de cultură, obținându-se până la $0,440 \text{ gL}^{-1}$ β -glucani.

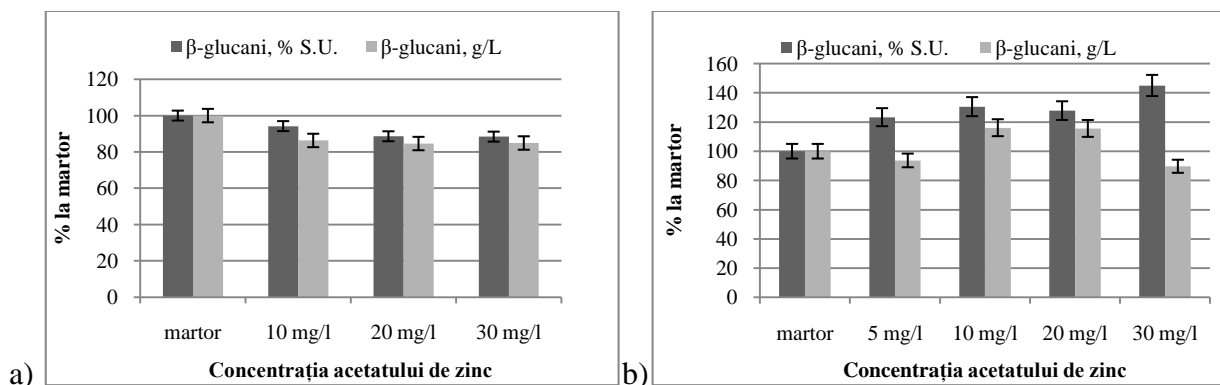


Fig. 2.11. Influența acetatului de zinc asupra conținutului de β -glucani la tulpina

S. cerevisiae CNMN-Y-20 la cultivare pe mediile modificate YPD-4 (a) și Rieder-M (b).

Reieșind din aceste considerente, rezultatele experiențelor monofactoriale pentru toți compușii mediului de nutriție au fost supuse analizei statistice și regresionale. După prelucrarea rezultatelor, pentru mediul Rieder, au fost evidențiați 2 factori esențiali: zaharoza și acetatul de zinc (CH_3COO)₂Zn), care pot influența semnificativ biosinteza β -glucanilor.

Rezultatele acestor investigații au stat la baza optimizării matematice a mediului de cultură pentru levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în vederea obținerii conținutului maximal de β -glucani.

Optimizarea mediului de nutriție în scopul obținerii unei cantități maxime de β -glucani a fost efectuată în câteva etape consecutive: experiența conform planului „Experiența factorială fracționată ($\text{EFF } 2^2$)”, în timpul căreia se determină direcția varierii concentrației factorilor (spre mărirea sau micșorarea concentrației) și experiența conform planului „Mișcarea pe gradient”, în timpul căreia se alege cea mai reușită combinație a factorilor esențiali și neesențiali.

Evidențierea factorilor cu efecte esențiale în procesul de acumulare a β -glucanilor a fost efectuată în câteva trepte, utilizând metoda balanței aleatoare. La fiecare treaptă s-au selectat efectele cu valoare esențială.

Inițial a fost elaborat planul experienței factoriale fracționate $\text{EFF } 2^2$ (Tabelul 2.1).

După rezultatele experienței $\text{EFF } 2^2$ au fost calculați coeficienții de regresie după algoritmul Iets [17] (Tabelul 2.2). Pe baza coeficienților de regresie calculați a fost alcătuită ecuația de regresie, care are expresia: $Y = 24,10 - 0,482 X_1 + 1,647 X_2 - 2,117 X_1 X_2$.

În corespundere cu ecuația dată a fost montată experiența „Mișcarea pe gradient”, conform planului din Tabelul 2.3.

Tabelul 2.1. Informația inițială despre factori

Componenta mediului	Codificarea	Concentrația componentelor			Pasul de variație, $\lambda(i)$
		Minimă - 1	Baza 0	Maximă + 1	
Zaharoza, gL^{-1}	X_1	30	35	40	5
Acetat de zinc, mgL^{-1}	X_2	10	15	20	5

Tabelul 2.2. Calcularea coeficienților de regresie după schema Iets

Planul experienței		Rezultate experimentale (Y) β -glucani, % la S.U.	Calculul efectelor		Coeficientul liniar de regresie, $b(i)$
X_1	X_2		Pasul 1	Pasul 2	
-	-	20,82	$Y_1+Y_2 = 44,91$	$Y_1+Y_2 + Y_3+Y_4 = 96,41$	24,10
+	-	24,09	$Y_3+Y_4 = 51,5$	$-Y_1+Y_2 - Y_3+Y_4 = - 1,93$	- 0,482
-	+	28,35	$Y_2-Y_1 = 3,27$	$-Y_1-Y_2 + Y_3+Y_4 = 6,59$	1,647
+	+	23,15	$Y_4-Y_3 = - 5,27$	$Y_1-Y_2 - Y_3+Y_4 = - 8,47$	- 2,117

Tabelul 2.3. Planul experiențelor „Mișcarea pe gradient”

Valorile	Factorii		Biomasa uscată, g L^{-1} .	β -glucani, % la B.U.
	Zaharoza, X_1	Acetat de zinc, X_2		
Coeficient liniar de regresie, $b(i)$	- 0,482	1, 647		
Unități de variație $\lambda(i)$	5	5		
$b(i) \cdot \lambda(i)$	- 2,41	8,235		
Coeficient de proporționalitate, K_i	1	$b(i) \cdot \lambda(i)x_2 / b(i) \cdot \lambda(i)x_1$ - 3,42		
Pasul pantei maxime, $H(i)$	2	$-3,42 \cdot 2 = -6,84$		
Baza experimentului	35	15		
Concentrația	gL^{-1}	mgL^{-1}		
1	35,0	15,0	1,72±0,13	23,59±0,46
2	37,0	8,16	1,73±0,01	29,47±0,52
3	39,0	1,4	1,73±0,08	29,25±0,08
4	41,0	0	1,91±0,01	29,16±0,61
5	43,0	0	1,97±0,01	25,86±0,73

Notă * $b(i)$ - coeficientul de regresie; $\lambda(i)$ – unități de variație; $H(i)$ – pasul ascendenței.

Conform datelor din Tabelul 2.3 nivelul maximal de sinteză a β -glucanilor ($29,47 \pm 0,52\%$ la B.U.) pentru tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 este determinat de următoarea componență cantitativă a mediului nutritiv, gL^{-1} : zaharoză - 37,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,7; NaCl - 0,5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 0,4; KH_2PO_4 - 1,0; acetat de zinc - 0,00816; autolizat de levuri - 10 ml; apă potabilă - 1L; pH- 5,0-6,0. Mediul optimizat a fost numit convențional R-ZZ [13].

Cantitatea netă de β -glucani pe mediul optimizat R-ZZ este de $0,510 \pm 0,01 \text{ gL}^{-1}$.

Mediul martor Rieder asigură obținerea a $22,36 \pm 0,57\%$ β -glucani, iar mediul M-4086 – $12,61 \pm 0,45\%$ β -glucani. Cantitatea netă de β -glucani pe mediul Rieder este de $0,467 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}$, iar pe mediul M-4086 este de $0,501 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}$ [5]. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.4.

Tabelul 2.4. Conținutul de β -glucani, carbohidrați și biomasă la cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pe diferite medii nutritive

Componente evaluate	Mediul optimizat R-ZZ	Mediul Rieder (martor I)	Mediul M-4086 (martor II)
β -glucani, % în peretele celular	$29,47 \pm 0,52$	$22,36 \pm 0,57$	$12,61 \pm 0,45$
β -glucani, gL^{-1} mediu de cultură	$0,510 \pm 0,01$	$0,467 \pm 0,02$	$0,501 \pm 0,02$
Carbohidrați totali, % la B.U.	$41,97 \pm 0,4$	$35,38 \pm 0,34$	$36,99 \pm 0,05$
Biomasa uscată, gL^{-1} mediu de cultură	$1,73 \pm 0,011$	$2,09 \pm 0,03$	$3,97 \pm 0,04$

Astfel, prin analiza regresională au fost determinate concentrațiile optime a sursei de carbon (zaharozei) și acetatului de zinc în componența mediului nutritiv pentru sporirea cantității de β -glucani la tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Cercetările efectuate au finalizat cu elaborarea unui nou mediu de nutriție – R-ZZ pentru cultivarea levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 care permite obținerea până la $29,47 \pm 0,52\%$ β -glucani în biomasa uscată, față de $22,36 \pm 0,57\%$ în mediul martor Rieder.

2.4. Influența temperaturii, aerației și duratei de cultivare asupra biosintezei β -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20

O influență semnificativă asupra creșterii și metabolismului microorganismelor o au condițiile de cultivare. Temperatura, pH-ul, aerația, durata procesului de cultivare determină

activitatea fiziologică a microorganismelor și acționează asupra compoziției biochimice a acestora [66, 82, 228, 233].

Se știe că procesul de creștere al levurilor este deosebit de sensibil la temperatură. Sub acțiunea temperaturii se modifică durata etapelor de dezvoltare a microorganismului – lag-fazei, fazei exponențiale, fazei staționare și a termenilor de manifestare a activității biochimice – biosintezei enzimelor, proteinelor și altor substanțe biologic active [60]. La temperaturi extreme, mecanismele de reglare ale celulei sunt afectate, astfel că randamentul producerii principiilor bioactive se modifică. De exemplu, la aceeași tulpină pentru creșterea masei celulare este necesară o anumită temperatură optimă, iar pentru producerea principiilor bioactive sunt necesare alte valori de temperatură [16]. Diferite valori de temperatură pot influența procesele de biosinteză a carbohidraților, în special a β -glucanilor, astfel prin cultivarea dirijată a tulpinii de levuri se pot obține β -glucani cu structură programată.

Pentru selectarea valorilor de temperatură adecvate biosintezei β -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 s-a studiat influența a 4 regimuri termice – 15, 20, 25, 30°C. Cultivarea s-a realizat submers în baloane Erlenmeyer cu volumul de 100 ml pe agitator rotativ (200 rot/min). Probele au fost prelevate la 120 ore de cultivare. Celule se recuperează prin centrifugare la 3000 rot/min, timp de 15 minute. Ulterior s-a determinat cantitatea de biomasă, de carbohidrați totali și β -glucani. În rezultatul cercetărilor s-a stabilit, că temperatura optimă pentru multiplicarea celulelor este de 15...25°C la care tulpina timp de 120 ore acumulează o cantitate maximă de biomasă. Majorarea temperaturii de cultivare până la 30°C induce o încetinire a procesului de multiplicare a levurii (Figura 2.12a). Faptul poate fi explicat prin creșterea esențială în celulele de levuri, la cultivarea la temperaturi elevate, a concentrației compușilor toxici reprezentați de formele active ale oxigenului (anionul superoxid (O_2^-), peroxidul de hidrogen (H_2O_2) și radicalii hidroxili (OH^\cdot)). Formarea acestor compuși duce la distrugerea membranelor, denaturarea proteinelor și ADN-ului și moartea celulelor [94, 236].

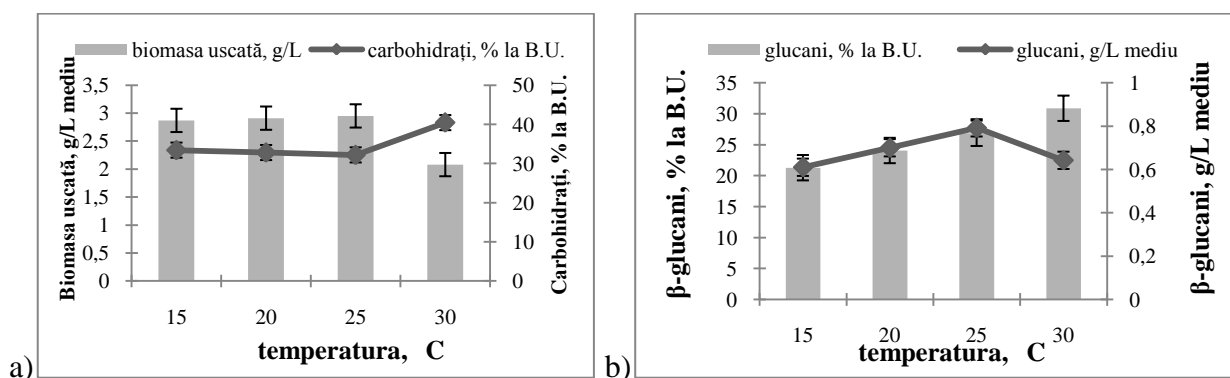


Fig. 2.12. Efectul temperaturii de cultivare asupra acumulării biomasei, carbohidraților totali (a) și β -glucanilor (b) la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Cu toate că tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 a manifestat activitate maximală la cultivare în regimul de 30°C (Figura 2.12), calculul pentru cantitatea netă de β -glucani la 1 L mediu de cultură arată, că productivitate sporită a tulpinii (0,792 g/L) poate fi obținută la cultivarea în regimul de 25°C (Figura 2.12b).

Unul din factorii decisivi ai procesului de dezvoltare a microorganismelor aerobe este alimentarea cu oxigen. Necesarul de oxigen pune problema dizolvării acestuia în mediu cu o viteză care să corespundă cerințelor față de oxigen ale microorganismului aflat la o viteză maximă de creștere. Viteza de dizolvare a oxigenului depinde de temperatură, de concentrația unor componente ale mediului, în special al zaharurilor. Numeroase investigații efectuate de cercetători au evidențiat faptul, că la concentrații mari de zahăr, inhibiția creșterii se datorează stresului osmotic ce influențează procesele legate de difuzie și deshidratare. Pe de altă parte, pornind de la aceeași cantitate de glucoză, dar în condițiile unei oxigenări puternice, se produce o cantitate mult mai mare de celule decât în condiții de oxigenare redusă [16]. Prezența unei concentrații mari de glucoză, în condițiile unei oxigenări puternice, duce la inhibarea sintezei citocromilor *a*, *b*, *c* și, ca urmare, la represiia respirației celulare. Aceasta afectează metabolismul celulelor, deoarece NADH acumulat inhibă sistemul piruvat dehidrogenazic, ceea ce determină încetarea activității ciclului Krebs, represiia fosforilării oxidative, inhibarea producerii de ATP și afectarea transportului transmembranar al glucozei [16]. Acest efect prezintă o importanță deosebită în performanța proceselor biotehnologice.

Pornind de la aceste premize, cercetările experimentale ulterioare s-au axat pe elucidarea efectelor influenței gradului de aerare a mediului de cultivare asupra biosintezei β -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Tulpina a fost cultivată pe mediul nutritiv R-ZZ optimizat. Influența oxigenului dizolvat asupra procesului de biosinteză s-a urmărit în condiții de cultivare pe agitator (200 rot/min) și staționar la temperatura de 25°C, durata de cultivare - 120 ore.

Gradul de aerare, în condițiile cultivării submerse în baloane Erlenmeyer, a fost modificat prin varierea volumului baloanelor: 1) baloane cu capacitatea 0,25 L ce conțin 0,15 L mediu nutritiv, 2) baloane cu capacitatea 0,50 L ce conțin 0,15 L mediu nutritiv, 3) baloane cu capacitatea 0,75 L ce conțin 0,15 L mediu nutritiv, 4) baloane cu capacitatea 1,0 L ce conțin 0,15 L mediu nutritiv. Ca martor a servit aceleași variante cultivate staționar. Rezultatele variațiilor conținutului de oxigen molecular determinat la 120 ore de cultivare sunt reflectate în Figura 2.13.

Cercetările au demonstrat că la cultivarea tulpinii în condiții de agitare conținutul de biomasă, carbohidrați și β -glucani este semnificativ mai mare comparativ cu cel obținut în

condiții de staționare, în care conținutul de oxigen este redus și constituie 3,4...9,8 mg/L (Figura 2.14).

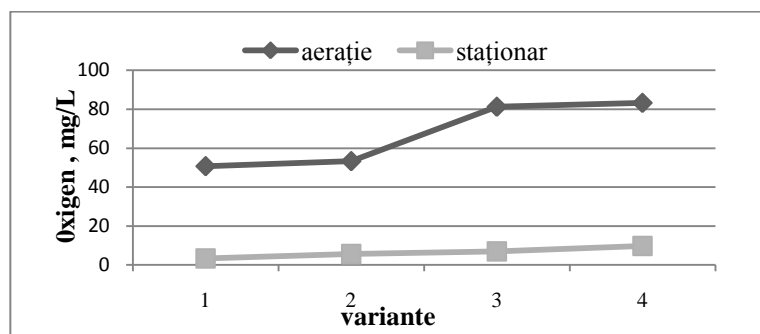


Fig. 2.13. Conținutul de oxigen molecular în variantele experimentale și martor la cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Legenda: Variante: 1 - baloane cu capacitatea 0,25 L; 2 - baloane cu capacitatea 0,5 L; 3 - baloane cu capacitatea 0,75 L; 4 - baloane cu capacitatea 1,0 L.

Pentru multiplicare și biosinteza carbohidraților, inclusiv a β -glucanilor este optimă cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în baloane cu capacitatea de 0,75-1,0 L, gradul de aerare fiind mai mare (81,3...83,3 mg O_2 /L), grație faptului că se mărește suprafața de contact al fazei lichide cu aerul. În aceste condiții conținutul de β -glucani constituie 0,674 g/L mediu de cultură, față de 0,424 g/L calculat în varianta cultivării staționare (Figura 2.14).

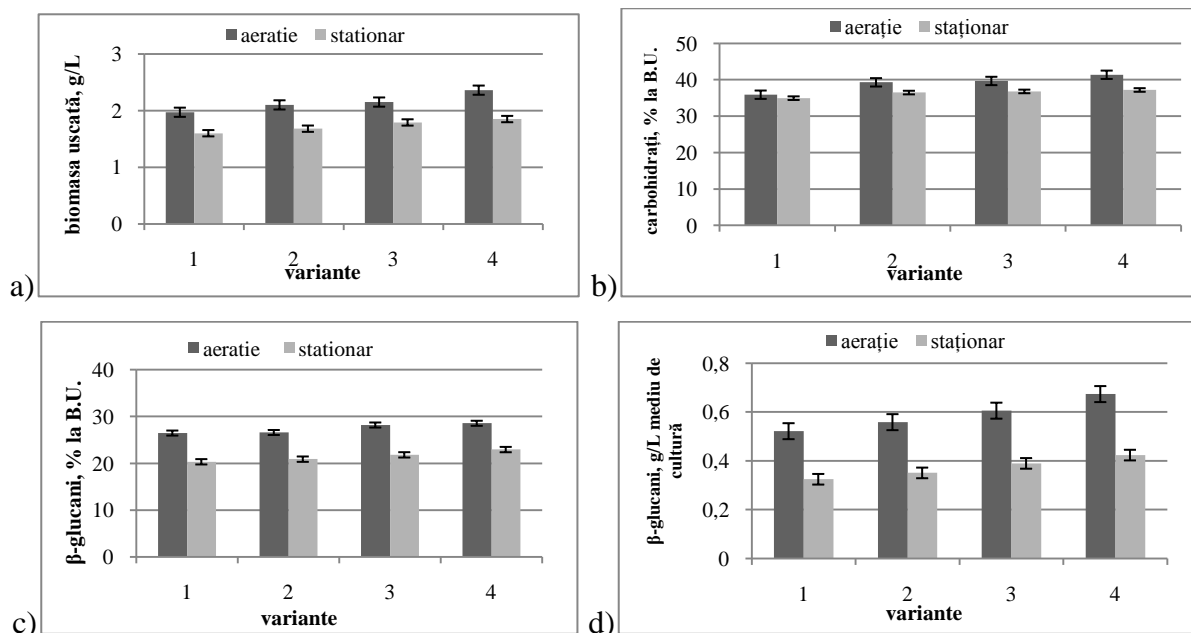


Fig. 2.14. Efectul gradului de aerare asupra acumulării biomasei (a), carbohidraților (b) și β -glucanilor (c, d) la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Legenda: variante - 1) baloane cu capacitatea 0,25 L; 2) baloane cu capacitatea 0,50 L; 3) baloane cu capacitatea 0,75 L; 4) baloane cu capacitatea 1,0 L.

În continuare s-a studiat influența duratei de cultivare a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 asupra biosintezei β -glucanilor. În baza studiului bibliografic s-a constatat că sinteza unui anumit produs la levuri este asociată cu fazele de dezvoltare. Din aceste considerente este important de a stabili pentru tulpina selectată relațiile dintre procesul de multiplicare și biosinteză a β -glucanilor în dinamică.

Cercetările au fost efectuate la cultivarea tulpinii pe mediul nutritiv optimizat R-ZZ la temperatura de 25°C, pe agitator rotativ (200 rot/min) și concentrația O₂ de la 80,3...85,0 mg/L, durata cultivării - 7 zile. La fiecare 24 ore de cultivare au fost prelevate probe pentru a stabili acumularea biomasei celulare, conținutul de carbohidrați totali și de β -glucani.

Datele ce reflectă dinamica acumulării biomasei, carbohidraților totali și β -glucanilor de către tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 sunt prezentate în Figura 2.15.

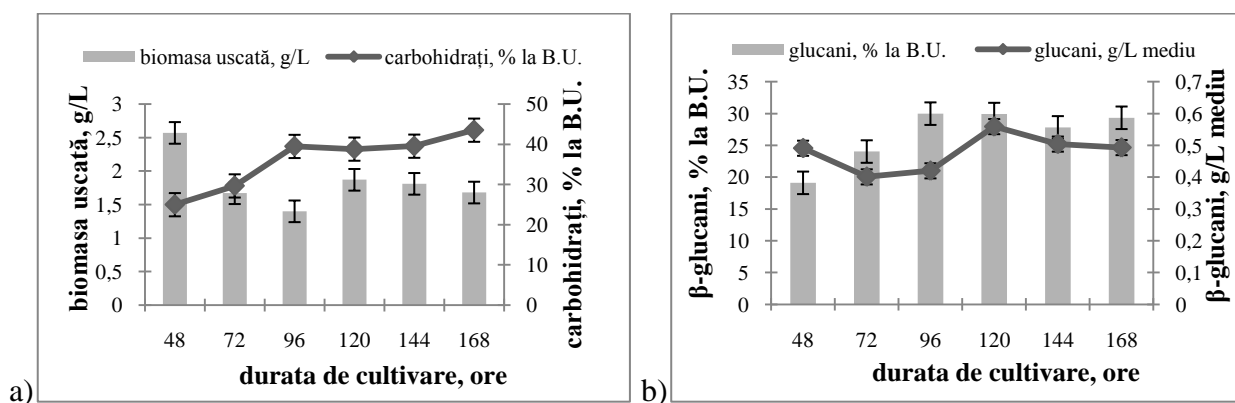


Fig. 2.15. Dinamica acumulării biomasei, carbohidraților totali (a) și β -glucanilor (b) la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

S-a constatat că acumularea biomasei este intensă în primele 48 ore de cultivare, după care acest proces se stabilizează și după 72 ore de la începutul procesului de dezvoltare se intensifică acumularea de glucide în celule (Figura 2.15a). Majorarea conținutului de carbohidrați în biomasă în faza respectivă de dezvoltare a levurilor poate fi explicată prin diminuarea conținutului de azot în mediu, fapt ce duce la stoparea proceselor de multiplicare și biosinteza activă a componentelor celulare și poate fi considerată o adaptare la conținutul mediului nutritiv. Aceste date corelează cu datele altor autori [150].

O acumulare semnificativă a β -glucanilor în peretele celular la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 se produce peste 96 ore de cultivare submersă, valori care practic nu se modifică pe parcursul următoarelor ore de cultivare (Figura 2.15b). Conținutul maximal al β -glucanilor 0,559 g/L se observă la 120 ore de cultivare a levurii.

Influența pH-ului asupra proceselor de creștere și biosinteză la microorganisme este complexă. Într-un ciclu de cultivare, pH-ul optim în faza de creștere a masei celulare are o valoare, iar în faza de sinteză a produsului o altă valoare. Deci, în cele două etape tehnologice, trebuie asigurate valori optime diferite pentru pH. Din aceste considerente, în timpul procesului de creștere este necesar ca pH-ul mediului de cultură să fie permanent monitorizat.

Modificarea pH-ului mediului de cultivare inițial 5,5 observat pe durata creșterii tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 este reflectată în Figura 2.16.

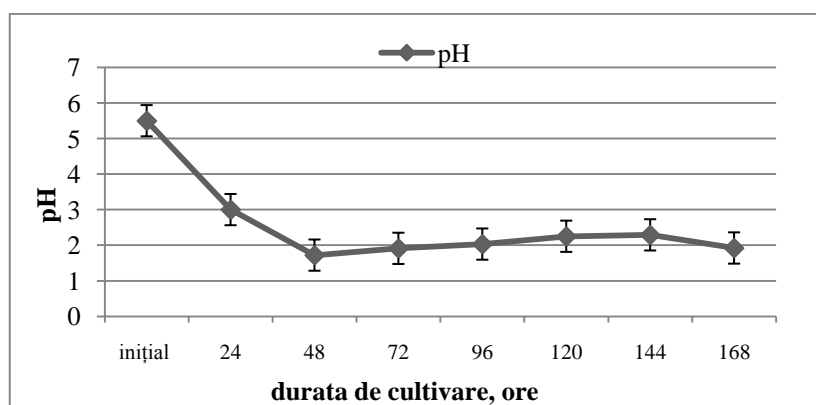


Fig. 2.16. Modificarea pH-ului mediului de cultivare pe durata ciclului vital a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pe mediul R-ZZ.

S-a constatat că tulpina posedă un puternic mecanism de reglare a pH-ului mediului de cultură. Stabilizarea valorilor pH-ului se produce după 48 ore de cultivare. Conținutul maximal de biomasă determinat în primele 48 ore de cultivare (Figura 2.16) poate fi caracterizat ca unul pozitiv deoarece la etapele ulterioare de dezvoltare, când pH mediului de cultivare scade, se înlătură posibilitatea de contaminare bacteriană.

Astfel, ca rezultat al studiului efectuat asupra influenței diferitor parametri de cultivare a levurii, s-a stabilit că temperatura favorabilă pentru producerea β -glucanilor este de 25°C, valoarea optimă a concentrației oxigenului dizolvat în mediul de cultură – 81,3...83,3 mg/L, durata optimă de cultivare a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 este 120 ore.

2.5. Procedeu de sporire a conținutului de β -glucani la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 cu aplicarea mediului nutritiv și condițiilor de cultivare optimizate

Cercetările de optimizare a compoziției mediului nutritiv și a condițiilor de cultivare au permis de a elabora un procedeu de sporire a conținutului de β -glucani având ca obiect biotehnologic tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, care poate fi realizat în mai multe variante.

a) *Procedeu de cultivare a tulpinii S. cerevisiae CNMN-Y-20 pe mediu R-ZZ.*

Procedeu se realizează în următorul mod:

Se prepară mediul nutritiv R-ZZ cu următoarea componență (gL^{-1}): zaharoză - 37,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,7; NaCl - 0,5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 0,4; KH_2PO_4 - 1,0; acetat de zinc - 0,00816; autolizat de levuri - 10 ml; apă potabilă - 1 L; pH - 5,0-6,0. Mediul se inoculează cu celule de levuri cultivate pe must de bere cu vârsta de 48 ore. Materialul semincer cu densitatea 2×10^6 celule/ml se introduce în volum de 5% din volumul mediului nutritiv și se cultivă pe agitator (200 rot/min), la temperatura de 25°C , valoarea optimă a concentrației O_2 - 81,3...83,3 mgL^{-1} , pe parcursul a 120 ore.

Biomasa se colectează prin centrifugare, se supune autolizei urmată de efectuarea analizelor biochimice de rigoare și standardizarea bioprodusului după conținutul de β -glucani.

Procedeu asigură obținerea a $2,18 \pm 0,38 \text{ gL}^{-1}$ biomasă uscată, care conține $28,74 \pm 0,96\%$ la B.U. β -glucani. Cantitatea netă de β -glucani care se obține la aplicarea acestui procedeu este de $0,620 \pm 0,086 \text{ gL}^{-1}$ mediu de cultură (Tabelul 2.5).

Tabelul 2.5. Indicii bioproductivi ai tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare cu utilizarea mediului R-ZZ

Indici bioproductivi	Procedeu nou	Procedeu cunoscut	Avantajul procedeuului nou, %
Biomasa uscată, g/L	$2,18 \pm 0,38$	$2,09 \pm 0,03$	4,3
Carbohidrați totali, % la B.U.	$37,65 \pm 2,88$	$35,38 \pm 0,34$	6,4
β -glucani, % la B.U.	$28,74 \pm 0,96$	$22,36 \pm 0,57$	28,5
β -glucani, g/L mediu de cultură	$0,620 \pm 0,086$	$0,467 \pm 0,02$	32,8

Procedeu standard cu utilizarea mediului clasic Rieder permite obținerea a $2,09 \pm 0,03 \text{ gL}^{-1}$ biomasă uscată, $22,36 \pm 0,57\%$ la B.U. β -glucani. Cantitatea netă de β -glucani care se obține la aplicarea acestui procedeu este de $0,467 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}$ mediu de cultură.

Avantajul procedeuului elaborat constă în producerea cu 32,8% mai mult β -glucani la 1 L mediu de cultură [22].

b) *Procedeu de cultivare a tulpinii S. cerevisiae CNMN-Y-20 pe mediu YPD-4.*

Procedeuul se realizează în următorul mod:

Se prepară mediul nutritiv YPD-4 cu următoarea componență (gL^{-1}): 1% extract de levuri, 2% peptonă, 4% glucoză, apă potabilă - 1 L, pH - 5,0-6,0. Mediul se inoculează cu celule de levuri cu vârsta de 48 ore cultivate pe must de bere. Materialul semincer cu densitatea 2×10^6 celule/ml se introduce în volum de 5% din volumul mediului nutritiv și se cultivă pe agitator (200 rot/min), la temperatura de 25°C , valoarea optimă a concentrației O_2 – $81,3 \dots 83,3 \text{ mgL}^{-1}$, pe parcursul a 120 ore.

Biomasa se colectează prin centrifugare și se supune autolizei urmată de separarea β -glucanilor din pereții celulari.

Procedeuul asigură obținerea a $5,8 \pm 0,17 \text{ gL}^{-1}$ B.U., care conține $45,35 \pm 0,51\%$ din B.U. carbohidrați totali și $19,8 \pm 1,64\%$ la B.U. β -glucani. Cantitatea netă de β -glucani care se obține la aplicarea acestui procedeu este de $1,14 \pm 0,07 \text{ gL}^{-1}$ mediu de cultură.

Procedeuul standard cu utilizarea mediului clasic YPD permite obținerea a $3,91 \pm 1,06 \text{ gL}^{-1}$ biomasă uscată, $19,06 \pm 0,09\%$ la B.U. β -glucani. Cantitatea netă de β -glucani care se obține la aplicarea acestui procedeu este de $0,748 \pm 0,207 \text{ gL}^{-1}$ mediu de cultură (Tabelul 2.6).

Tabelul 2.6. Indicii bioproductivi ai tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare cu utilizarea mediului YPD-4

Indici bioproductivi	Procedeu nou	Procedeu cunoscut	Avantajul procedeuului nou, %
Biomasa uscată, g/L	$5,8 \pm 0,17$	$3,91 \pm 1,06$	48,7
Carbohidrați totali, % la B.U.	$45,35 \pm 0,51$	$40,93 \pm 0,92$	10,8
β -glucani, % la B.U.	$19,8 \pm 1,64$	$19,06 \pm 0,09$	3,9
β -glucani, g/L mediu de cultură	$1,14 \pm 0,07$	$0,748 \pm 0,207$	52,4

Avantajele procedeuului elaborat constau în producerea cu 48,7% biomasă uscată și cu 52,4% mai mult β -glucani la 1 L mediu de cultură.

Astfel, analiza comparativă a rezultatelor obținute cu datele din literatura de specialitate [47, 48, 128] ne permite să afirmăm că procedeuul elaborat de sporire a biosintezei β -glucanilor în

biomasa de *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 asigură obținerea unor cantități considerabile de acest compus cu valoare fiziologică înaltă. Datorită simplității etapelor de realizare, procedeul de sinteză orientată a β -glucanilor de către tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 poate fi încadrat cu succes în fluxurile tehnologice de producere industrială.

2.6. Concluzii la capitolul 2

1. Procedeul de dezintegrare a celulelor cu aplicarea omogenizării biomasei celulare timp de 10 minute asigură un grad de distrugere a pereților celulari de 95%. Aplicarea procedurii dat în îmbinare cu tratarea alcalin-acidă sporește cu 34,5% conținutul de β -glucani extrași din pereții celulari levurieni și reduce durata de extragere cu 24 ore comparativ cu procedeul martor [19].
2. Din sursele de carbon investigate capacitate maximă de a spori acumularea β -glucanilor în biomasa tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 posedă glucoza și zaharoza. Biosinteză sporită de β -glucani s-a înregistrat la cultivarea tulpinii pe mediul YPD completat cu 3-4% glucoză și mediul Rieder completat cu 3% zaharoză [21].
3. Sulfatul de amoniu și hidrogenofosfatul de amoniu în concentrații de 0,1...0,5%, suplimentat la mediul YPD, diminuează semnificativ conținutul de β -glucani la tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Eficiența hidrogenofosfatului de amoniu a fost demonstrată numai pentru acumularea biomasei celulare, care a sporit cu 38,9% față de martor [21].
4. Acetatul de zinc în concentrații de 5-30 mg/L, adăugat la mediul de cultură Rieder-M, asigură sporirea cu 23...44,1% față de martor a conținutului de β -glucani în biomasa *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 [21].
5. Aplicarea metodelor matematice de planificare a experiențelor a permis de a elabora un mediu nutritiv, cu aplicarea concentrațiilor optime ale acetatului de zinc și zaharozei, codificat R-ZZ. Mediul nutritiv elaborat asigură o sinteză sporită a β -glucanilor cu 31,8% față de martor [13].
6. Condițiile optime pentru biosinteza β -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, cultivată pe mediile elaborate sunt: temperatura de 25°C, gradul de aerare 81,3...83,3 mg/L, durata de cultivare submersă 120 ore [22].
7. Procedeul elaborat, bazat pe utilizarea mediilor nutritive R-ZZ și YPD-4, condițiilor de cultivare optimizate, permite obținerea a 0,620 și respectiv 1,14 gL⁻¹ β -glucani, ce este cu 32,8 respectiv 52,4% mai mult comparativ cu procedeele cunoscute [22].

3. POTENȚIALUL BIOTEHNOLOGIC A LEVURII *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-20 SUB INFLUENȚA NANOPARTICULELOR OXIZILOR METALICI

Dezvoltarea științei și tehnologiei în ultimul deceniu se caracterizează prin studii intensive asupra proprietăților obiectelor nanodimensionale și prin elaborarea diferitor tehnologii de aplicare a acestora în practică. Analiza amplă și generalizarea literaturii de specialitate efectuată în capitolul 1, evidențiază perspectiva utilizării nanoparticulelor în calitate de reglatori ai creșterii și stimulatori a indicilor productivi și biosintetici ai microorganismelor, în special ai levurilor.

Perspectivă biotehnologică privind aplicarea nanoparticulelor ZnO în diferite domenii sunt menționate în publicațiile [199, 258] în care este descris rolul acestora în produsele cosmetice, în procesul de prevenire a toxiiinfecțiilor alimentare datorat activității antimicrobiene a diferitor nanoparticule, etc. Este de menționat faptul că nanoparticulele ZnO în concentrații mai mari de 50 mg/L sunt toxice pentru *S. cerevisiae* [92].

Zincul este un microelement strict necesar pentru structura, multiplicarea, creșterea și dezvoltarea levurilor, ce intră în compoziția a cca 300 enzime, ce mediază procesele metabolice, sinteza AND, ARN-ului și proteinelor [229]. În lucrările mai multor autori sunt expuse rezultatele influenței diferitor nanoparticule (oxizi ai Au, Ag, Ti, Si, Zn) asupra celulei microbiene din care concluzionăm că acestea, în dependență de structură și concentrație, pot stimula sau inhiba creșterea și activitatea biosintetică a microorganismelor [59, 109].

Un alt tip de nanoparticule cu efect reglator sunt cele ale dioxidului de titan. Comparativ cu alți agenți antimicrobieni, TiO₂ merită atenție datorită stabilității înalte, toxicității joase pentru mediul ambiant, costului relativ mic, activității biologice, etc. Posibile mecanisme de influență a nanoparticulelor TiO₂ la nivel celular au fost cercetate de către mai mulți specialiști în domeniu care au elucidat unele procese ce au loc în cazul aplicării nanoparticulelor [110, 178]. Conform rezultatelor din literatura de specialitate, concentrația minim inhibitorie (MIC - minimum inhibitory concentration) a nanoparticulelor variază în dependență de microorganismul cercetat. Spre exemplu, pentru *Escherichia coli* și *Candida albicans* MIC a nanoparticulelor 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 [204].

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 [269], 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.

Așadar, aplicarea nanoparticulelor anorganice la cultivarea microorganismelor prezintă un domeniu relativ nou, puțin explorat în cercetările de nanobiotehnologie.

Cele expuse mai sus determină importanța evaluării efectelor nanoparticulelor oxidurilor de metale asupra tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și aprecierea perspectivelor de aplicare ale acestora în biotehnologia cultivării levurilor în vederea sporirii potențialului biosintetic.

Luând în considerație cele expuse **scopul** capitolului constă în elucidarea acțiunii nanoparticulelor ZnO și TiO₂ asupra biosintezei β-glicanilor și altor constituente celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

3.1. Materiale și metode de cercetare

În vederea realizării scopului acestui capitol, în cercetări au fost utilizate trei tipuri de nanoparticule (NPs): ZnO cu dimensiunile 10 și 30 nm, stabilizate în poli(N-vinilpirolidon) (Poly(N-vinylpyrrolidone)) (PVP) [123] și TiO₂ cu dimensiunea 30 nm, obținute prin metoda zol-gel asistată cu ultrasunet [44], puse la dispoziția de către cercetătorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii. Concentrațiile nanoparticulelor utilizate la cultivarea levurilor au constituit 0,5; 1; 5; 10; 15; 20 mg/L. Nanoparticulele s-au adăugat sub formă de emulsie la etapa inoculării tulpinii.

Tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 a fost cultivată pe mediul nutritiv YPD cu următoarea componență: 1% extract de drojdie, 2% peptonă, 2% glucoză, apă potabilă 1 L, pH-5,5 [48].

Cultivarea submersă 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°C, gradul de aerare – 81,3...83,3 mg/L, durata de cultivare submersă – 120 ore. Mediul lichid de fermentare s-a înșămânțat în volum de 5% cu inocul 2x10⁶ celule/ml.

Prepararea inoculului, determinarea numărului de celule dezvoltate pe mediul lichid, viabilitatea celulelor, examinarea formei și dimensiunilor celulelor, determinarea biomasei levurii, substanței uscate a biomasei, conținutului de carbohidrați totali, conținutului de β-glicani s-au efectuat în conformitate cu metodele descrise în capitolul 2.

Determinarea proteinei a fost efectuată spectrofotometric după metoda Lowry [162].

Metoda este bazată pe determinarea intensității colorației soluției de proteine prin combinarea a două reacții: Biuret (de identificare a legăturilor peptidice) și Folin (oxidarea resturilor proteice aromatice aminoacizilor tirozina și cisteina) din componența moleculei de proteină. Ultima reacție constă în reducerea amestecului de acizi fosfovolframic și

fosfomolibdenic cu formarea unui compus complex colorat în albastru. Intensitatea colorației este proporțională cu cantitatea de proteine în materialul cercetat.

Protocolul experimental începe cu extracția proteinelor: la 0,1 ml probă biomasă de levuri (7,0 mg/ml) se adaugă 0,9 ml NaOH 0,1N și se lasă 30 minute. După care la 0,1 ml din soluția dată se adaugă 0,4 ml apă distilată și 2,0 ml reactiv Biuret, se agită și se lasă 10 minute la temperatura camerei. Se adaugă 0,2 ml reactiv Folin și se agită energic. Proba se lasă timp de 30 minute pentru dezvoltarea colorației și se măsoară absorbanta soluției la spectrofotometru la lungimea de undă 750 nm în cuve cu grosimea stratului de 1,0 cm.

Calcularea cantității de proteine se efectuează după curba de calibrare construită în baza unor diluții succesive ale soluției standart de albumină.

Cantitatea de proteine se determină după formula:

$$c(\%) = E_{750} \cdot d \cdot K \cdot 100\% / m, \text{ unde:} \quad (3.1)$$

E_{750} – absorbanta probei la lungimea de undă 750 nm;

K – coeficientul de recalculare a cantității de peptide în mg/ml;

d – diluția probei;

m – masa probei absolut uscate (mg);

c - conținutul de proteine în % din BAU.

Activitatea catalazei a fost stabilită conform metodei descrise de Aebi [46], adaptată pentru levuri de Efremova [6].

Biomasa tulpinii de levuri *S. cerevisiae* se supune autolizei la temperatura de 30...35°C timp de 20...24 ore, cu agitare periodică. Apoi se determină conținutul de proteine în autolizatul obținut. Următoarea etapă este pregătirea soluțiilor pentru determinarea activității catalazei: 0,05M de tampon fosfat cu pH-7,0 și soluție de peroxid de hidrogen de 0,06%. Pregătirea soluției de peroxid de hidrogen se efectuează în felul următor: la 50 ml de 0,05M de tampon fosfat cu pH-7,0 ce conține 5 mM de EDTA se adaugă 0,1 ml de H₂O₂ de 33%, soluția obținută se incubează la temperatura de 25°C. Se pregătește amestecul de reacție pentru determinarea activității catalazei. În flacoane de sticlă cu volumul de 3 ml se adaugă 2,9 ml de soluție de peroxid de hidrogen de 0,06% și 0,1 ml de material biologic (autolizat de levuri *S. cerevisiae*). Proba experimentală se diluează de 30 ori cu apă distilată. În proba de control se adaugă aceiași reagenți în consecutivitatea descrisă mai sus, dar în loc de material biologic se adaugă 0,1 ml de soluție de 0,05M de tampon fosfat cu pH-7,0. Amestecul de reacție se agită și se toarnă în cuvele spectrofotometrice cu volumul de 3 ml. Următoarea etapă este determinarea indicilor spectrofotometrici care vor fi utilizați pentru a calcula viteza de scădere a densității optice într-un interval de timp, la lungimea de undă de 240 nm ($\Delta E/t$). Scăderea densității optice se datorează

descompunerii peroxidului de hidrogen în prezența catalazei. Măsurarea densității optice a produsului reacției în raport cu soluția tampon fosfat se efectuează spectrofotometric la lungimea de undă de 240 nm peste 15 s. Activitatea catalazei se exprimă în U/mg de proteine. O unitate enzimatică descompune 1 μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$, la temperatura de 25°C și $\text{pH}=7,0$. Se calculează activitatea CAT conform formulei:

$$\text{Activitatea CAT (U/mg de proteine)} = (\Delta E_{\text{proba}}/t - \Delta E_{\text{control}}/t) \cdot d \cdot V \text{ probei de reacție} / 0,0436 \cdot C_{\text{proteine}}, \text{ unde:} \quad (3.2)$$

ΔE_{proba} – variația densității optice a probei experimentale la lungimea de undă de 240 nm.

3.2. Efectele nanoparticulelor dioxidului de titan asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20

Funcționalitatea nanoparticulelor (NPs) de TiO_2 este expusă în diferite publicații în care se menționează eficiența utilizării acestora în industria alimentară, medicină, microbiologie, cosmetologie, la producerea vopselelor, pigmentilor [178].

Un studiu de evaluare a influenței nanoparticulelor TiO_2 , ZrO_2 și Fe_2O_3 asupra consumului de O_2 și integrității membranei celulare la drojdia *S. cerevisiae* a efectuat Lila Otero-Gonzales, care a stabilit că concentrațiile până la 1000 mg/L nu sunt toxice pentru drojdie [193].

În legătură cu faptul că în ultimul timp, tot mai des se menționează efectele pozitive ale nanoparticulelor TiO_2 cercetările noastre au fost axate pe elucidarea posibilității de aplicare a nanoparticulelor TiO_2 în biotehnologia cultivării levurilor, în vederea sporirii producției de β -glucani. Pentru a demonstra eficiența utilizării nanoparticulelor TiO_2 (30 nm) în tehnicile de cultivare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, a fost inițiat un studiu de apreciere a modificărilor următorilor indicatori bioproductivi: multiplicarea, producția de biomasă, conținutul de proteine, de carbohidrați și β -glucani. Totodată s-a cercetat activitatea enzimei antioxidante – catalaza.

Studierea și evidențierea particularităților de acțiune a nanoparticulelor TiO_2 asupra multiplicării celulelor s-a monitorizat timp de 48 ore de cultivare.

Rezultatele experimentale ale influenței NPs TiO_2 asupra reproducerii celulelor sunt prezentate în Figura 3.1 din care este evident că densitatea optică (OD), determinată la lungimea de undă $\lambda=670$ nm, în probele experimentale ale tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 nu diferă substanțial de proba martor. Procesele care au loc în fiecare din etapele vitale ale levurii decurg în conformitate cu schemele clasice.

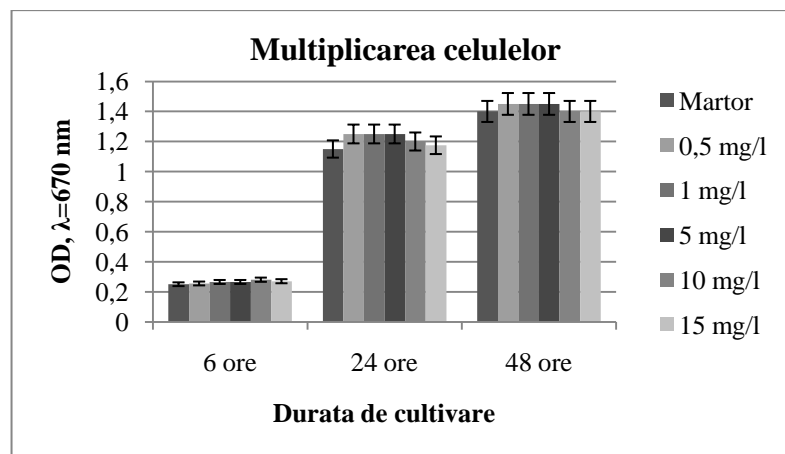


Fig. 3.1. Multiplicarea celulelor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivarea în prezența NPs TiO₂ în funcție de concentrație și durata de contact.

Deoarece în condițiile fizico-chimice de cultivare modificate, cultura își poate schimba indicii de productivitate ca o reacție de răspuns, în continuare a fost studiat potențialul de producere de către levură a biomasei celulare. Astfel, cantitatea de biomasă uscată obținută după 120 ore de cultivare în profunzime în prezența nanoparticulelor dioxidului de titan în concentrații de 0,5-20 mg/L s-a micșorat nesemnificativ (cu 3-6%) comparativ cu martorul (Figura 3.2).

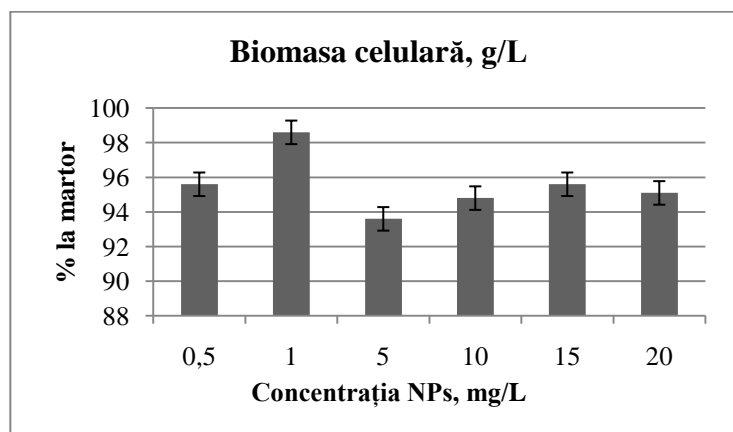


Fig. 3.2. Efectul diferitor concentrații a nanoparticulelor TiO₂ asupra conținutului de biomasă la tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Din punct de vedere biotehnologic este de a stabili gradul de modificare a capacităților biosintetice a culturii de levuri la acțiunea nanoparticulelor aplicate în procesul de cultivare. Astfel, în continuare a fost cercetată influența nanoparticulelor TiO₂ asupra sintezei proteinelor la tulpina în studiu. Analiza comparativă a rezultatelor prezentate în Figura 3.3 a pus în evidență o cantitate redusă de proteine (în raport cu martorul) în biomasă levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20,

la cultivare în variantele experimentale cu aplicarea NPs TiO₂. Semnificative (cu 14,5-19,5% mai jos față de proba de referință) sunt probele experimentale în care au fost aplicate concentrațiile 0,5-1,0 mg/L de NPs TiO₂.

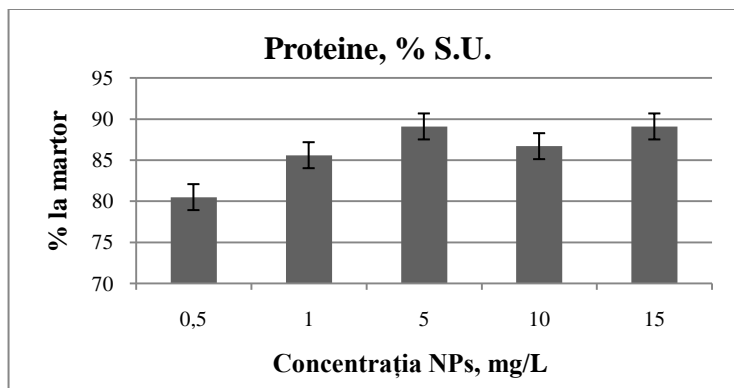


Fig. 3.3. Efectul nanoparticulelor TiO₂ asupra conținutului de proteine în biomasa levuriană, în funcție de concentrație.

În cadrul experiențelor ulterioare a fost monitorizat conținutul de carbohidrați totali și β -glucani la levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Studiarea și evidențierea particularităților de acțiune a nanoparticulelor dioxidului de titan asupra cantității de carbohidrați în biomasă a pus în evidență valori diferite în funcție de concentrația utilizată de nanoparticule. În variantele experimentale de cultivare a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în prezența nanoparticulelor TiO₂ în diapazonul de concentrații 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 și 15,0 mg/L s-a înregistrat o majorare cu 1-7,5% a conținutului de carbohidrați în funcție de concentrație (Figura 3.4). Astfel, s-a demonstrat că nanoparticulele TiO₂ se manifestă ca reglatori și pot asigura o acumulare ușoară a carbohidraților la *S. cerevisiae* CNMN-20.

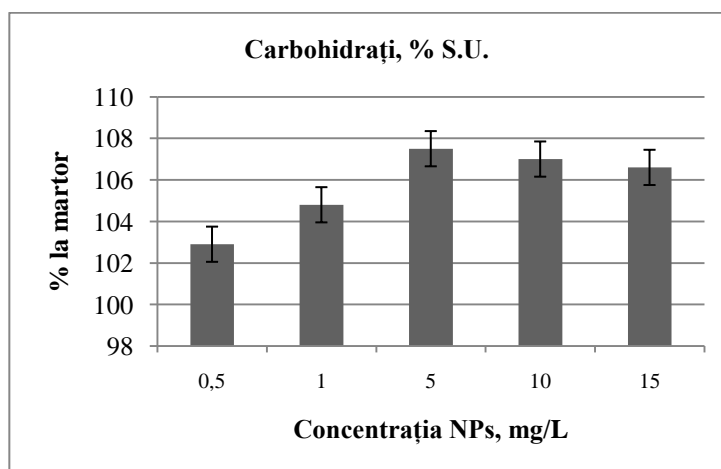


Fig. 3.4. Efectele nanoparticulelor TiO₂ asupra acumulării carbohidraților la tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în funcție de concentrație.

Determinarea conținutului de β -glucani, a indicat că în biomasa levurii *S. cerevisiae* CNMN-20, la cultivare în prezența nanoparticulelor TiO_2 , au loc variații nesemnificative a acestui parametru comparativ cu proba martor. Astfel, sporirea conținutului de β -glucani cu 7,2-19,8% mai mult comparativ cu martorul s-a observat la aplicarea concentrațiilor de 10,0-20,0 mg/L și a constituit 18,8-21,0% la S.U. (Figura 3.5). La concentrații mai mici a nanoparticulelor TiO_2 (0,5-5,0 mg/L), efectul de stimulare lipsește.

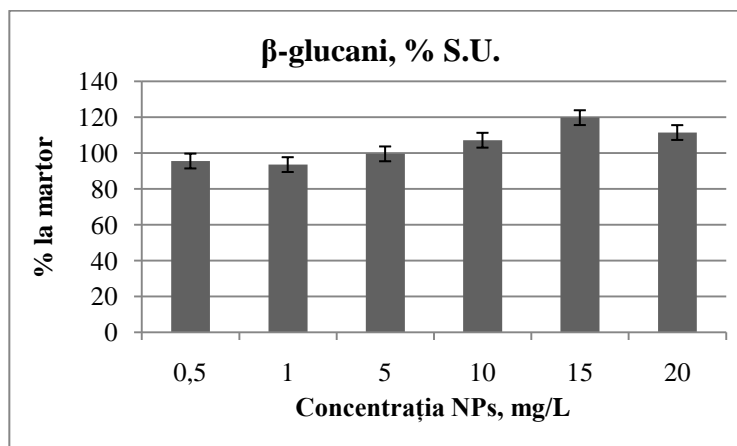


Fig. 3.5. Conținutul de β -glucani în biomasa *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența diferitor concentrații nanoparticulelor TiO_2 .

Așadar, în premieră au fost efectuate cercetări pentru stabilirea posibilității de utilizare a nanoparticulelor TiO_2 în biotehnologia cultivării levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și obținerii β -glucanilor. Rezultatele au demonstrat eficiența utilizării nanoparticulelor TiO_2 la cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pentru majorarea randamentului de acumulare a β -glucanilor. În rezultatul cercetărilor efectuate, putem afirma că gradul de acțiune a nanoparticulelor TiO_2 este determinat de concentrațiile utilizate. Proprietățile depistate ale nanoparticulelor TiO_2 prezintă oportunitate de aplicare în biotehnologia cultivării levurilor și obținerii unor componente polizaharidice [254].

3.3. Efectele nanoparticulelor oxidului de zinc asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituente celulare ale levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în funcție de dimensiuni

Pentru caracteristica comparativă a efectelor nanoparticulelor ZnO în funcție de dimensiuni au fost selectați următorii indicatori bioproductivi ai tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20: gradul multiplicării levurii, acumularea biomasei celulare, conținutul de proteine, carbohidrați totali, β -glucani, precum și activitatea enzimelor antioxidante.

Pentru a aprecia ritmul de creștere a levurii, nanoparticulele ZnO cu dimensiunile 10 și 30 nm au fost adăugate în mediu de cultură YPD, în concentrații de 0,5; 1,0 mg/L. Procesul de reproducere a celulelor s-a monitorizat timp de 48 ore de cultivare în profunzime, perioada care cuprinde toate fazele procesului de multiplicare a celulei levuriene: *lag*, *log*, staționară, declin și moarte celulară. Multiplicarea culturii s-a determinat după 6, 24 și 48 ore de cultivare în profunzime. Rezultatele redate în Figura 3.6a, b demonstrează că, atât sub influența nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 10 nm, în concentrații de 0,5; 1 mg/L, cât și sub influența celor cu dimensiunile de 30 nm, nu se produc devieri semnificative a multiplicării celulelor comparativ cu proba martor.

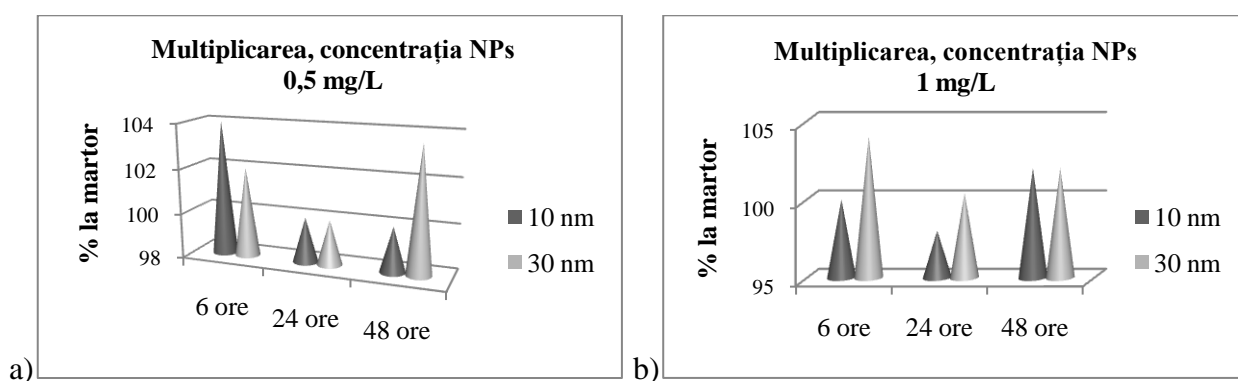


Fig. 3.6. Multiplicarea *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni în funcție de durata de contact: a) 5 mg/L; b) 10 mg/L.

Biomasa este unul din parametrii bioproductivi importanți ai culturii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Aceasta a fost colectată la finele ciclului vital, după 120 ore de cultivare, prin centrifugare, și supusă analizelor biochimice. Figura 3.7 redă grafic conținutul de biomasă acumulat de *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni. Astfel, conținutul de biomasă acumulat prezintă o stabilitate relativă pentru levura cultivată în prezența nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de 10 nm. În cazul cultivării levurii studiate în prezența nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de 30 nm se observă o inhibiție ușoară cu 3,2% comparativ cu proba martor.

De rând cu polizaharidele, lipidele și acizii nucleici, printre constituenții bioactivi importanți ai biomasei levuriene, se numără și proteinele, care în calitate de enzime catalizează diferite reacții biochimice sau pot juca un rol important în menținerea integrității celulare (proteinele din peretele celular). Sub acțiunea diferitor factori chimici (acizi, baze, solvenți organici), factori fizici (ultrasunet, radiații de diversă natură, temperatură) sau mecanici (agitare), are loc modificarea structurii proteinelor, care poate fi reversibilă sau ireversibilă.

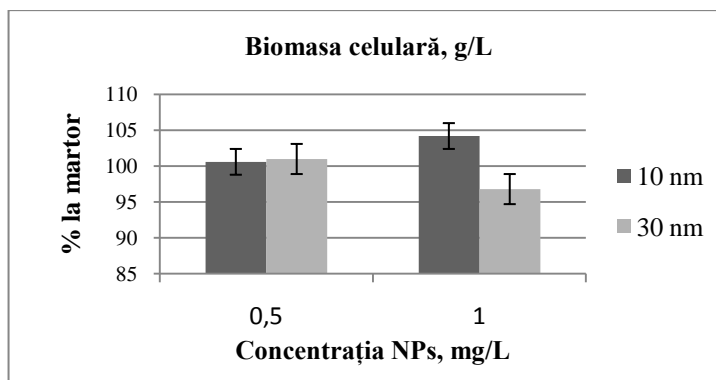


Fig. 3.7. Cantitatea de biomasă a *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni.

Din aceste considerente, ne-am propus să identificăm efectul nanoparticulelor ZnO asupra conținutului de proteine în biomasă levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Rezultatele obținute demonstrează că conținutul de proteine în biomasă se modifică în funcție de dimensiunile nanoparticulelor utilizate. Pentru nanoparticulele cu dimensiunile mici (10 nm) este specifică o micșorare relativă (cu 4,7-15,1%) a cantității de proteine. Nanoparticulele ZnO cu dimensiunile mai mari, (30 nm), aplicate în concentrație de 1 mg/L, prezintă un efect pozitiv mai clar conturat, astfel încât cantitatea de proteine în această variantă experimentală atinge valori cu 10% mai mari, decât cantitatea de proteine determinată în martor (Figura 3.8.).

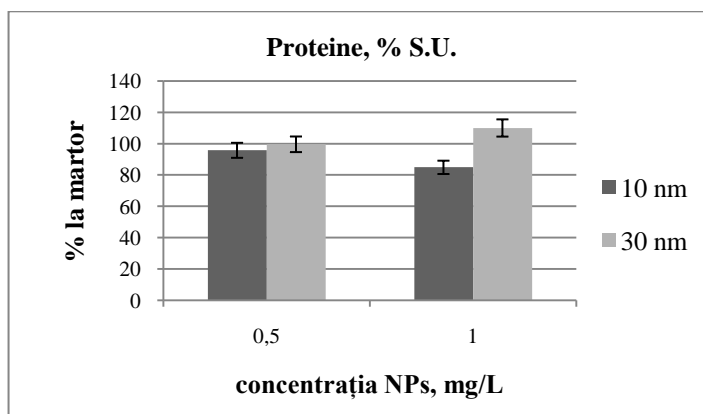


Fig. 3.8. Conținutul de proteine în biomasă *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni.

În continuare a fost cercetat și stabilit conținutul de carbohidrați totali și cel al fracției de β -glucani în biomasă levurii la cultivarea ei în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni. În variantele de cultivare a levurii în prezența nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 10 nm, valorile conținutului de carbohidrați totali au fost apropiate de cele din proba martor

(Figura 3.9a). Analiza statistică a rezultatelor obținute la cultivarea în prezența nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 30 nm ne demonstrează o inhibiție ușoară a conținutului de carbohidrați totali cu 7% față de proba martor (Figura 3.9a).

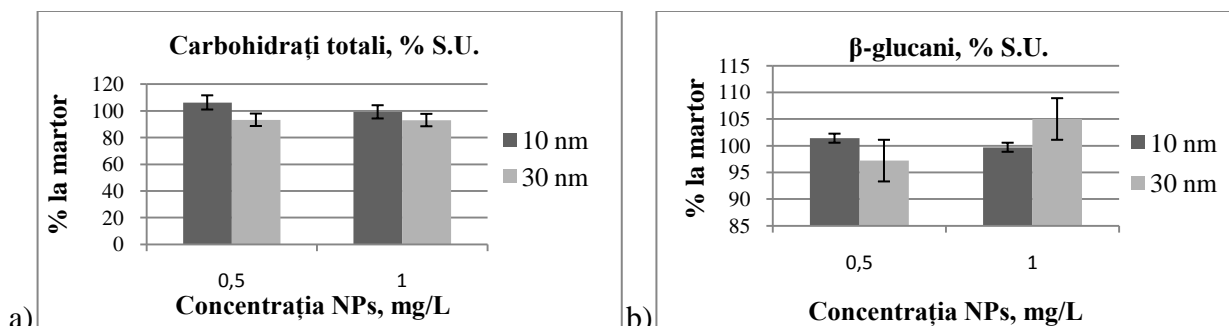


Fig. 3.9. Conținutul de carbohidrați (a) și β -glucani (b) în biomasa *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni.

Studiul conținutului de β -glucani în biomasa celulară din variantele cu utilizarea nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 30 nm a înregistrat un spor mai mare cu 5% comparativ cu cel din variantele cu aplicarea nanoparticulelor cu dimensiunile de 10 nm. Conținutul de β -glucani în variantele cu aplicarea nanoparticulelor cu dimensiunile de 10 nm a fost comparabil cu proba martor (Figura 3.9b).

Nanoparticulele ZnO au provocat o intensificare a activității catalazei, valorile maxime fiind atinse în cazul utilizării nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 30 nm, care în concentrație de 1 mg/L intensifică cu 6% activitatea catalazei față de cea apreciată în martor. Pentru nanoparticulele cu dimensiunile de 10 nm, activitatea catalazei înregistrată în variantele experimentale este mai joasă cu până la 27,1% față de cea a martorului (Figura 3.10). Fluctuațiile activității catalazei explică devieri de la starea normală a celulei, concretizate în producția de peroxizi și radicali liberi, care pot afecta componentele celulare.

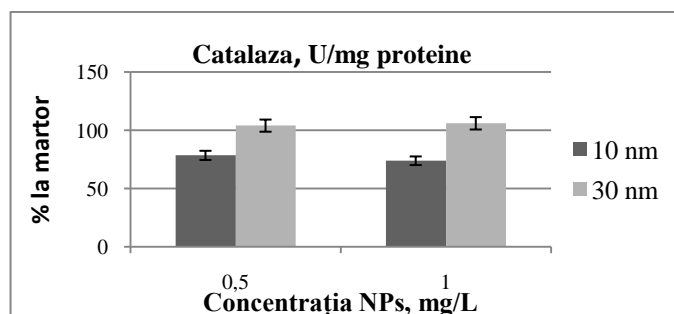


Fig. 3.10. Activitatea catalazei a *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni.

Generalizând rezultatele obținute în acest studiu putem deduce, că parametrii bioproductivi ai tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO, se modifică în funcție de dimensiunile utilizate. Rezultatele obținute la stabilirea caracterului acțiunii nanoparticulelor ZnO asupra proceselor biosintetice la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pot servi ca suport pentru cercetările ulterioare efectuate în scopul modelării proceselor de biosinteză a principiilor bioactive de către levură în funcție de concentrațiile nanoparticulelor. Rezultatele modeste obținute ne-au sugerat necesitatea continuării cercetărilor în direcția majorării concentrațiilor [14, 254].

3.4. Efectele nanoparticulelor oxidului de zinc asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, în funcție de concentrație

Pentru studiul efectelor în funcție de concentrație în continuare au fost selectate nanoparticule ZnO cu dimensiunile 10 și 30 nm și concentrațiile nanoparticulelor 5, 10 și 15 mg/L adăugate în mediu de cultură YPD. În mod identic subcapitolului 3.3 s-au studiat indicii bioproductivi: procesul de multiplicare, acumularea biomasei celulare, conținutul de proteine, carbohidrați totali, β -glucani, precum și activitatea catalazei.

Multiplicarea culturii s-a determinat după 6, 24 și 48 ore de cultivare în profunzime. Rezultatele demonstrează că sub influența nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 10 nm, în concentrații de 5, 10 și 15 mg/L, nu se produc modificări semnificative în procesul de multiplicare a celulelor comparativ cu proba martor. În variantele experimentale cu utilizarea nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile 30 nm, gradul de multiplicare al culturii de levuri prezintă devieri în raport cu martorul, îndeosebi după 6 ore de cultivare în prezența concentrației de 5 mg/L care amplifică procesul de multiplicare cu 7%. Rezultatele experimentale ale influenței nanoparticulelor ZnO asupra reproducerii celulelor sunt prezentate în Figura 3.11 a, b, c.

Studiul privind conținutul de biomasă uscată obținută după 120 ore de cultivare în profunzime a relevat că nanoparticule ZnO cu dimensiunea 10 nm sunt tolerate de către tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și prezintă o stabilitate relativă comparativ cu proba martor.

Variații ale conținutului de biomasă s-au observat la administrarea a 5, 10 și 15 mg/L a nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 30 nm. În aceste probe cantitatea de biomasă a diminuat cu 3,5-5,8% față de martor (Figura 3.12).

Un indicator important, ce caracterizează desfășurarea proceselor metabolice a culturii de levuri supusă acțiunii diferitor factori de cultivare, sunt proteinele. Analiza comparativă a cantității de proteine acumulate de levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în experiențe arată că nanoparticule ZnO cu dimensiunile 10 nm în concentrații 5-15 mg/L micșorează conținutul

acestora în biomasă cu 10,7-15,4% în comparație cu proba martor (Figura 3.13). Datele cu privire la cantitatea de proteine în biomasa levurii din variantele experimentale cu aplicarea nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de 30 nm demonstrează un efect opus – pozitiv, astfel încât conținutul de proteine în varianta cu concentrația 5 mg/L atinge valori cu 18% mai înalte, decât cantitatea de proteine determinată în martor.

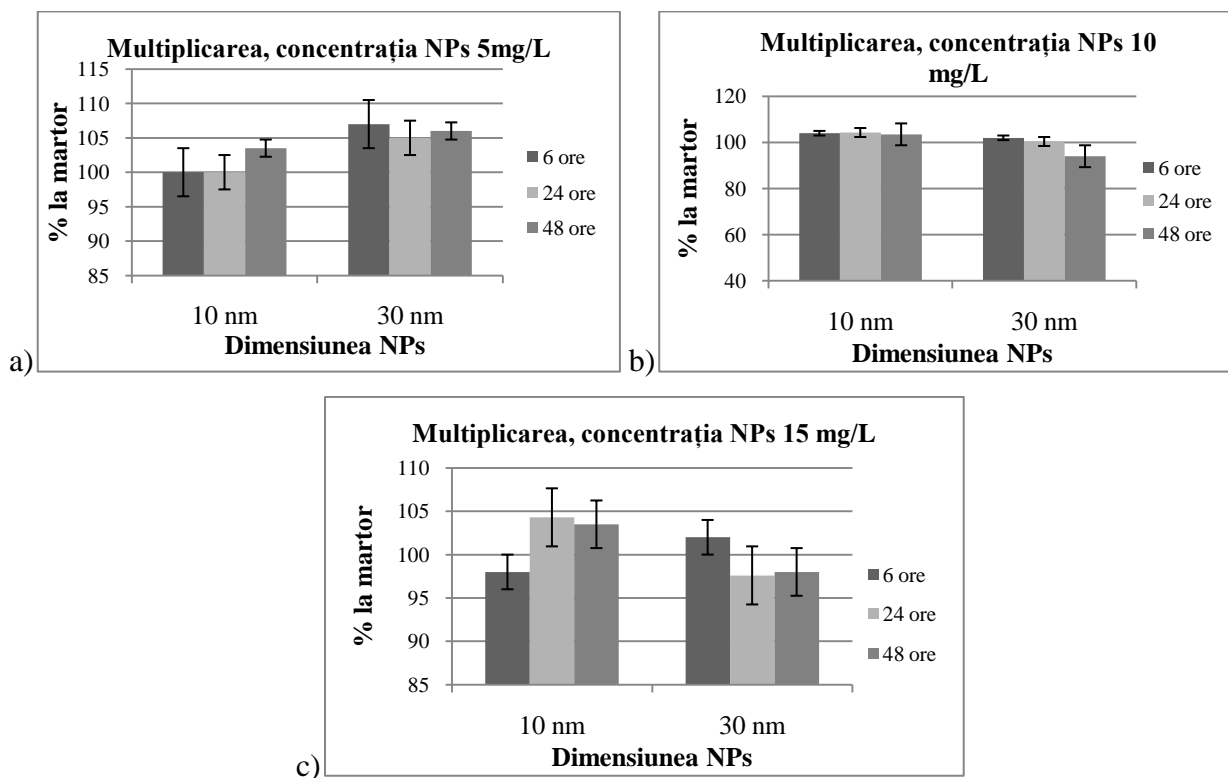


Fig. 3.11. Multiplicarea *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație și durata de contact: a) 5 mg/L; b) 10 mg/L; c) 15 mg/L.

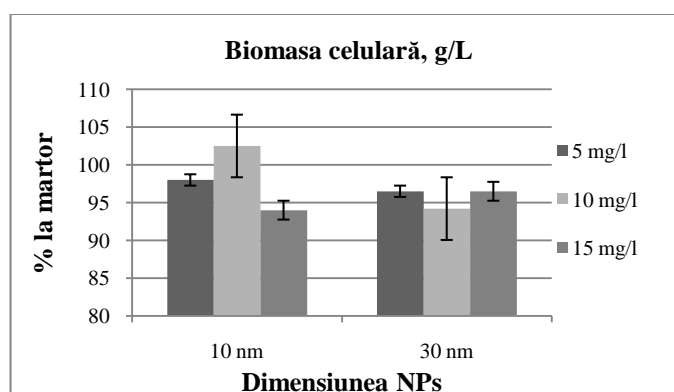


Fig. 3.12. Conținutul de biomasă a *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație.

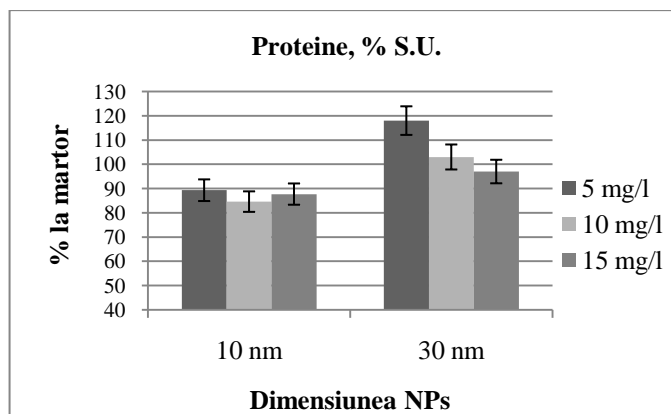


Fig. 3.13. Conținutul de proteine în biomasa *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație.

În continuare, un studiu similar a fost realizat pentru determinarea conținutului de carbohidrați și β -glucani în biomasa levurii la utilizarea nanoparticulelor ZnO. Analiza rezultatelor conținutului de carbohidrați a pus în evidență tendința de creștere a acestui indice în probele experimentale cu aplicarea nanoparticulelor ZnO de 30 nm în concentrațiile de 5, 10 și 15 mg/L. În acest caz, conținutul de carbohidrați totali s-a majorat cu 16-22,3% comparativ cu martorul. În variantele de cultivare a levurii în prezența nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 10 nm, valorile conținutului de carbohidrați totali au fost comparabile cu martorul (Figura 3.14a).

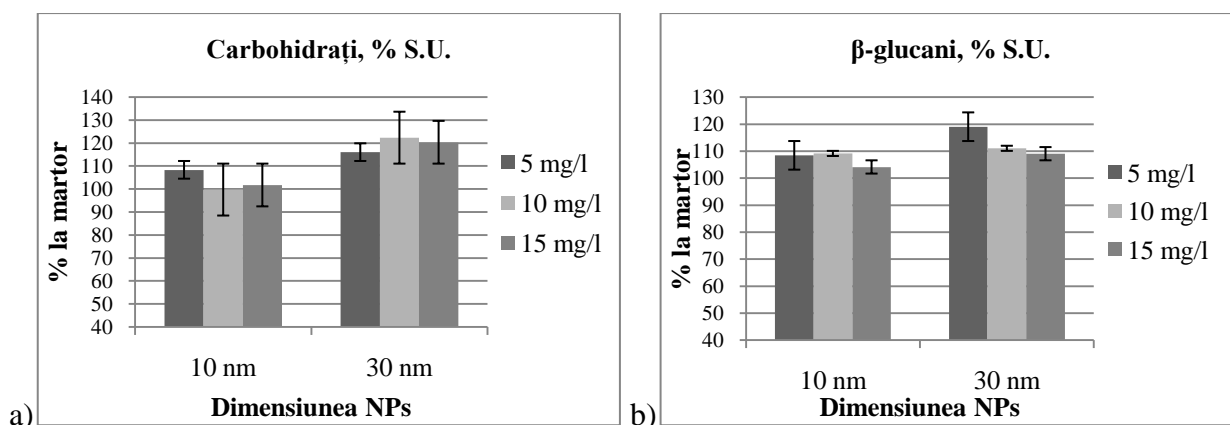


Fig. 3.14. Conținutul de carbohidrați (a) și β -glucani (b) în biomasa *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație.

Rezultate similare s-au înregistrat și în cazul β -glucanilor. Conținutul de β -glucani în biomasa celulară din variantele cu utilizarea nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 30 nm a înregistrat un spor mai mare comparativ cu cel din variantele cu aplicarea nanoparticulelor cu dimensiunile de 10 nm. Creșterea conținutului de β -glucani este specifică tuturor concentrațiilor

nanoparticulelor ZnO, valorile experimentale fiind cu 9-19% mai înalte față de martor (Figura 3.14b). Însă creșterea cantității de β -glucani în biomasă este mai puțin evidentă odată cu majorarea concentrației nanoparticulelor.

Nanoparticulele ZnO în dependență de concentrație aplicată au provocat o majorare evidentă a activității catalazei, valorile maxime fiind atinse în cazul utilizării nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 30 nm, care în concentrație de 5 mg/L asigură intensificarea cu 13% a activității catalazei față de cea apreciată în martor. Pentru nanoparticulele cu dimensiunile de 10 nm, activitatea catalazei înregistrată în variantele experimentale este mai joasă cu până la 38,6% față de cea a martorului (Figura 3.15).

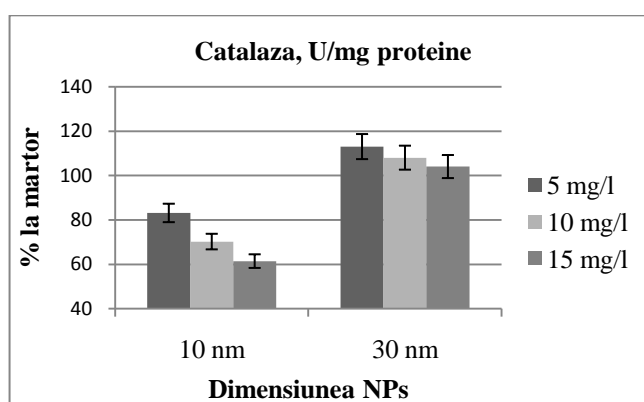


Fig. 3.15. Activitatea catalazei a *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație.

Generalizând rezultatele acestui studiu putem concludiona că gradul de acțiune a nanoparticulelor asupra dezvoltării tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 este determinat de dimensiunile, concentrațiile și durata de contact. Nanoparticulele ZnO cu dimensiunile de 30 nm, în concentrație de 5 și 10 mg/L, asigură sporirea moderată a cantității de carbohidrați, β -glucani, proteine în biomasă levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, dar inițiază o micșorare relativă a conținutului de biomasă celulară. Pentru sporirea randamentului procedeelor de cultivare dirijată a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și obținerea β -glucanilor se recomandă nanoparticulele ZnO cu dimensiunile de 30 nm în concentrație de 5-10 mg/L [14].

3.5. Efectele nanoparticulelor oxidului de zinc în combinație cu alcoolul etilic asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituente celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20

Deoarece levurile își pot modifica indicii de productivitate și caracterele morfo-culturale ca răspuns la schimbarea condițiilor fizico-chimice de cultivare, iar pe durata dezvoltării

saharomicetelor în mediul nutritiv se acumulează anumite cantități de alcool etilic, scopul cercetărilor expuse mai jos a constat în aprecierea gradului de influență a nanoparticulelor oxidului de zinc (30 nm) asupra morfologiei celulelor, reproducerii, productivității și indicilor biosintetici ai *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în prezența alcoolului etilic în mediul nutritiv în concentrație de 2, 5 și 10%.

Inițial a fost cercetată morfologia celulelor levuriene cultivate pe mediul YPD suplinit cu alcool etilic. Observațiile microscopice denotă prezența unor modificări nesemnificative ale morfologiei celulelor levurii la cultivare în prezența alcoolului. De regulă, celulele sunt ovale sau rotunde, cu înmugurire polară, ce formează asce din celula diploidă cu ascospori neeliberați, rotunzi sau ovali. Dimensiunile celulelor în proba martor și în cea experimentală cu 2% alcool variază în diapazonul 5-10 μm (Figura 3.16 a, b). În variantele experimentale, sub influența alcoolului în volum de 5% majoritatea celulelor au dimensiuni mai mici (Figura 3.16 c). În cazul cultivării levurii pe mediu YPD cu 10% alcool, se întâlnesc atât celule cu dimensiuni mai mici față de martor, cât și celule cu dimensiuni mai mari de 10 μm (Figura 3.16 d).

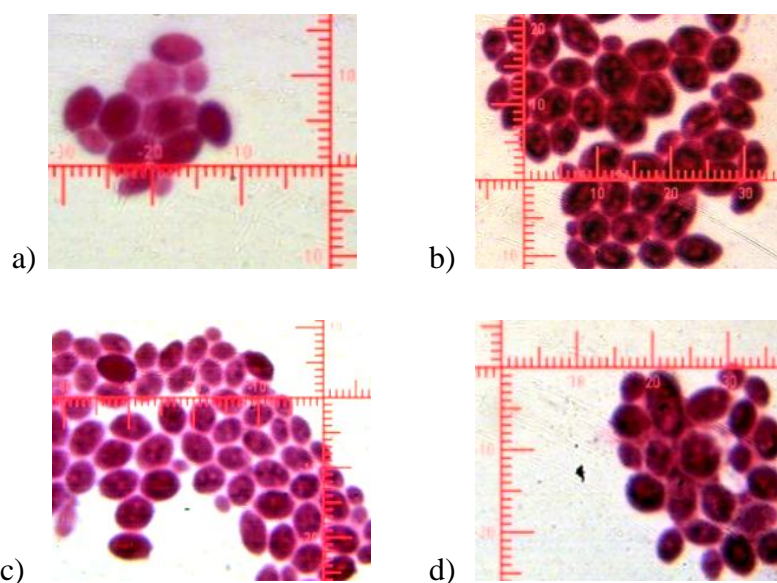


Fig. 3.16. Aspectul celulelor levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare pe mediul YPD în prezența diferitor concentrații de alcool (puterea de mărire 1600).

Legenda: a - martor, b - 2% alcool, c - 5% alcool, d - 10% alcool.

Ulterior, s-a cercetat acțiunea diferitor concentrații de alcool asupra multiplicării celulelor. Monitorizarea reproducerii celulelor în variantele martor și experimentale a demonstrat pericolul evident al alcoolului inclus în mediul de cultură YPD în concentrație de 10%. Multiplicarea celulelor s-a redus de 2 ori comparativ cu proba martor (Figura 3.17).

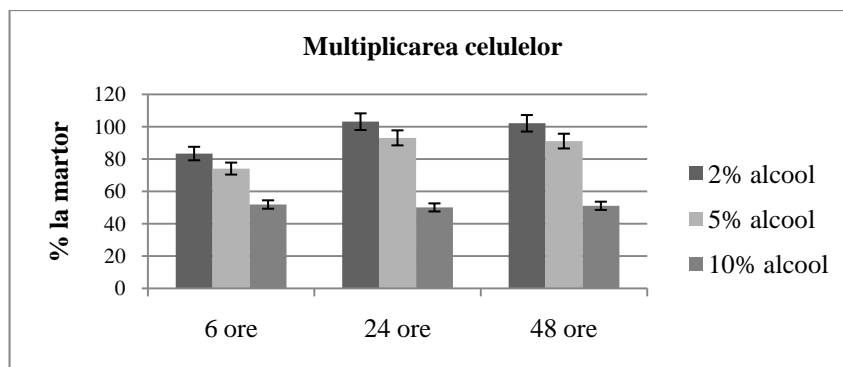


Fig. 3.17. Multiplicarea celulelor levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare pe mediul YPD în prezența alcoolului etilic.

Efectul inhibitor al alcoolului, utilizat în concentrație de 10% în mediul de cultivare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, s-a observat și în cazul acumulării biomasei celulare, după 120 ore de cultivare în profunzime. Din datele Figurii 3.18 concluzionăm că sub influența alcoolului are loc o micșorare evidentă (cu 71%) comparativ cu proba martor a conținutului de biomasă obținută la 1L mediu de cultură. Totodată, concentrația de 2% de alcool, induce activizarea procesului de multiplicare a celulelor (Figura 3.17) și a cantității de biomasă (Figura 3.18). Rezultatele cercetărilor influenței alcoolului în concentrații de 2, 5, 10% asupra componentelor celulare a levurii au demonstrat efecte diferite.

Alcoolul administrat în concentrațiile testate manifestă efecte pozitive asupra biosintezei β -glucanilor, conținutul cărora este superior martorului cu 10-13% (Figura 3.18), însă conținutul de proteine la cultura de levuri, la concentrațiile de 2, 5 și 10% alcool, se micșorează cu 10-15%. Efectul negativ al prezenței alcoolului este confirmat și de activitatea catalazei. În condițiile când conținutul de alcool în mediul de cultură atinge valori de 10%, are loc o activizare a catalazei, ceea ce indică asupra toxicității alcoolului pentru tulpina studiată (Figura 3.18).

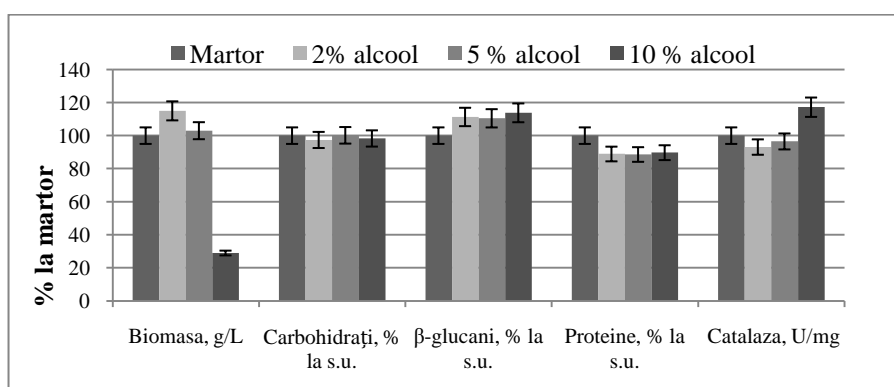


Fig. 3.18. Modificarea productivității și conținutului de principii bioactive la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 sub influența alcoolului, % la martor.

Prin urmare, datele obținute confirmă faptul că alcoolul etilic influențează asupra celulelor levuriene, induce schimbări în procesele vitale, iar în concentrații înalte provoacă apariția stresului alcoolic, care duce la degradarea membranelor celulare și moartea celulelor. În acest context prezintă interes cercetările ce țin de posibilitatea diminuării efectului negativ al alcoolului prin utilizarea nanoparticulelor oxidului de zinc.

Conform unor lucrări științifice publicate în revistele de specialitate, nanoparticulele, datorită dimensiunilor mici (1-100 nm) și proprietăților fizice și chimice unice, ar putea provoca modificări substanțiale în diferite sisteme biologice. Astfel, s-a stabilit că nanoparticulele ZnO pot stimula activitatea enzimatică a levurii *S. cerevisiae* [59]. Autorii menționează că nanoparticulele ZnO cu toate că au inhibat creșterea celulară, totuși au neutralizat efectul negativ al alcoolului asupra activității β -glucozidazei, sporind cantitatea de enzime produsă de către levuri. Aceste rezultate oferă perspective noi privind aplicarea nanoparticulelor ZnO pentru a spori producerea β -glucozidazei, care este o enzimă industrială importantă.

În scopul obținerii unei informații mai ample despre influența nanoparticulelor oxidului de zinc asupra tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, în condiții de stres alcoolic, s-au monitorizat modificările care se produc în morfologia celulelor, precum și în procesul de multiplicare și producția de biomasă celulară. Datele obținute în investigațiile realizate au demonstrat modificări ale dimensiunilor celulelor în variantele experimentale, sub influența diferitor concentrații de nanoparticule incluse atât în mediul YPD cu 2% alcool, cât și în cel suplimentat cu 5% alcool (Figura 3.19 și 3.20). Observațiile microscopice sugerează că în celulă au loc modificări esențiale ale proceselor metabolice, iar schimbarea morfologiei celulelor ovale în forme rotunde și transparente se datorează probabil fenomenului de apoptoză indusă [11].

În continuare, s-au efectuat cercetări de evidențiere a particularităților de acțiune a nanoparticulelor ZnO (30 nm) în combinație cu diferite concentrații de alcool etilic asupra multiplicării celulelor. Rezultatele experimentale ale influenței nanoparticulelor ZnO utilizate în concentrații de la 5 mg/L până la 15 mg/L în combinație cu alcoolul în concentrație de 2% și 5% asupra reproducerii celulelor sunt prezentate în Figura 3.21.

Analiza datelor obținute prin prisma efectului de acțiune a nanoparticulelor oxidului de zinc în combinație cu diferite concentrații de alcool etilic asupra reproducerii celulelor levurii, a demonstrat faptul că pe durata a 48 ore de cultivare se semnalează o reducere a capacităților de multiplicare a celulelor, efect mai pronunțat observându-se după 6 ore. Rata de multiplicare a celulelor în perioada menționată scade cu 20-40% la sută și este specifică atât pentru combinația

2% alcool și nanoparticule în concentrațiile de 5, 10 și 15 mg/L, atât și pentru combinația 5% alcool și nanoparticule în concentrațiile de 5, 10 și 15 mg/L (Figura 3.21a, b).

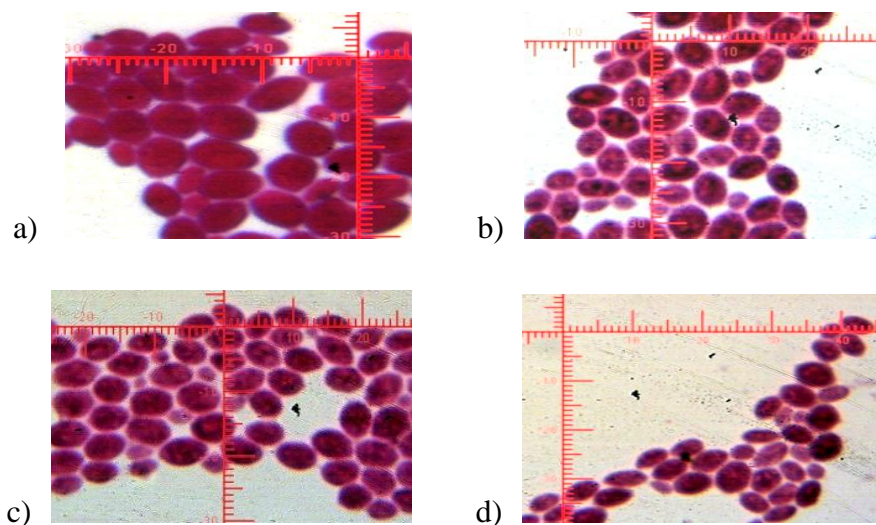


Fig. 3.19. Efectele nanoparticulelor ZnO (30 nm) asupra morfologiei celulelor levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare pe mediul YPD cu 2% alcool (puterea de mărire 1600).
Legenda: a - măsurător, b - 2% alcool+5 mg/L NPs ZnO, c - 2% alcool+10 mg/L NPs ZnO, d - 2% alcool+15 mg/L NPs ZnO.

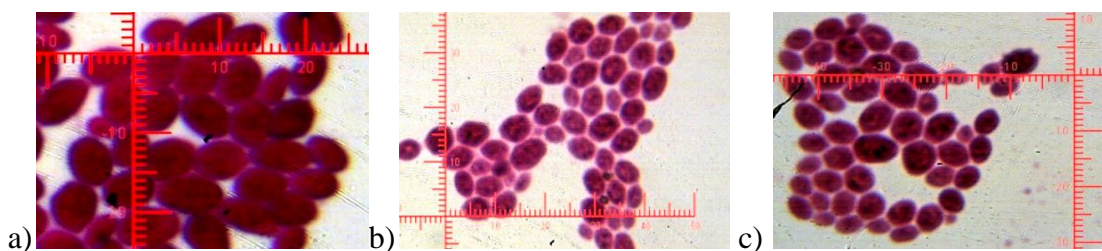


Fig. 3.20. Efectele nanoparticulelor ZnO (30 nm) asupra morfologiei celulelor levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare pe mediul YPD cu 5% alcool (puterea de mărire 640).
Legenda: a - măsurător, b - 5% alcool+5 mg/L NPs ZnO, c - 5% alcool+10 mg/L NPs ZnO.

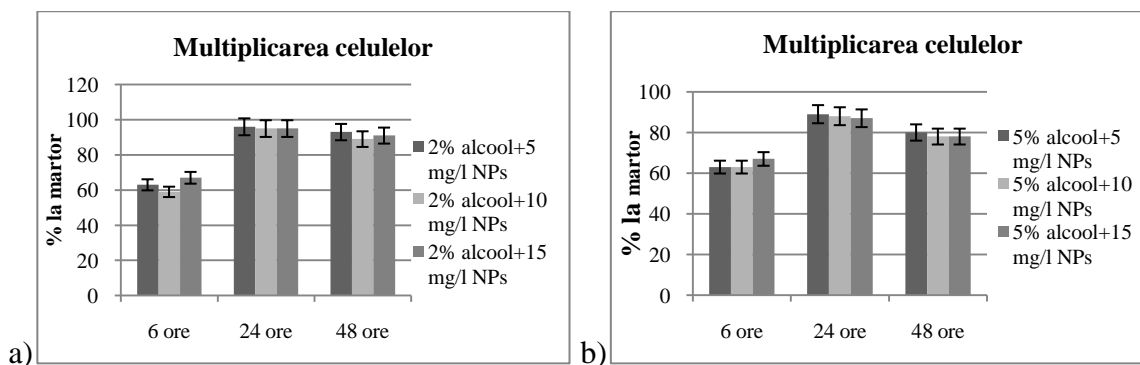


Fig. 3.21. Efectele nanoparticulelor ZnO (30 nm) asupra ratei de multiplicare a celulelor levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare pe mediul YPD suplinit cu alcool etilic: a - 2%, b - 5%.

Efect similar se observă și în cazul producției de biomasă celulară. Din datele obținute în experiențe, la cultivarea în profunzime timp de 120 ore, se observă că administrarea a 2% alcool și nanoparticulelor ZnO în concentrație de 5, 10 și 15 mg/L, spre deosebire de martor a condiționat schimbări în cantitatea de biomasă acumulată, cu precădere, în variantele care conțineau 5% alcool și 10, 15 mg/L nanoparticule ZnO, în care biomasa uscată s-a redus cu 13-18% (Figura 3.22).

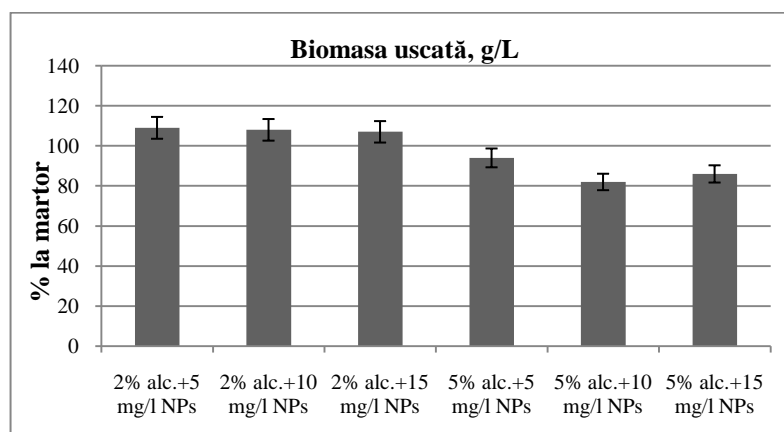


Fig. 3.22. Efectele nanoparticulelor ZnO (30 nm) asupra producției de biomasă *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare pe mediul YPD în condiții de stres alcoolic.

Determinarea cantitativă a proteinelor în biomasa levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 scoate în evidență faptul că nanoparticulele ZnO, aplicate în combinație cu 2% alcool etilic, nu modifică semnificativ conținutul acestora. Nivelul de proteine în variantele experimentale este cu 4-7% sub nivelurile depistate în variantele martor (Figura 3.23). Totodată, rezultatele influenței nanoparticulelor ZnO administrate în prezența concentrației mai mare de alcool din mediul nutritiv (5%) indică un trend de acțiune diferit celui descris pentru varianta cu 2% alcool și nanoparticule ZnO în concentrații 5, 10, 15 mg/L. Nivelul de proteine în variantele experimentale 5% alcool și nanoparticule ZnO crește nesemnificativ, cu 4-5% față de conținutul de proteine depistat în variantele martor (Figura 3.23). Astfel, analiza comparativă a rezultatelor experimentale privind conținutul de proteine în biomasa levuriană la cultivare numai în prezența alcoolului și la cultivare pe mediu suplinit cu alcool și nanoparticule ZnO (30 nm) în diferite concentrații, putem concluziona că nanoparticulele ZnO, într-o măsură ori alta înlătură efectele negative ale alcoolului asupra proceselor de biosinteză a proteinelor. Acțiunea nanoparticulelor în cazul dat, poate fi explicată, probabil, prin includerea ionilor de zinc în procesele biosintetice și de regenerare a peretelui celular, prin intermediul enzimelor care mediază aceste procese.

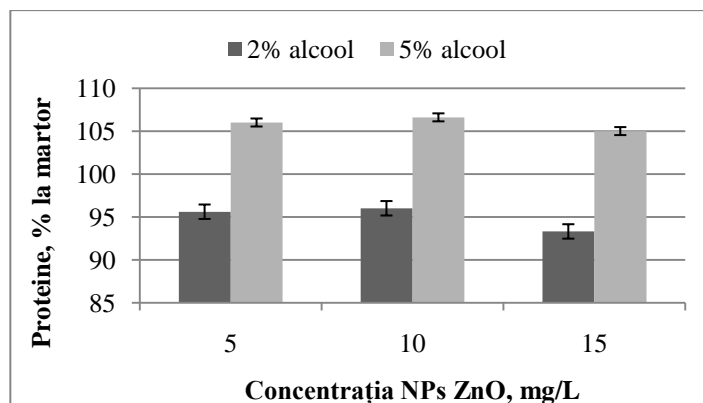


Fig. 3.23. Efectele nanoparticulelor ZnO (30 nm) în combinație cu alcoolul etilic asupra conținutului de proteine la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

În ceea ce privește cantitățile de carbohidrați și β -glucani în biomasa levurii, observăm că combinația alcool și nanoparticulele ZnO provoacă activizarea procesului de biosinteză. Rezultatele obținute indică efectul cumulativ pozitiv al acestor doi factori de cultivare. Conținutul carbohidraților și β -glucanilor crește în funcție de concentrații cu 10,7-16,6% și 12,1-19,9% respectiv, comparativ cu variantele martor (Figura 3.24 a, b). Un efect stimulator maximal pentru conținutul de β -glucani se observă la utilizarea combinației 2% alcool și 5 mg/L nanoparticule ZnO (30 nm).

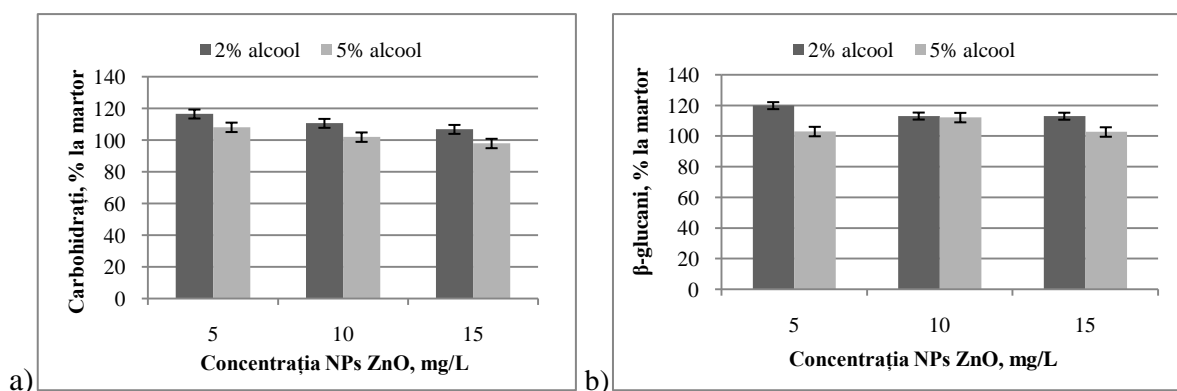


Fig. 3.24. Efectele nanoparticulelor ZnO (30 nm) în combinație cu alcool asupra conținutului de carbohidrați (a) și β -glucani (b) la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

În așa mod, datele obținute au confirmat că nanoparticulele ZnO nu pot înlătura efectul negativ al concentrațiilor înalte de alcool etilic asupra multiplicării celulelor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și producției de biomasă, în același timp influențează pozitiv procesul de biosinteză a proteinelor. Aplicarea nanoparticulelor ZnO (30 nm) în procesul de cultivare a

levurii, poate fi precăutată ca un factor eficient de sporire a producției de β -glucani sub aspect industrial.

În termeni de toxicitate, o importanță mare o au valorile activității enzimelor antioxidante. Rezultatele activității catalazei în variantele cu aplicarea diferitor concentrații de nanoparticule ZnO în combinație cu alcoolul sunt similare cu rezultatele obținute de noi la determinarea efectelor nanoparticulelor asupra componentelor biochimice determinate în biomasa levurii. Activitatea catalazei variază nesemnificativ în funcție de concentrațiile de nanoparticule utilizate la cultivarea tulpinii de levuri. Dacă o să operăm cu cifre absolute, atunci, la concentrația cea mai mare 15 mg/L a nanoparticulelor, semnalăm o sporire a activității catalazei cu 10-16% comparativ cu martorul, ceea ce ne indică că celula levuriană neutralizează efectul compusului în măsura necesară (Figura 3.25).

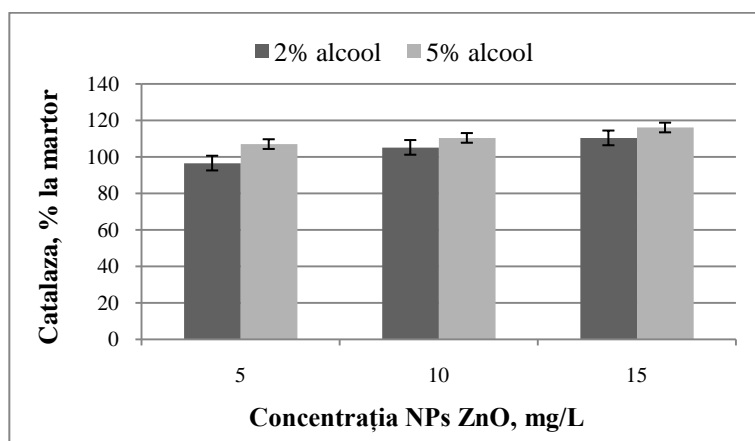


Fig. 3.25. Activitatea catalazei în biomasa *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO (30nm) în combinație cu alcool.

Ținând cont de faptul că administrarea nanoparticulelor ZnO în mediul nutritiv suplinit cu alcool etilic stimulează conținutul de β -glucani la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, s-a recurs la analiza comparativă a ratelor de creștere specifice biomasei celulare și conținutului de β -glucani. Rezultatele au arătat că rata specifică de creștere a levurii este cea mai mare (de 6,02-6,16 g/L biomasă uscată), la cultivarea în prezența nanoparticulelor oxidului de zinc, comparativ cu alte variante experimentale, iar cea mai mică rată de creștere (1,55 g/L biomasă uscată) s-a observat la cultivarea levurii pe mediul YPD cu 10% alcool (Tabelul 3.1). În cazul acumulării β -glucanilor, cele mai înalte valori (21,25-22,55% la S.U.) s-au observat în mediul nutritiv suplimentat cu alcool în concentrație de 2% și nanoparticule ZnO.

Tabelul 3.1. Cantitatea de biomasă și conținutul de β -glucani la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare pe mediul YPD în prezența nanoparticulelor ZnO (30 nm) și alcoolului etilic

Concentrația de etanol (% , v/v)	Concentrația NPs ZnO (mg/L)	Cantitatea de biomasă uscată		Conținutul de β -glucani			
		g/L	% la martor	% la S.U.	% la martor	g/L	% la martor
0	0	5,37±0,45	100	18,8±1,4	100	1,01	100
2	0	6,06±1,3	113	20,01±3,4	106,4	1,21	119,8
5	0	5,52±0,9	103	20,86±5,5	110,9	1,15	113,8
10	0	1,55±0,3	29	21,0±1,6	111,7	0,32	31,7
0	5	6,02±0,08	112	20,52±1,0	109,1	1,23	121,7
0	10	6,16±0,28	115	19,14±0,17	101,8	1,18	116,8
0	15	6,02±0,18	112	18,78±109	99,9	1,13	111,0
2	5	5,88±1,2	109	22,55±1,9	119,9	1,32	130,7
2	10	5,81±1,5	108	21,28±1,9	113,1	1,24	122,7
2	15	5,74±1,3	107	21,25±2,4	113	1,21	119,8
5	5	5,08±2,4	95	19,5±1,9	103,7	0,99	98,0
5	10	4,4±2,1	82	21,08±2,5	112,1	0,92	91,1
5	15	4,65±2,3	86	19,32±2,3	102,7	0,89	88,1

Valorile indicate de către martor în experiențele efectuate fiind de 18,8% la S.U. β -glucani. Nivelul producției de β -glucani în variantele experimentale a variat de la 0,32 g/L până la 1,32 g/L, maximele fiind specifice prezenței în mediul nutritiv a 2% alcool și 5 mg/L nanoparticule ZnO [88].

3.6. Procedeu de cultivare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 cu utilizarea nanoparticulelor oxidului de zinc

Analizând rezultatele experiențelor efectuate putem recomanda un procedeu nou de sinteză orientată a β -glucanilor, care constă în adăugarea la mediul de nutriție YPD a 5 mg/L nanoparticulelor ZnO în combinație cu alcoolul etilic în volum de 2%. Aplicarea procedurii permite de a obține 1,32 g/L β -glucani, ceea ce constituie cu 30,7% mai mult față de martor.

Procedeu elaborat constă în prepararea mediului nutritiv YPD cu următoarea componență, g/L: peptonă - 20,0; glucoză - 20,0; extract de levuri -10,0. pH-ul mediului se ajustează la valori

între 5,5-6,6. La acest mediu se adaugă suplimentar o cantitate de 5 mg/L nanoparticule ZnO, stabilizate în poli(N-vinilpirolidon), cu dimensiuni de 30 nm și 2% alcool (v/v). În mediul preparat se introduce inoculul (cultură de levuri cu vârsta de 24 ore) în volum de 5%, (2×10^6 celule/ml), necesare pentru a asigura etapele de dezvoltare a culturii. Cultivarea se efectuează la temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, aerare continuă (81,3...83,3 mg/L oxigen solvit), durata de cultivare submersă 120 ore. Din biomasa colectată prin centrifugare la 3000 rot/min timp de 15 minute, se extrag β -glucanii [88].

3.7. Concluzii la capitolul 3

1. Nanoparticulele TiO_2 cu dimensiuni de 30 nm nu modifică semnificativ procesul de reproducere a celulelor, producția de biomasă, conținutul de carbohidrați la levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. În concentrații de 10,0-15,0 mg/L stimulează biosinteza β -glucanilor cu 7,2-19,8% comparativ cu proba martor [254].
2. Parametrii bioproductivi ai tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO se modifică în funcție de dimensiuni și concentrație. Cantitatea de β -glucani în biomasa celulară din variantele cu utilizarea nanoparticulelor cu dimensiuni de 30 nm înregistrează un spor mai mare comparativ cu cel din variantele cu dimensiuni a nanoparticulelor de 10 nm. Pentru concentrațiile mai mari de nanoparticule ZnO se atestă cantități mai mici de β -glucani. Pentru sporirea randamentului de producere a β -glucanilor se recomandă utilizarea nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de 30 nm în concentrație de 5-10 mg/L [14, 254].
3. Nanoparticulele ZnO (30 nm) nu pot înlătura efectul negativ al concentrațiilor înalte (10%) de alcool etilic asupra multiplicării celulelor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și producției de biomasă, dar sunt eficiente pentru procesul de biosinteză a β -glucanilor, care se amplifică în cazul prezenței în mediul nutritiv a 2% alcool și 5 mg/L nanoparticule ZnO. Nivelul producției de β -glucani crește cu 30,7% [11, 88].

4. ELABORAREA TEHNOLOGIEI DE CULTIVARE A TULPINII *S. CEREVISIAE* CNMN-Y-20 ȘI DE OBTINERE A β -GLUCANILOR

Levurile genului *Saccharomyces* au o istorie lungă de utilizare în diferite ramuri ale economiei. Datorită eficacității în producerea diferitor produse, *S. cerevisiae* fără dubii este cel mai solicitat microorganism biotehnologic. Folosit la producerea pâinii, berii și vinurilor, cel mai vechi utilizat de om microorganism, a stat și la baza primelor procese biotehnologice din lume. În același timp levurile reprezintă un obiect biotehnologic de mare perspectivă, care grație compoziției sale biochimice complexe, sunt considerate ca sursă valoroasă atât de nutrienți cu valoare energetică și nutrițională ridicată, cât și de substanțe biologice active cu spectru larg de aplicare. În acest context interes sporit prezintă levurile ca producători de polizaharide, în particular β -glucani.

Astfel, cu dezvoltarea metodelor noi ale microbiologiei contemporane *S. cerevisiae* din nou se află în prim planul perfecționărilor în biotehnologie.

4.1. Materiale și metode de cercetare

În vederea realizării scopului acestui capitol, tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 a fost cultivată pe mediile nutritive:

YPD: 1% extract de drojdie, 2% peptonă, 2% glucoză, apă potabilă 1L, pH-5,5 [48].

Must de bere: 6 Bl, agar - 2% [2].

Cultivarea submersă 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°C, gradul de aerare – 81,3...83,3 mg/L, durata de cultivare submersă – 120 ore. Mediul lichid de fermentare s-a înșămânțat în volum de 5% cu inocul 2×10^6 celule/ml.

Metode de preparare a inoculului, determinare numărului de celule dezvoltate pe mediul lichid, viabilitatea celulelor, examinarea formei și dimensiunii celulelor, determinarea biomasei levurii, substanței uscate a biomasei, conținutului de carbohidrați totali, conținutului de β -glucani, proteine, activității catalazei s-au efectuat în conformitate cu metodele descrise în capitolul 2 și 3.

Undele milimetrice cu frecvență extra înaltă. Ca generator de unde milimetrice a fost utilizat dispozitivul KBЧ-НД, RS-232, cu lungimile de undă $\lambda=4,9; 5,6; 7,1$ mm, ceea ce corespunde frecvențelor $f=60,12$ GHz; 53,33 GHz; 42,19 GHz; (maxim 10mW/cm²), oferit cu amabilitate de către colaboratorii Institutului de Inginerie Electronică și Nanotehnologii „D. Ghițu”. Aparatul este certificat și permis spre utilizare în practica medicală. Durata tratării

culturii de levuri a constituit: pentru iradierea ordinară - 5, 10, 15, 20, 25 minute, pentru iradierea dublă – 10, 10+10, 20, 20+20 minute.

Numărul de generații și rata de creștere a levurii s-a determinat conform ecuației

$$n = \log_{10} X - \log_{10} X_0 / 0,301 \quad [16] \quad (4.1)$$

Examinarea coloniilor. Caracterele morfologice coloniale au fost stabilite conform principiilor și tehnicilor de microbiologie generală [26]. Aprecierile macromorfologice s-au efectuat prin însămânțarea culturilor de levuri pe mediul solid must de bere utilizând metoda prin epuizare. Incubarea s-a efectuat la 28°C timp de 5 zile. Aprecierea morfologică a coloniilor s-a realizat prin notarea formei coloniilor, mărimea, profilul, luciul, transparența, culoarea, marginea coloniei, consistența.

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 $r^2 = r^2_{xy}$. *Coeficientul de corelare* a fost calculat conform programului Microsoft Office Excel.

4.2. Acțiunea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra procesului de biosinteză a β -glucanilor

Un interes științific particular prezintă cercetările ce țin de influența diferitor tipuri de unde, în special a celor cu frecvența extra înaltă, asupra creșterii și dezvoltării microorganismelor. Analiza amplă și generalizarea literaturii de specialitate evidențiază perspectiva utilizării undelor milimetrice cu frecvența extra înaltă în calitate de reglatori ai creșterii și stimulatori ai indicilor productivi și biosintetici ai microorganismelor, în particular ai levurilor.

Undele milimetrice influențează dezvoltarea și proliferarea celulelor, activitatea enzimelor, funcționarea membranelor celulare, a diferitor sisteme biologice [250], iar efectul acțiunii lor depinde de frecvență, timpul, puterea iradierii, varietatea obiectului biologic. Interes sporit prezintă cercetările ce țin de evaluarea influenței UMM asupra creșterii, dezvoltării și activității biosintetice a levurilor.

Cele expuse mai sus determină importanța evaluării efectelor undelor milimetrice cu frecvența extra înaltă asupra tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și aprecierea perspectivelor de aplicare ale acestora în biotehnologia cultivării levurilor.

4.2.1. Efectele undelor milimetrice asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituenți celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, în funcție de spectrul de frecvență

Reieșind din faptul confirmat de literatura de specialitate, că undele milimetrice cu frecvență extra înaltă au o influență semnificativă asupra ciclului vital, productivității și activității biosintetice a microorganismelor, în special a levurilor, **scopul** acestui subcapitol constă în evaluarea efectelor undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituente celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Pentru studiul efectelor cauzate de undele milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra levurii, a fost utilizat materialul semincer, obținut prin cultivarea tulpinii levuriene pe must de bere, timp de 24 ore, pe agitator 200 rot/min, la temperatura de 25°C. Inoculul în volum de 5 ml, a fost expus acțiunii undelor milimetrice cu frecvențele $f=60,12$ GHz; 53,33 GHz; 42,19 GHz (respectiv lungimile de undă $\lambda=4,9$; 5,6; 7,1 mm), emise în regim continuu, timp de 10, 20 sau 30 minute.

După expunerea la undele milimetrice cu frecvență extra înaltă, celulele de levuri în volum de 5%, 2×10^6 celule/ml, au fost inoculate pe mediul lichid YPD și crescute în condiții identice cu martorul. Cultivarea s-a realizat în baloane Erlenmeyer, durata de cultivare 120 ore, la temperatura de 25°C.

Inițial ne-am propus ca scop de a determina indicii multiplicării și viabilității celulelor de levuri. Estimarea particularităților multiplicării celulelor cuprinde diverse aspecte ale reacției populației de levuri față de factorii endo- sau exogeni. În studiile de monitoring al efectelor produse de diverși factori, procesele proliferative asigură posibilitatea utilizării diferitor parametri în cadrul elaborării strategiei pentru stabilitatea populației. Indicele multiplicării și al viabilității constituie un criteriu important în aprecierea efectelor negative sau pozitive a factorilor exogeni.

Cercetările au demonstrat că undele milimetrice, aplicate timp de 10 minute, stimulează viabilitatea celulelor în primele 24 ore de cultivare indiferent de frecvența lor, iar după 48 ore efectul stimulat asupra viabilității celulelor (cu 52%) se observă numai la iradierea cu unde de frecvență 42,19 GHz (Figura 4.1a). Rezultate de stimulare semnificativă a viabilității culturii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 (cu 55,8...96,7%) s-au observat și la iradierea cu unde milimetrice cu frecvența 60,12 GHz ($\lambda=4,9$ mm) timp de 20 minute (Figura 4.1b). Prelungirea duratei de iradiere a tulpinii cu unde milimetrice până la 30 minute, stimulează dezvoltarea populației în primele 6 ore de cultivare, însă după 48 ore se constată o micșorare (cu 16...34,5% față de martor) a numărului de celule vii (Figura 4.1c). Din rezultatele obținute reiese că pentru stimularea viabilității tulpinii de levuri se recomandă a fi utilizată iradierea cu unde de frecvența 42,19 GHz timp de 10 minute sau 60,12 GHz timp de 20 minute.

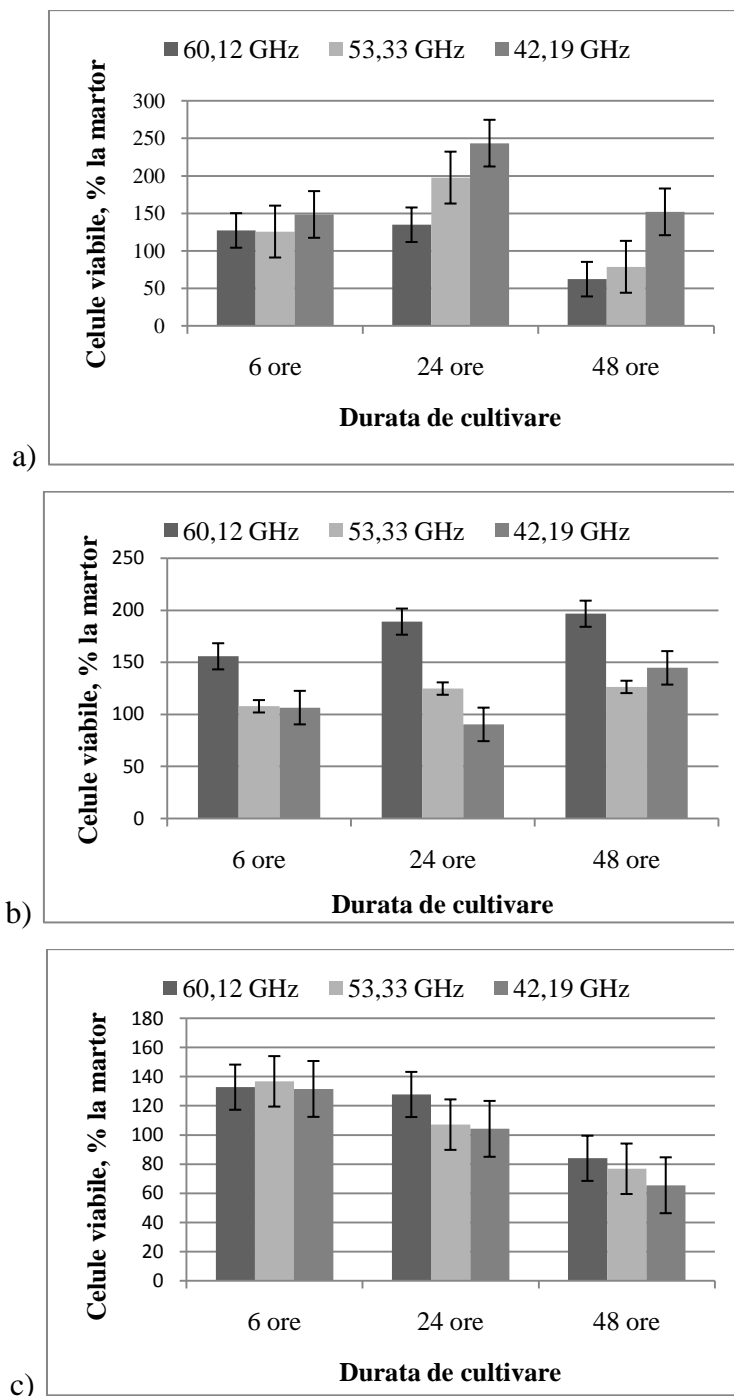


Fig. 4.1. Efectul undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă ($f=60,12$ GHz; $53,33$ GHz; $42,19$ GHz) asupra viabilității celulelor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Legenda: Durata expoziției la unde milimetrice: a) 10 minute; b) 20 minute; c) 30 minute.

Celulele levuriene, sub influența undelor milimetrice, își pot modifica capacitatea de utilizare a surselor nutritive, astfel dinamica procesului de creștere a populației evoluează diferit. Diferențele pot fi estimate comparând curbele de creștere a populației levuriene supusă iradierii cu undele milimetrice și curbelor de creștere a populației neiradiate.

Conform datelor din literatură sensibilitatea celulelor la acțiunea undelor milimetrice este individuală, dar efectul mai evident se observă în faza G1 a ciclului celular de dezvoltare [122]. Studiul efectelor undelor milimetrice asupra celulelor a demonstrat capacitatea tulpinii de a reacționa la undele milimetrice cu frecvență extra înaltă ceea ce confirmă posibilitatea de modificare a stării fiziologice a levurii. Aceste rezultate au o mare importanță pentru tehnologia cultivării levurii.

Cercetările noastre au demonstrat că efectul diferitor frecvențe a undelor milimetrice asupra populației *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 este neunivoc și se exprimă prin stimulare, inhibare sau lipsă de efect asupra potențialului de multiplicare a celulelor (Figura 4.2 a, b, c).

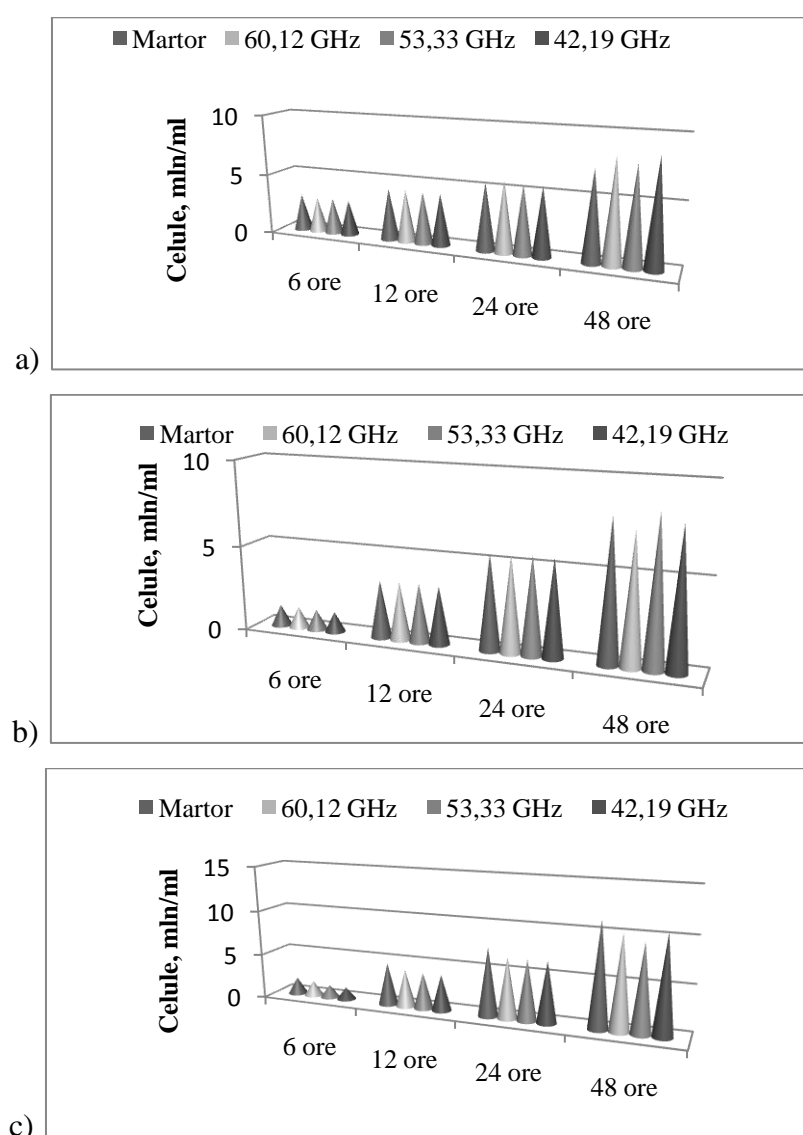


Fig. 4.2. Efectul undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă ($f=60,12$ GHz; $53,33$ GHz; $42,19$ GHz) asupra dinamicii procesului de multiplicare a *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Legenda: Durata expoziției la unde milimetrice: a) 10 minute; b) 20 minute; c) 30 minute.

Astfel, în primele 24 de ore de la momentul iradierii timp de 10 și 20 minute, undele milimetrice nu modifică curba de creștere a levurii indiferent de frecvența lor. Devieri de la martor se observă după 48 ore din momentul iradierii (Figura 4.2a, b).

Relevante sunt variantele experimentale care au fost iradiate cu unde cu frecvențele 60,12 GHz timp de 10 minute (rata de multiplicare a culturii crește cu 14,1%) și frecvența 42,19 GHz (rata de multiplicare crește cu 17,6%). Prelungirea duratei de expoziție a culturii la iradiere cu undele milimetrice până la 30 minute duce la încetinirea vitezei de multiplicare a celulelor, astfel că în toate fazele de dezvoltare numărul de celule este mai mic comparativ cu martorul (Figura 4.2c).

Obiectivul ulterior a constat în examinarea caracterelor morfologice și culturale a celulelor tulpinii expuse la iradiere cu unde milimetrice cu frecvență extra înaltă. Din caracterele morfologice ale celulelor putem menționa, atât pentru martor, cât și pentru tulpina iradiată, celule ovale sau rotunde, cu înmugurire polară, cu dimensiuni de la 3-6 μm (Figura 4.3). Din caracteristicile culturale menționăm stabilitatea tipului de respirație aerobă, formarea ascelor persistente direct din celula diploidă, 4 ascospori neeliberați, rotunzi.

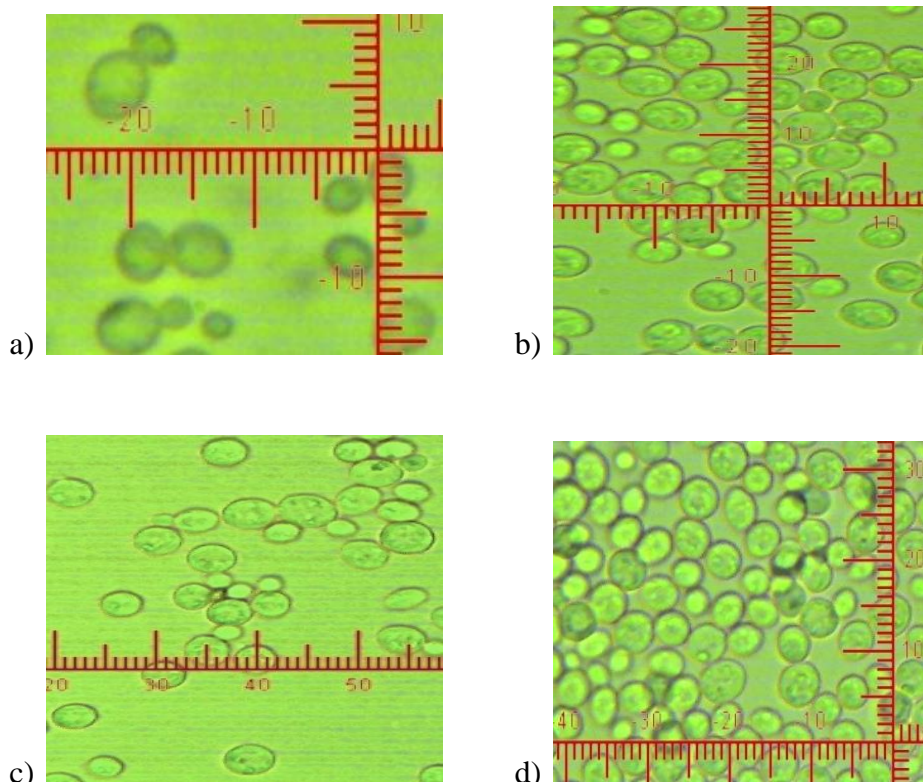


Fig. 4.3. Morfologia celulelor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 expusă acțiunii undelor milimetrice cu frecvențe extra înalte timp de 10 minute (descriere după 48 ore de la incubare): a) martor; b) $f=60,12$ GHz; c) $f=53,33$ GHz; d) $f=42,19$ GHz (puterea de mărire 640).

În vederea evaluării caracterelor morfologice ale coloniilor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, expusă acțiunii undelor milimetrice cu frecvențe extra înalte ($f=60,12$ GHz; $53,33$ GHz; $42,19$ GHz), cultura de levuri din variantele martor și cele iradiate cu unde milimetrice a fost însămânțată pe mediul solid YPD. Cercetările după 6, 24 și 48 ore de la momentul iradierii, au demonstrat că undele milimetrice cu frecvențele examinate, aplicate pe durata a 10, 20 sau 30 minute, nu produc efecte semnificative asupra caracterelor morfologice ale coloniilor tulpinii de levuri. Comun pentru toate variantele experimentale, cultivate după 6, 24 și 48 ore de la momentul iradierii, sunt: formarea coloniilor alb-roz, cu suprafața lucioasă, netedă, bombată, diametrul coloniilor variază de la 4 la 6 mm (Figura 4.4).

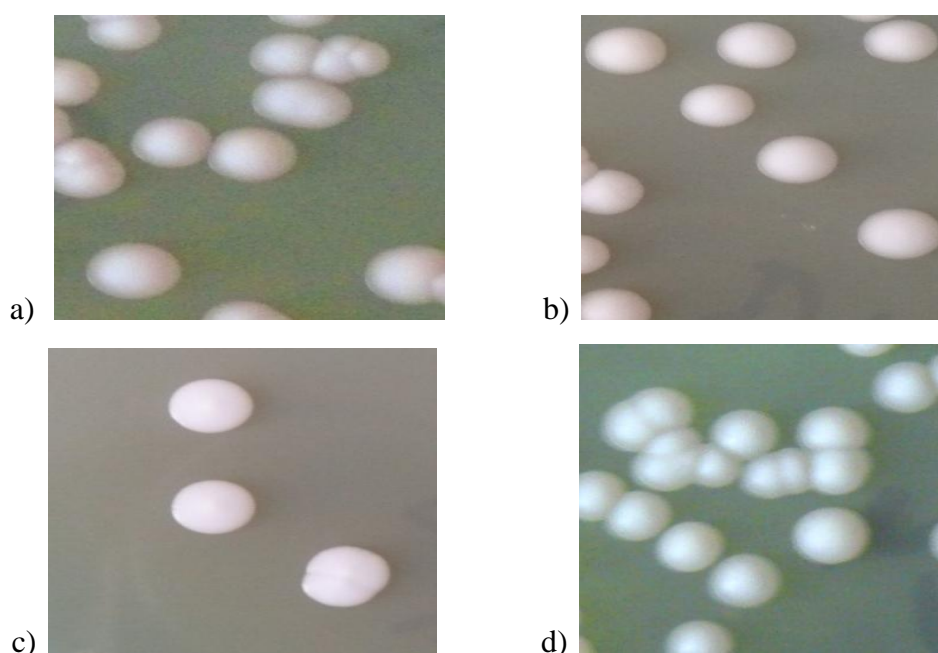


Fig. 4.4. Morfologia coloniilor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 expusă acțiunii undelor milimetrice cu frecvențe extra înalte timp de 10 minute, (descriere după 24 ore de la iradiere). Legenda: a) martor; b) $f= 60,12$ GHz; c) $f= 53,33$ GHz; d) $f= 42,19$ GHz.

Prin urmare, putem menționa că reacția de răspuns a tulpinii de levuri la acțiunea undelor milimetrice este diferită și se manifestă în dependență de frecvențele aplicate. Rezultatele pozitive obținute, exprimate prin stimularea moderată a viabilității și lipsa modificărilor esențiale a caracterelor morfo-culturale, servesc ca bază pentru derularea noilor cercetări teoretice și practice privitor la utilizarea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă în biotehnologia cultivării tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 [10].

Se consideră, că fluctuațiile valorice ale indicelui multiplicării celulelor reflectă direct intensitatea reacțiilor fiziologo-biochimice, dependente la rândul său de viteza reacțiilor

fermentative. Reducerea sau sporirea multiplicării sub acțiunea diferitor factori, denotă caracterul acestora, generat de inhibarea sau stimularea multiplicării celulare. În acest context, în vederea ameliorării calităților de biosinteză, sunt importante cercetările ce țin de particularitățile biosintetice ale levurii supuse iradierii cu unde milimetrice cu frecvență extra înaltă.

Evaluarea caracterului de acțiune al undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă s-a efectuat examinând conținutul de biomasă, carbohidrați totali, β -glucani, proteine, activitatea catalazei la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Analizând producția de biomasă menționăm că undele cu frecvențele examinate, emise timp de 10, 20, 30 minute nu modifică esențial indicii cantitativi. Unele rezultate, obținute în variantele iradiate cu unde cu frecvența $f=60,12$ GHz (lungimea de undă $\lambda=4,9$; expoziție 10 minute) sau cu frecvența $42,19$ GHz (lungimea de undă $\lambda=7,1$; expoziție 30 minute) indică o micșorare ne semnificativă a conținutului de biomasă (Figura 4.5).

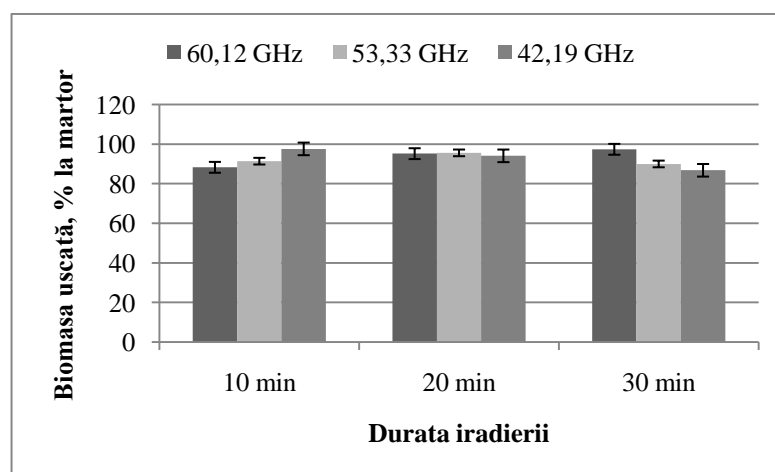


Fig. 4.5. Efectul undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă ($f=60,12$ GHz; $53,33$ GHz; $42,19$ GHz) asupra acumulării biomasei la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Analiza rezultatelor denotă că, după 120 ore de cultivare în profunzime pe mediul YPD, pentru unele componente biochimice cercetate, s-au observat deosebiri veridice între martor și variantele expuse iradierii cu unde milimetrice. Efect de stimulare a conținutului de carbohidrați (cu $16,7\%$ și $43,5\%$) s-a constatat în biomasă levurii iradiată cu unde cu frecvența $f=60,12$ GHz și respectiv $f=53,33$ GHz, durata de iradiere 20 minute. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 4.6 ce caracterizează diferențele între indicii mostrelor experimentale, exprimate în procente față de martor.

Cauza modificărilor în conținutul de carbohidrați, determinat în biomasă levuriană, ar fi că aceștea împreună cu moleculele proteice din membrana celulară, prezintă un factor reglator al

proceselor fiziologo-biochimice. Presupunem, că sub influența undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă, prin intermediul receptorilor proteici se modifică capacitățile biosintetice ale celulelor.

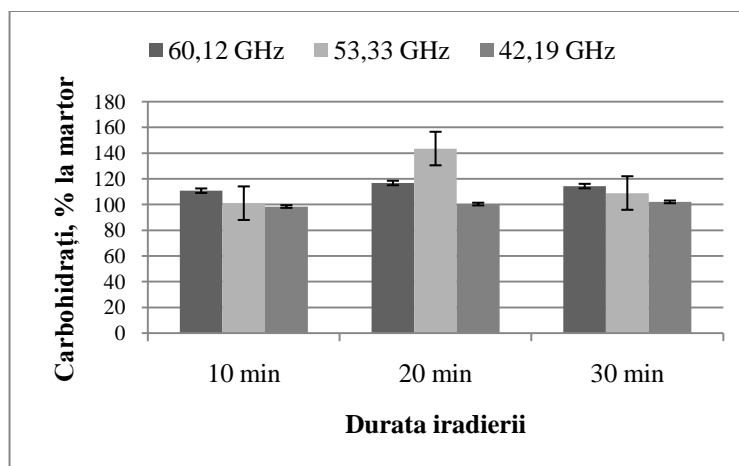


Fig. 4.6. Impactul undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra conținutului de carbohidrați la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Ulterior s-a studiat efectul undelor milimetrice asupra biosintezei altei componente importante a celulei levuriene – β -glucanii.

Datele studiului au demonstrat că utilizarea undelor milimetrice în procesul de cultivare a levurii a contribuit la sporirea conținutului cantitativ al β -glucanilor. Menționăm deosebiri veridice la utilizarea undelor milimetrice cu frecvențele $f=60,12$ GHz și $f=53,33$ GHz ($\lambda=4,9$ și $\lambda=5,6$), durata expunerii 10 și 20 minute. Deviarea procentuală de la indicii martor constituie 17,4% și 25,7% în direcția stimulării conținutului de β -glucani (Figura 4.7).

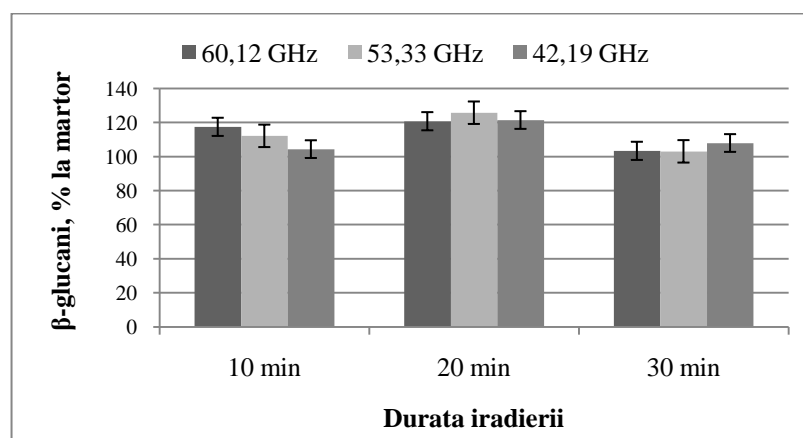


Fig. 4.7. Efectul undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă ($f=60,12$ GHz; $53,33$ GHz; $42,19$ GHz) asupra conținutului de β -glucani la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

S-a constatat că lipsește tendința sigură atât de sporire cât și de micșorare a conținutului de β -glucani în variantele expuse undelor milimetrice timp de 30 minute, caracteristică pentru toate frecvențele utilizate. În viziunea noastră, efectul biologic al undelor milimetrice are un prag temporar, 20 minute, după care expunerea obiectului biologic la iradiere nu conduce la mărirea efectului biologic. Fenomenul dat este confirmat și de alți cercetători, care evidențiază că efectul biologic al undelor milimetrice are un prag de acțiune, după care apare efectul platou [31]

Din cele expuse este evident faptul că creșterea semnificativă a conținutului de carbohidrați și β -glucani se produce la iradierea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 cu unde milimetrice cu frecvențele 60,12 GHz și 53,33 GHz timp de 10-20 minute.

În cadrul cercetărilor complexe ale influenței undelor milimetrice asupra capacităților biosintetice ale levurii au fost efectuate investigații vizând conținutul de proteine și activitatea catalazei. S-a observat că iradierea culturii de levuri pe durata 10 și 20 minute a stimulat sinteza proteinei. În variantele expuse frecvenței $f=42,19$ GHz, conținutul de proteine a sporit cu 41,2...49,9% față de martor (Figura 4.8). Valori înalte a conținutului de proteine au fost înregistrate la iradierea tulpinii și cu unde milimetrice cu frecvența 60,12 GHz timp de 10-20 minute. Valorile conținutului de proteine cresc cu 35,6...41,0% comparativ cu martorul.

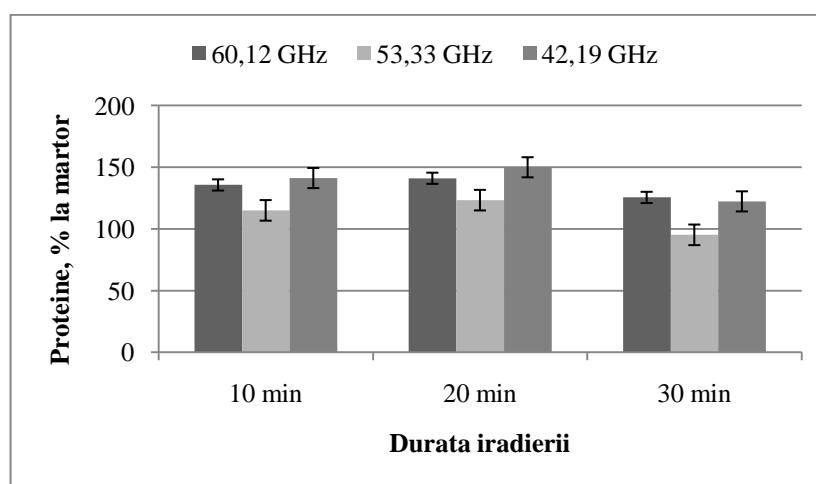


Fig. 4.8. Efectul undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă ($f=60,12$ GHz; 53,33 GHz; 42,19 GHz) asupra conținutului de proteine la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Paralel, a fost efectuat studiul activității catalazei (realizat cu aportul Doamnei dr. în biol. N. Efremova), care este unul din cei mai eficienți catalizatori cunoscuți a reacțiilor esențiale pentru viață. Catalaza reduce nivelul peroxidului de hidrogen pentru a oxida toxine, fenoli sau alcoolii. Studiul efectuat a permis identificarea răspunsului catalazei care este mult mai prompt (cu 34,5...39,4% mai mult față de martor) la stresul cauzat de undele cu frecvența $f=42,19$ GHz,

durata de iradiere până la 30 minute (Figura 4.9). Activitatea înaltă a catalazei înregistrată în toate variantele experimentale, de regulă este caracteristică proceselor ce produc cantități mari de peroxid de hidrogen.

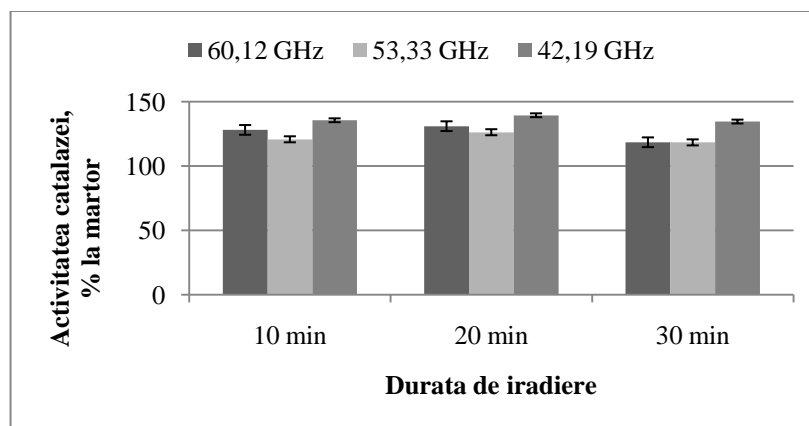


Fig. 4.9. Efectul undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă ($f=60,12$ GHz; $53,33$ GHz; $42,19$ GHz) asupra activității catalazei la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Astfel, rezultatele investigațiilor au evidențiat dependența activității funcționale a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 față de spectrul de frecvență a undelor milimetrice, utilizate în procesul de cultivare a levurii. Undele cu frecvența $f=53,33$ GHz au un efect pronunțat de stimulare a biosintezei carbohidraților totali, inclusiv a β -glucanilor. Rezultatele ne permit să menționăm că undele milimetrice cu frecvența extra înaltă sunt un factor important de modificare a metabolismului celular, iar undele milimetrice cu frecvențele nominalizate pot fi propuse în biotehnologia cultivării levurii în scopul sporirii performanței biosintetice [89].

4.2.2. Efectele undelor milimetrice cu frecvența 53,33 GHz asupra biosintezei β -glucanilor și altor constituente celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, în funcție de durata de iradiere

La inițierea studiului a fost înaintată cerința de a evidenția durata de iradiere optimă în vederea obținerii valorilor maxime de acumulare a β -glucanilor.

Din rezultatele cercetărilor prezentate în Figura 4.10 putem conchide că o cantitate maximală de β -glucani, carbohidrați și biomasă uscată (B.U.) este acumulată la iradierea culturii timp de 20 minute: conținutul de β -glucani - de 18,84-20,0% la B.U., cu 18,5-25,7% mai mult față de martor, conținutul carbohidraților - de 35,94-36,33% din B.U., cu 19,6-20,8% mai mult comparativ cu martorul neiradiat; conținutul de biomasă – de 4,85-4,98 g/L, ceea ce depășește martorul cu 14,1-17,2%.

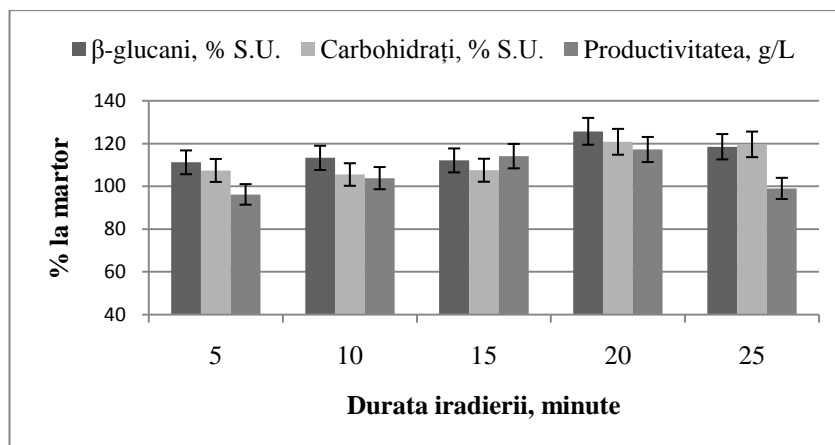


Fig. 4.10. Efectul undelor milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra conținutului de β-glucani, carbohidrați și cantității de biomasă la tulpina *S. cerevisiae* CNMNY-20 în funcție de durata iradierii.

Prin aplicarea analizei statistice, au fost determinate ecuațiile liniilor de regresie, precum și coeficienții de determinare R^2 , ce descriu relația dintre două valori variabile, în cazul nostru relația dintre valorile cantitative ale biomasei și cele ale componentelor peretelui celular la iradierea culturii cu unde milimetrice emise timp de 5, 10, 15, 20, 25 minute (Figura 4.11, 4.12, 4.13).

Calculul coeficientului de determinare pentru două variabile - biomasă și β-glucani, caracteristice levurilor supuse iradierii cu unde milimetrice, a relevat o asociere puternică, pozitivă. Coeficientul de determinare $R^2=0,718$ sau 71,8% din variația valorilor acumulării biomasei este însoțită de variația valorilor celeilalte variabile – a β-glucanilor (Figura 4.11).

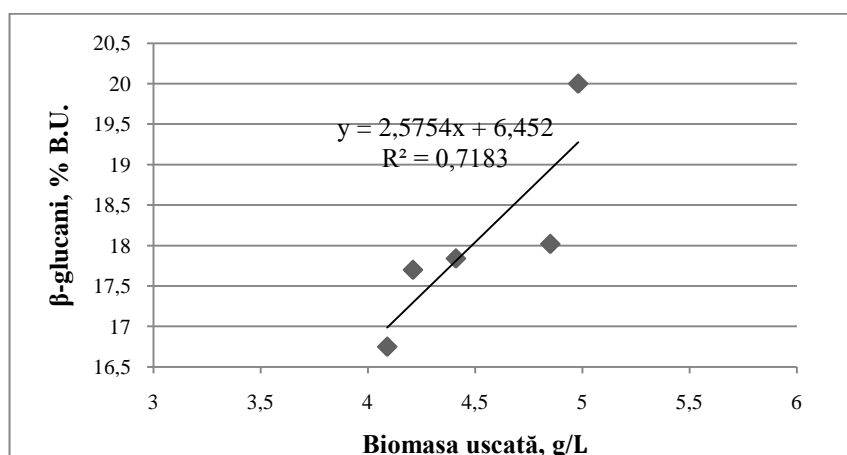


Fig. 4.11. Interdependența acumulării biomasei și β-glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, iradiată cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz.

Calculul coeficientului $R^2=0,949$, interpretat procentual, pentru variabilele – biomasă și carbohidrați, ar însemna că 94,9% din varianta biomasei este însoțită de varianța acumulării carbohidraților (Figura 4.12).

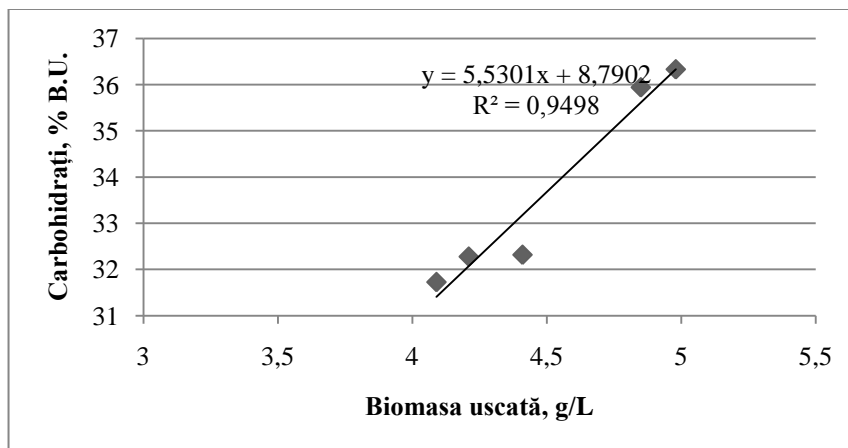


Fig. 4.12. Interdependența acumulării biomasei și carbohidraților la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, iradiată cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz.

Analiza dependenței parametrilor conținutului de β -glucani și carbohidrați a stabilit o tendință ascendentă a unei valori care implică, la rândul său, o tendință ascendentă a celeilalte variabile. Legătura între ele identificată ca $R^2=0,633$ sau 63,3%, argumentează ipoteza existenței unei legături reale în baza căreia se poate pronostica valorile uneia în raport cu valorile celeilalte pe baza ecuației de regresie. O posibilă explicație ar fi că ambele variabile, carbohidrații și β -glucanii, sunt influențate de același fenomen – de undele milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz (Figura 4.13).

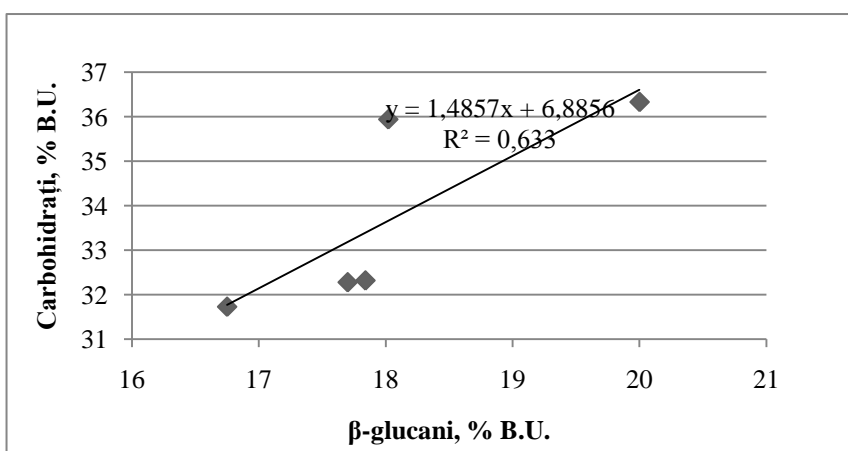


Fig. 4.13. Interdependența acumulării β -glucanilor și carbohidraților la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, iradiată cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz.

Studiul conținutului de proteine și activității catalazei la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 a demonstrat un maximum de acumulare a proteinei (41,00%) și de activitate a catalazei (2642 U/mg proteine), ceea ce este cu 33,00-38,00% mai mult față de proba neiradiată, care se manifestă la durata de iradiere de 15 minute (Figura 4.14).

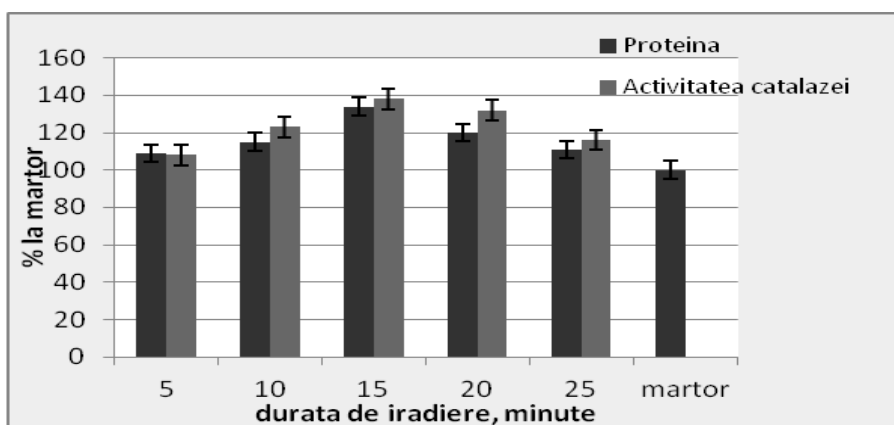


Fig. 4.14. Efectul undelor milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra cantității de proteine și activității catalazei la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în funcție de durata iradierii.

Examinarea relației dintre conținutul de proteine și activitatea catalazei la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, iradiată cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz, a demonstrat un grad de dependență înalt, coeficientul de determinare a constituit 0,864 (Figura 4.15).

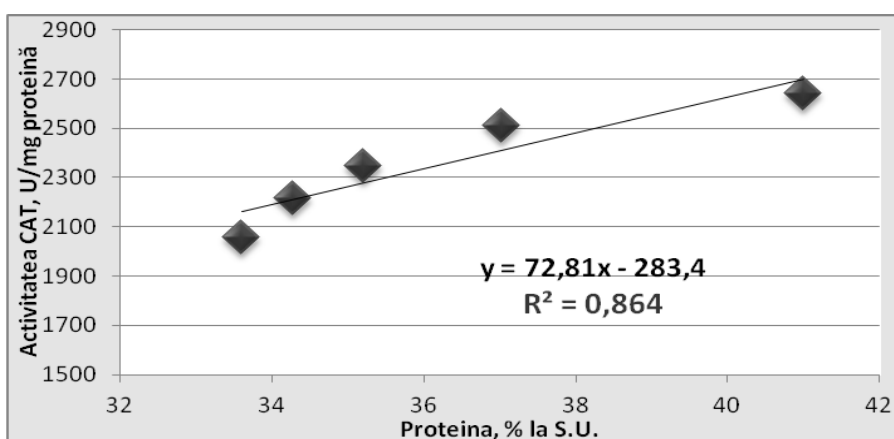


Fig. 4.15. Relația dintre conținutul de proteine și activitatea catalazei la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 iradiată cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz.

Astfel, pentru tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, regimul optimal de acumulare a componentelor structurale, cantității maxime de biomasă, carbohidrați, β -glucani și proteine se constată la iradierea cu unde milimetrice cu frecvența 53,33 GHz timp de 15-20 minute [62].

De regulă, procedeele de utilizare a undelor milimetrice în scopul obținerii rezultatului scontat, prevăd aplicarea acestora pe parcursul a 5-10 runde, fapt ce duce la amplificarea semnalului interior al organismului. Din aceste considerente, este important de a stabili reacția celulei levuriene la aplicarea repetată a undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă. Investigațiile ulterioare au avut drept scop evaluarea efectului iradierii duble cu unde milimetrice de intensitate joasă a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în vederea relevării regimului optim de stimulare a proceselor biosintetice. În experiențele noastre, cultura de levuri, a fost iradiată inițial în faza de latență (până la inoculare) și repetat în faza creșterii accelerate (după 24 ore de cultivare în profunzime).

În calitate de indicatori sensibili a stării funcționale a levurii au fost cercetate multiplicarea și viabilitatea tulpinii de levuri în dinamică, pe durata a 48 ore de dezvoltare.

Din rezultatele expuse în Figura 4.16 se observă că iradierea dublă a culturii, în intervalul de 10-20 minute, nu induce diminuarea sau stimularea substanțială a numărului de generații, deci nu provoacă dereglări majore în ciclul mitotic al levurii comparativ cu varianta martor neiradiată. Cauza lipsei efectului iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz urmează a fi determinată ulterior. Însă, în literatura de specialitate deja este cunoscut fenomenul de anihilare al influenței undelor milimetrice asupra organismelor vii, în condiții nefavorabile de dezvoltare [30].

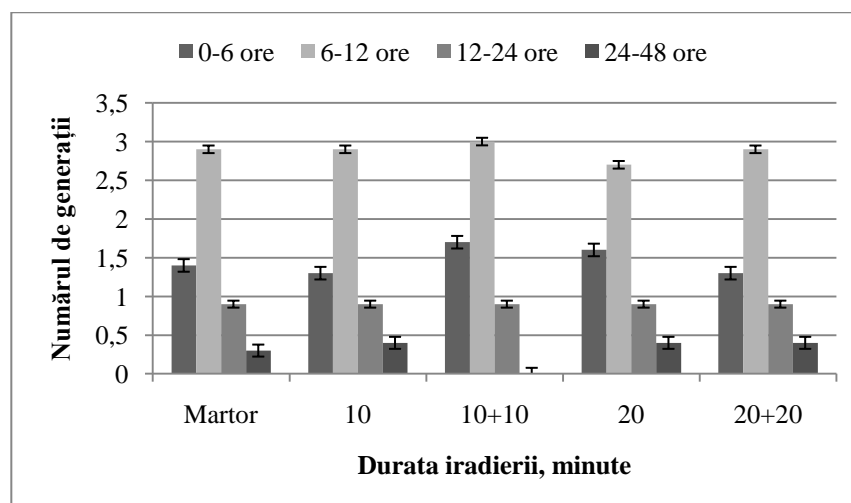


Fig. 4.16. Efectul iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra numărului de generații ale populației *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Nu s-au observat modificări majore ale efectelor dublei iradierii cu unde milimetrice nici în cazul experiențelor de determinare a viabilității celulelor, acest parametru variind neesențial față

de nivelul matorului radiat o singură dată (Figura 4.17). Acest fenomen poate fi explicat, din punctul nostru de vedere, prin încetinirea mecanismelor de autostimulare și reîntoarcerea la normalitate a stării funcționale a membranei celulare a levurii iradiată repetat la diferite intervale de timp [12].

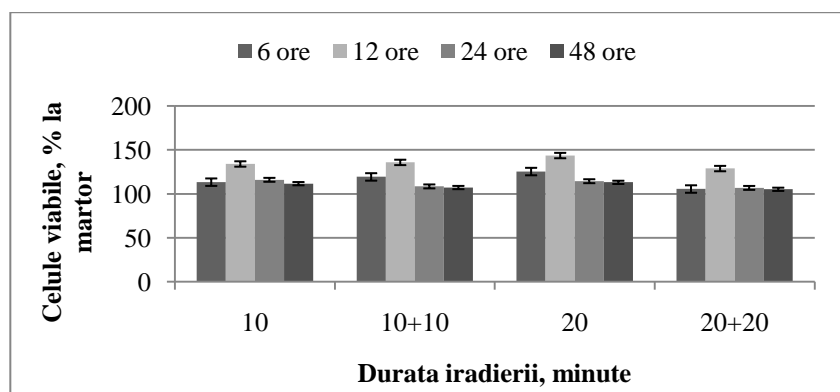


Fig. 4.17. Efectul iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra viabilității celulelor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

În continuare s-a determinat conținutul de biomasă, carbohidrați, β -glucani, proteine și activitatea catalazei. Cercetările au demonstrat că iradierea dublă a culturii, inițial în faza de latență (până la inoculare) și repetat în faza creșterii accelerate (după 24 ore de cultivare în profunzime la temperatura de 30°C) nu induce schimbări esențiale ale conținutului de β -glucani, carbohidrați și producției de biomasă, comparativ cu variantele culturii iradiată o singură dată (Figura 4.18).

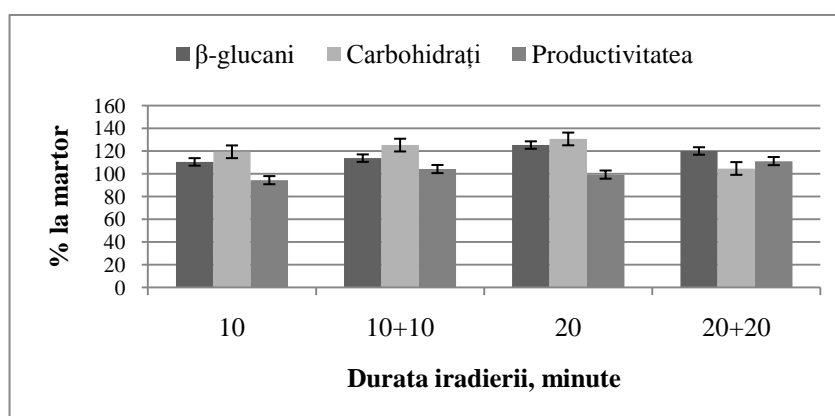


Fig. 4.18. Efectul iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra conținutului de β -glucani, carbohidrați și producției de biomasă la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Rezultate relevante s-au obținut în experiențele de elucidare a potențialului de biosinteză a proteinei și activității catalazei la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 iradiată repetat.

La analiza rezultatelor s-a constatat că iradierea dublă, cu durata de 10 minute, are efect stimulator asupra conținutului de proteine și activității catalazei. Conținutul maximal de proteine prevalează martorul cu 20,0 și respectiv 36,0% (Figura 4.19). Iradierea dublă cu durata de 20 minute nu influențează semnificativ conținutul de proteine comparativ cu iradierea culturii o singură dată, în faza de latență.

Cercetările au evidențiat că iradierea dublă, cu durata de 20 minute, provoacă o micșorare a activității catalazei (Figura 4.19). Acest efect poate fi explicat prin faptul că iradierea dublă provoacă stres oxidativ puternic, ceea ce contribuie la formarea radicalilor liberi, precum și peroxidului de hidrogen. Numărul mare de radicali liberi inhibă activitatea enzimelor antioxidante, inclusiv și a catalazei. Rezultatele obținute în experiențele noastre sunt similare cu datele din literatura de specialitate, care demonstrează că activitatea enzimelor antioxidante și conținutul de proteine sunt legate de stresul oxidativ [186].

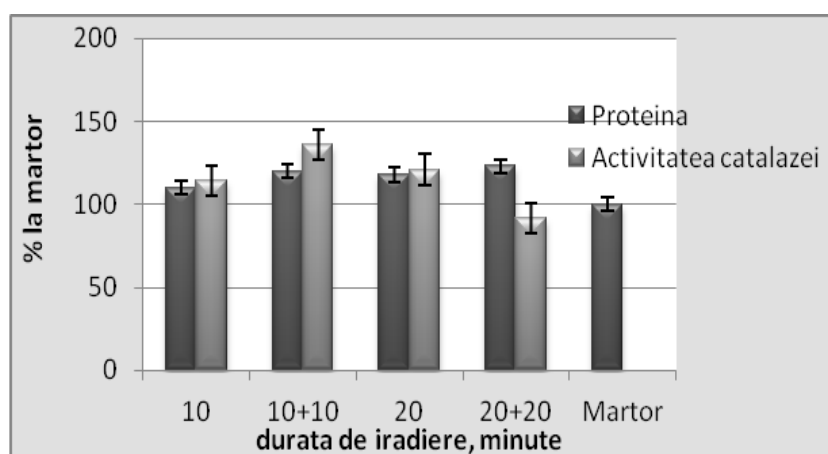


Fig. 4.19. Efectul iradierii duble cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz asupra conținutului de proteine și activității catalazei la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Astfel, în acest compartiment sunt expuse rezultatele cercetărilor efectuate în premieră pentru stabilirea efectelor undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă, în funcție de frecvență și durata de iradiere, asupra capacității de biosinteză a β -glucanilor și altor constituente celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Rezultatele obținute au demonstrat eficiența tratării levurii cu undele milimetrice cu frecvență 53,33 GHz timp de 20 minute.

În rezultatul cercetărilor efectuate a fost propus un procedeu nou de sporire a conținutului de β -glucani la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 cu utilizarea undelor milimetrice, care poate fi

utilizat în industria microbiologică, alimentară, farmaceutică, etc. În baza acestor rezultate a fost elaborat și obținut brevet de invenție [7, 20].

4.2.3. Procedeu de sporire a conținutului de β -glucani la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 cu utilizarea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă

În conformitate cu rezultatele obținute se propune un procedeu nou de sinteză orientată a β -glucanilor prin utilizarea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă.

Schema realizării procedurii este prezentată în Figura 4.20 și include următoarele etape:

Etapa I. Obținerea inoculului.

Materialul semincer se obține prin cultivarea levurii în profunzime, pe must de bere sau YPD, timp de 24 ore, pe agitatorul rotativ (200 rot/min), la temperatura de 25°C.

Etapa II. Iradierea culturii cu unde milimetrice cu frecvență extra înaltă.

Inoculul se iriază cu unde milimetrice cu frecvența $f=53,33$ GHz, timp de 20 minute. Inoculul iradiat, în volum de 5% în bază volumetrică, 2×10^6 celule/ml, se inoculează în mediile de fermentație.

Etapa III. Cultivarea levurii în profunzime pe mediu de biosinteză.

Cultivarea submersă a levurii se realizează în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1L ce conține 0,2 L mediu nutritiv YPD: extract de levuri 1%, peptonă 2%, glucoză 2%, apă potabilă 1L, pH-5,5 [129], pe agitatorul rotativ (200 rot/min), la temperatura de 25°C, timp de 120 ore. Biomasa levuriană se separă de lichidul cultural prin centrifugare 3500 rot/min timp de 20 minute.

Etapa IV. Extragerea β -glucanilor.

Extragerea β -glucanilor se efectuează conform procedurii: biomasa celulară (ajustată la 15% g/g conținut de substanță solidă și pH-5) se supune autolizei la 50°C timp de 24 ore, ulterior autolizatul se încălzește la $80 \pm 5^\circ\text{C}$ timp de 15 minute, se răcește, se centrifughează la 3500 rot/min timp de 10 minute. Sedimentul se colectează. La sediment se adaugă 5 volume de 1N NaOH, amestecul se supune tratării termice la $80 \pm 5^\circ\text{C}$, timp de 2 ore. Ulterior, se adaugă 5 volume de acid acetic 0,5N și se încălzește la $75 \pm 5^\circ\text{C}$ timp de 1 oră. Amestecul se centrifughează timp de 10 minute la 3500 rot/min la temperatura camerei. Sedimentul (β -glucanii) se spală de trei ori cu apă distilată, se usucă.

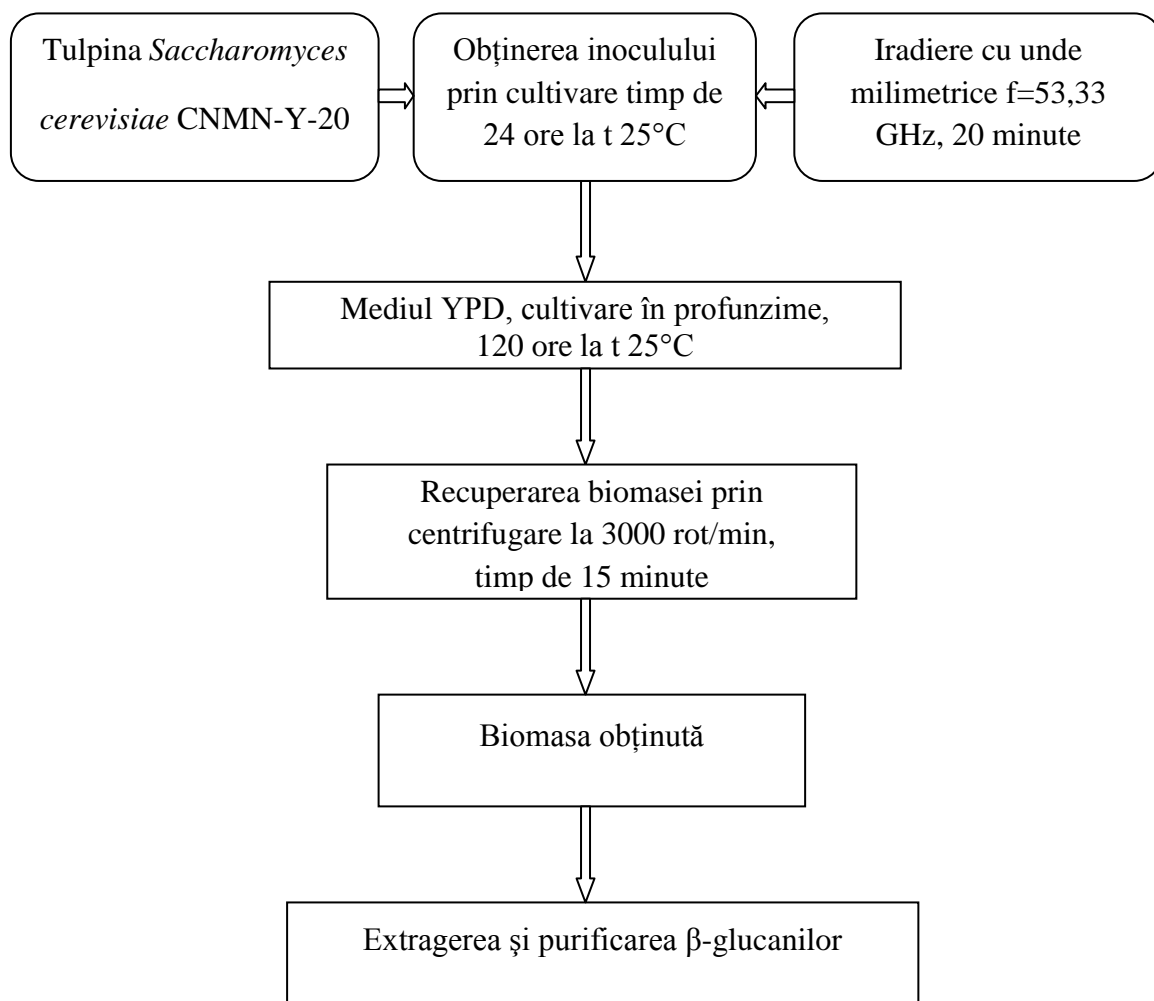


Fig. 4.20. Schema realizării procedurii de sporire a conținutului de β -glucani la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 cu utilizarea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă.

Așadar, cercetările au permis demonstrarea eficienței undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă în amplificarea semnificativă a efectului biotehnologic obținut la cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Variantele experimentale selectate de noi în calitate de suport pentru elaborarea procedurii asigură un nivel înalt al cantității de β -glucani în biomasă. Cu toate că, în obiectivele noastre de lucru a fost prevăzută doar obținerea cantităților sporite de β -glucani, cercetările au evidențiat și modelarea cantității de alte componente celulare în biomasa levuriană.

4.3. Tehnologia de cultivare a tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 și de obținere a β -glucanilor

În baza rezultatelor prezentate anterior în capitolul 2 și subcapitolul 4.2 cu referință la metoda optimizată de extracție a β -glucanilor, selectarea nutrienților preferențiali și condițiilor

optime de cultivare submersă, acțiunea undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă a fost necesar de a combina procedeele elaborate într-un flux tehnologic avantajos, care permite obținerea din biomasa levuriană a β -glucanilor cu proprietăți biologice valoroase. În cadrul acestui subcapitol sunt descrise cercetările care au permis să fie definite fazele principale ale tehnologiei, precum și valorificarea biopreparatului obținut conform acestei tehnologii.

În cadrul fluxului tehnologic importanță majoră au procedeele de cultivare dirijată a levurii, care permit obținerea cantității maxime de biomasă cu un conținut înalt de β -glucani. După cum a fost demonstrat pe parcursul întregii lucrări realizarea acestui obiectiv a fost posibilă datorită eficientizării procedeei de extragere și purificare a β -glucanilor din biomasa levuriană, optimizării mediilor nutritive, condițiilor de cultivare, utilizării undelor milimetrice, procedee ce au contribuit la intensificarea procesului de biosinteză a β -glucanilor.

În continuare prezentăm descrierea fazelor tehnologiei propuse.

4.3.1. Proces tehnologic de cultivare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și de obținere a β -glucanilor.

Procesul tehnologic de cultivare a levurii în scopul obținerii de biomasă cu conținut sporit de β -glucani este bazat pe următoarele principii:

- Utilizarea în calitate de producător a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20;
- Prepararea materialului semincer cu aplicarea undelor milimetrice cu frecvența 53,33 GHz timp de 20 minute;
- Utilizarea mediilor nutritive optimizate YPD-4 și R-ZZ;
- Cultivarea în profunzime conform parametrilor optimi de temperatură, pH, durată și aerare;
- Procesarea biomasei levuriene conform metodei optimizate pentru extragerea β -glucanilor.

Tehnologia este structurată în patru compartimente (Tabelul 4.1).

Prima și a doua parte a tehnologiei integrate reprezintă obținerea materiei prime, care prevede obținerea materialului semincer și cultivarea tulpinii de levuri în condițiile optime cu utilizarea indicatorilor care asigură efectul maximal de acumulare a β -glucanilor.

Partea a treia a tehnologiei implică procedeele de procesare a biomasei și extragere a produsului polizaharidic.

Partea a patra a tehnologiei prevede studiul calităților produsului finit.

Tabelul 4.1. Fazele procesului tehnologic de cultivare dirijată a producătorului și obținere a β -glucanilor.

Nr d/o	Denumirea operațiunii	Controlul interfazic
1.	Obținerea materialului semincer.	
	1.1. Caracteristica producătorului, tulpina <i>S. cerevisiae</i> CNMN-Y-20.	Verificarea caracterelor morfo-culturale.
	1.2. Cultivarea culturii stoc în tuburi cu gel înclinat.	Verificarea condițiilor de cultivare și purității culturii.
	1.3. Cultivarea materialului semincer în baloane Erlenmeyer.	Verificarea condițiilor de cultivare și purității culturii.
	1.4. Iradierea materialului semincer cu unde milimetrice frecvența 53,33 GHz, regim continuu, timp de 20 minute.	Supravegherea parametrilor de iradiere.
2.	Procesul de cultivare submersă a tulpinii.	
	2.1. Prepararea mediului nutritiv steril YPD-4 sau R-ZZ.	Verificarea preciziei balanței.
	2.2. Inocularea culturii de levuri pe mediul nutritiv, inocul iradiat (2×10^6 celule/ml), în concentrație de 5% în bază volumetrică.	Verificarea cantității și calității inoculului.
	2.3. Cultivarea submersă dirijată a levurii, t-25°C, aerare 81,0...83,0 mgL ⁻¹ O ₂ , durata cultivării 120 ore.	Supravegherea parametrilor de cultivare, monitorizarea purității culturii.
3.	Procesarea biomasei levuriene.	
	3.1. Separarea biomasei levuriene de lichidul cultural prin centrifugare la 3000 rot/min timp de 15 minute.	Verificarea gradului de separare.
	3.2. Procesul de extragere a β -glucanilor din biomasa levuriană.	Verificarea gradului de extragere.
4.	Caracterizarea produsului.	
	4.1. Caracteristica fizico-chimică.	Analize de conformitate.
	4.2. Dozaj, ambalare, etichetare.	Verificarea ambalajului, inscripțiilor pe etichete.

Descrierea fazelor procesului tehnologic de cultivare dirijată a producătorului și de obținere a β -glucanilor

➤ Caracteristica producătorului

Caracteristica producătorului *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 este indicată în brevetul de invenție MD 4048 [4].

Conform criteriului sistematic tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 corespunde următoarei clasificări: încregătura *Eumicota*, subîncregătura *Ascomycotina*, clasa *Hemiascomycetes*, ordinul *Endomycetales*, familia *Saccharomycetaceae*, genul *Saccharomyces*.

Originea tulpinii. Tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 a fost izolată în cultură pură din sedimentele levurilor provenite de la fermentarea vinului roșu Cabernet-5 prin metoda selecției în mai multe etape pe medii lichide și agarizate must de bere și mediul Rieder, în cadrul laboratorului Biotehnologia levurilor, Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM (sedimente oferite de Institutul de Vinificație a Republicii Moldova).

Caracterele morfologice și culturale ale tulpinii. Tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 se prezintă sub forma unor celule ovale sau rotunde, înmugurire polară, uneori formează pseudohife. Tipul respirației - aerob, formează asce persistente direct din celula diploidă, ascospori neeliberați, rotunzi sau ovali netezi. Pe mediu solid formează colonii alb-roz, suprafața lucioasă, netedă, plată, diametrul 4...6 mm.

Caracterele fiziologo-biochimice. Nu formează peliculă. Fermentația +: nitrat -; ureaza-; testul diazonium blue B (DBB). Asimilarea glucidelor: D-glucoza, zaharoza, fructoza, D-maltoza, D-galactoza, D-manoza, D-tregaloza, D-xiloza. Tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 suportă bine aciditatea, pH-ul inițial fiind de 5,5; se dezvoltă bine la temperatura de +20...25°C. Tulpina crește bine pe mediul must de bere (6%) și medii nutritive:

1. Mediul YPD, care conține, g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie – 10 ml; apă potabilă – 1000 ml.

La cultivare în profunzime pe mediul dat timp de 120 ore, tulpina sintetizează până la 15,3% β -glucani în biomasa uscată.

2. Mediul Rieder, care conține, g/L: glucoză – 30,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; KH_2PO_4 – 1,0; NaCl – 0,5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,4; autolizat de drojdie – 10 ml; apă potabilă – până 1000 ml.

La cultivare în profunzime pe mediul dat timp de 120 ore, tulpina sintetizează până la 22,5% β -glucani în biomasa uscată.

➤ Descrierea procesului tehnologic de obținere a biopreparatului

Procesul constă din patru etape:

- I – Obținerea materialului semincer
- II – Procesul de cultivare submersă a tulpinii
- III – Procesarea biomasei levuriene
- IY – Caracterizarea produsului

Schema tehnologică de cultivare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și obținere a β -glucanilor este redată în Figura 4.21.

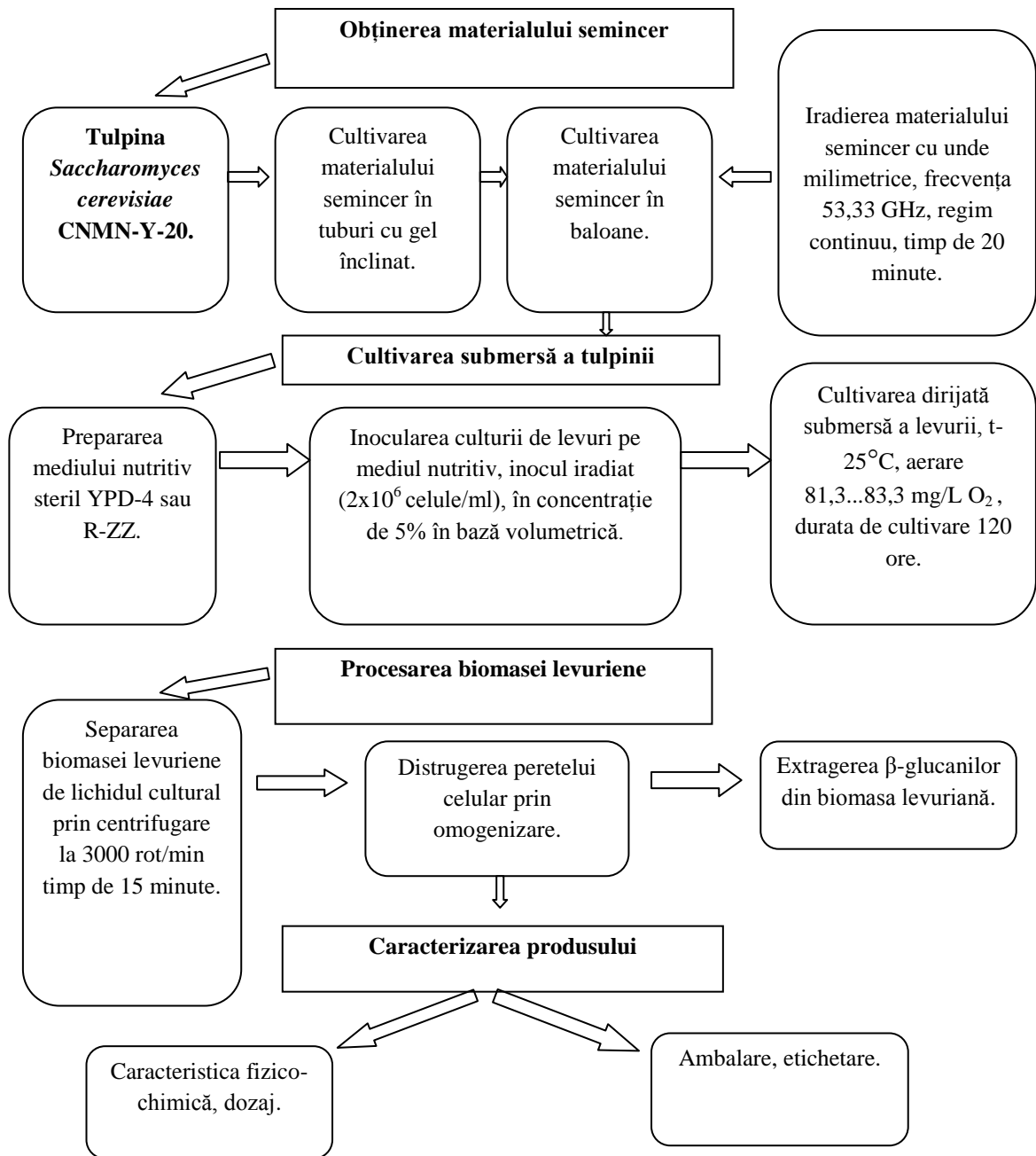


Fig. 4.21. Schema tehnologică de obținere a β -glucanilor din levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

I. Obținerea materialului semincer (inocul)

Materialul semincer se obține în următoarele etape:

- 1) cultivarea în tuburi pe medii agarizate;
- 2) cultivarea în baloane cu medii nutritive;
- 3) iradierea materialului semincer cu unde milimetrice.

1) *Cultivarea culturii stoc în tuburi cu gel înclinat*

Tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 se însămânțează în tuburi cu malț agarizat. Mediul pregătit se toarnă a câte 6-7 ml în tuburi de sticlă cu volumul de 13 ml, se sterilizează în autoclav la temperatura de 112-115°C timp de 30 minute. După autoclavare mediul agarizat din tuburi se înclină.

Însămânțarea se efectuează transferând celulele pe suprafața mediului solid cu ajutorul ansei. Tuburile se incubează la temperatura de 25...27°C (24-48 ore), după ce cultura poate fi transferată pe mediu lichid în baloane Erlenmeyer. Cultura stoc se păstrează în frigider la temperatura de 4...5°C pe parcursul a 1-2 luni. Fiecare lot de material semincer trebuie să fie pașaportizat.

2) *Cultivarea materialului semincer pe mediul lichid*

Pentru obținerea inoculului, tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, cultivată anterior pe mediul agarizat înclinat, este cultivată în profunzime timp de 24 ore în baloane Erlenmeyer cu volumul 500 ml, a câte 100 ml mediu lichid YPD steril, durata cultivării este de 24 ore la temperatura de 25±1°C.

3) *Iradierea materialului semincer cu unde milimetrice*

Din precultură (inocul) cu densitatea de 2×10^6 celule/ml se pregătesc mostrele pentru iradierea cu unde milimetrice. Pentru iradiere se utilizează celule în faza creșterii exponențiale. O astfel de populație conține celule în toate etapele mitotice a ciclului celular.

Inoculul se tratează cu unde milimetrice cu frecvența 53,33 GHz, regim continuu, durata de iradiere 20 minute. Ca generator de unde milimetrice este utilizat dispozitivul model KBЧ-НД, RS-232. Aparatul este certificat și permis spre utilizare în practica medicală.

II. Procesul de cultivare submersă a tulpinii

Procesul tehnologic constă din următoarele etape:

- 1) Pregătirea mediului nutritiv steril;
- 2) Inocularea culturii de levuri pe mediul de fermentație;
- 3) Cultivarea submersă dirijată a levurii.

1) *Prepararea mediului nutritiv steril*

Pentru cultivarea în profunzime a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 se utilizează mediul optimizat YPD-4 cu următoarea componență, g/L: extract de drojdie - 10,0; peptonă - 20,0;

glucoză - 40,0 sau mediul optimizat R-ZZ cu următoarea compoziție, g/L: zaharoză- 37,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,7; NaCl - 0,5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 0,4; KH_2PO_4 - 1,0; acetat de zinc - 0,00816; autolizat de drojdii - 10 ml; apă potabilă - 1L; pH - 5,0-6,0.

2) Inocularea culturii de levuri pe mediul nutritiv de fermentație

Materialul semincer tratat cu unde milimetrice (2×10^6 celule/ml) se introduce în volum de 5% din volumul mediului nutritiv.

3) Cultivarea submersă dirijată a levurii

Procesul de cultivare decurge conform următorilor parametri:

- Cultivarea submersă se va efectua în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1L
- Temperatura mediului în timpul procesului de cultivare se menține 25°C
- Gradul de aerare 81...83 mg/L
- Durata procesului de cultivare 120 ore, agitare permanentă
- Nu se permite poluarea cu microfloră străină.

III. Procesarea biomasei levuriene include:

- 1) Separarea biomasei levuriene de lichidul cultural;
- 2) Procesul de extragere a β -glucanilor din biomasa levuriană.

1) Separarea biomasei levuriene de lichidul cultural

La finalul procesului de fermentare se efectuează separarea biomasei levuriene de lichidul cultural prin centrifugare la 3000 rot/min timp de 15 minute.

2) Procesul de extragere a β -glucanilor din biomasa levuriană

Dezintegrarea peretelui celular se efectuează aplicând procedeul omogenizării biomasei celulare: 10 g drojdie (30% S.U.) + 20 ml apă sterilă, amestecul se omogenizează timp de 10 minute la viteza de rotație 15000 rot/min (6F volum 30 ml), în contact cu apa, umiditatea relativă 85%. Amestecul se centrifughează. Sedimentul (pereții celulari) se tratează cu 50 ml 1N NaOH timp de 1 oră la temperatura de 90°C. Sedimentul se colectează și se tratează cu 0,5N acid acetic în raport de 1:5, la $75 \pm 5^\circ\text{C}$ timp de 1 oră (în scopul eliminării glicogenului). Sedimentul se spală de 2 ori cu apă distilată, se centrifughează, se usucă la $50 \pm 5^\circ\text{C}$. Produsul obținut este β -glucanul.

IV. Caracterizarea și marcarea produsului include:

- 1) Caracteristica fizico-chimică;
- 2) Dozaj, ambalare, etichetare.

1) Caracteristica fizico-chimică a produsului

Bioprodusul, obținut din pereții celulari a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, reprezintă cristale de culoare bej-gălbuie, insolubile în solvenți organici (alcool, eter, acetonă, benzoat, eter

petroleic) și greu solubile în apă. Puritatea produsului se examinează prin spectroscopie în infraroșu [276].

2) Dozaj, ambalare, etichetare

Bioprodusul se trece cantitativ câte 1-5 g în flacoane de sticlă mată. Fiecare flacon se etichetează indicându-se denumirea produsului, data, numărul lotului, termenul de valabilitate. Bioprodusul se păstrează la temperatura de +4°C (Figura 4.22).



Fig. 4.22. Produsul „Glucan-20” pulbere obținut din levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

4.3.2. Evaluarea eficienței tehnologiei elaborate

Pentru a compara eficiența tehnologiei elaborate, au fost montate experiențe care au avut la bază procese tehnologice cu parametrii tehnici standard. În aceste cercetări s-a utilizat mediul de fermentație YPD, materialul semincer nu a fost tratat cu unde milimetrice, s-a aplicat metoda de extragere a β -glucanilor propusă de Thammakiti [244], temperatura de cultivare, gradul de aerare și durata de cultivare (ore) a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 au fost identice cu cele din variantele experimentale.

Pe parcursul derulării investigațiilor au fost monitorizați indicii: cantitatea de β -glucani, carbohidrați totali, biomasă uscată, proteine.

Analiza rezultatelor obținute în cadrul experiențelor cu utilizarea mediului YPD-4 a scos în evidență eficiența aplicării tehnologiei noi, care constă în obținerea a $1,26 \pm 0,29$ g/L β -glucani, ceea ce depășește martorul cu 68,2%. Cantitatea netă de biomasă obținută la aplicarea tehnologiei cu parametrii tehnici elaborați este de $6,18 \pm 0,65$ g/L față de $4,6 \pm 1,04$ g/L pentru tehnologia martor (Tabelul 4.2). În conformitate cu calculele efectuate, cantitatea de carbohidrați totali în biomasa tulpinii la cultivare conform fluxului tehnologic elaborat este de $52,86 \pm 1,4\%$ la S.U. comparativ cu $46,36 \pm 2,75\%$ la S.U. specific tehnologiei martor. Conținutul de β -glucani în

peretele celular constituie 20,29% comparativ cu 16,2% determinate în varietele de control, ceea ce este cu 25,2 la sută mai mult comparativ cu indicii obținuți la utilizarea tehnologiei martor.

Pornind de la faptul că modificarea condițiilor de cultivare poate duce la declanșarea unor procese fiziologice cu efecte asupra biosintezei componentelor celulare, am aplicat un studiu ce include aprecierea nivelului de proteine. Conform rezultatelor obținute, cele mai mari valori ale conținutului de proteine la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 au fost stabilite la aplicarea tehnologiei elaborate, indicii cărora constituie $42,45 \pm 1,80\%$ proteine ceea ce este cu 40 la sută mai mult comparativ cu indicii obținuți la utilizarea tehnologiei martor (Tabelul 4.2).

Tabelul 4.2. Nivelul indicatorilor biologici a tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare conform proceselor tehnologice standard și experimentale, mediul de fermentație YPD-4.

Nr. d/o	Indicii monitorizați	Tehnologia martor	Tehnologia nouă (mediul YPD-4)	
			Nivelul indicatorului	% la martor
1.	β -glucani, g/L mediu de cultură	$0,752 \pm 0,22$	$1,265 \pm 0,29$	168,2
2.	β -glucani, % la S.U.	$16,2 \pm 1,14$	$20,29 \pm 2,76$	125,2
3.	Carbohidrați totali, % la S.U.	$46,36 \pm 2,75$	$52,86 \pm 1,4$	114,0
4.	Biomasă uscată, g/L mediu de cultură	$4,6 \pm 1,04$	$6,18 \pm 0,65$	134,3
5.	Proteine, % la S.U.	$30,12 \pm 1,30$	$42,45 \pm 1,80$	140

Analiza rezultatelor obținute în cadrul experiențelor cu utilizarea tehnologiei elaborate în care s-a utilizat mediul optimizat R-ZZ, a scos în evidență aceleași legități ale activității biosintetice a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Aplicarea noilor procedee de cultivare permite obținerea a $0,813 \pm 0,13$ g/L β -glucani ceea ce depășește martorul cu 91,7% (Tabelul 4.3).

Tabelul 4.3. Nivelul indicatorilor biologici a tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare conform proceselor tehnologice standard și experimentale, mediul de fermentație R-ZZ.

Nr. d/o	Indicii monitorizați	Tehnologia martor	Tehnologia nouă (mediul R-ZZ)	
			Nivelul indicatorului	% la martor
1.	β -glucani, g/L mediu de cultură	$0,424 \pm 0,03$	$0,813 \pm 0,13$	191,7
2.	β -glucani, % la S.U.	$21,19 \pm 0,8$	$27,10 \pm 0,46$	128
3.	Carbohidrați totali, % la S.U.	$42,07 \pm 6,74$	$44,55 \pm 4,64$	106
4.	Biomasă uscată, g/L mediu de cultură	$2,0 \pm 0,12$	$3,0 \pm 0,1$	150
5.	Proteine, % la S.U.	$26,27 \pm 1,0$	$31,56 \pm 1,4$	120

Astfel, putem afirma cu siguranță că tehnologia propusă permite sporirea atât a conținutului de β -glucani, obținut la 1L de mediu de cultivare, cât și a nivelului valorilor altor

indicatori biologici a tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, ceea ce confirmă că procedeele și condițiile integrate într-un singur flux tehnologic asigură o eficiență înaltă a tehnologiei elaborate. În rezultatul aplicării acestei tehnologii de cultivare, obținem cu 68,2...91,7% mai mult bioproduct față de procedeul de referință.

Următoarea etapă a studiului constă în caracterizarea fizico-chimică a β -glucanilor izolați din pereții celulari ai levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Structura β -glucanilor este un factor important al calității. Actualmente este confirmat că structura β -glucanilor depinde de procedeele de izolare și uscare. Relevanța acestei ipoteze este confirmată de cercetările efectuate la utilizarea a două proceduri diferite de izolare din drojdia de bere a β -glucanilor insolubili în apă: izolare alcalin-acidă (AA) și izolare alcalin-acidă cu îndepărtarea manoproteinelor (AAM). β -glucanii izolați din biomasa levuriană se analizează prin spectroscopia în infraroșu (FTIR) [276]. Autorii au constatat că β -glucanii, uscați prin diferite procedee: cu aer, liofilizare și uscare prin pulverizare, au avut structuri diferite. Preparatele de β -glucani obținute prin procedeele de izolare (AA) și (AAM) au avut valori similare ale masei uscate, a conținutului de polizaharide totale, proteinei și elementelor organice. În mod semnificativ au fost afectate, fracțiile de β -glucani din totalul de polizaharide. Liofilizarea și, în special, uscarea cu aer au cauzat un grad mai mare de aglomerare și modificări a microstructurii β -glucanilor (Figura 4.23).

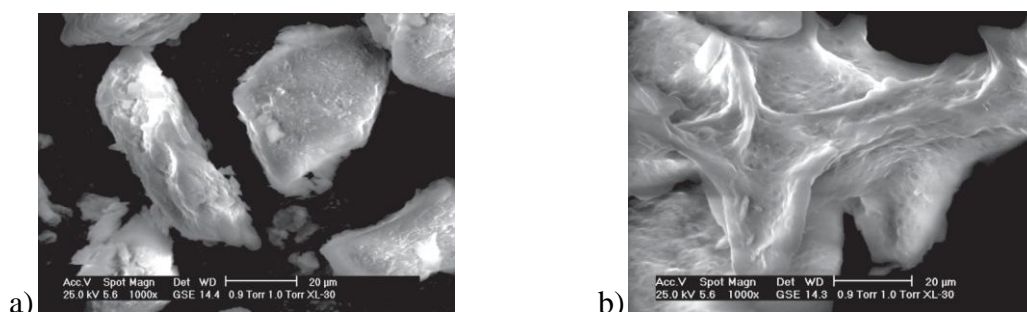


Fig. 4.23. Structura microscopică a β -glucanului uscat cu aer (a) și liofilizat (b), izolat prin procedura alcalin-acidă [276].

Toate aceste informații pot fi valorificate la analiza β -glucanilor obținuți din alte tulpini de levuri.

Referitor la caracterele fizico-chimice determinate ale β -glucanilor obținuți din pereții celulari ai levurilor *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, aplicând procedeul de extragere simplificat, putem menționa cristale inodore, de culoare bej-gălbuie, greu solubile în solvenți organici (alcool, acetonă, eter petroleic) și în apă. Compoziția produsului „Glucan-20” este redată în Tabelul 4.4. Purity s-a identificat prin determinarea prezenței proteinei, glicogenului.

Tabelul 4.4. Compoziția chimică a produsului „Glucan-20” (raportată la substanța uscată).

Produsul	β-glucan, g %	Glicogen, g %	Carbohidrați totali, g %	Proteine, g %	Alte impurități, %
Glucan-20 pulbere	90...93,0	2,4	3,2	1,0	3,0...0,3

Caracteristicile fizico-chimice a β-gluconilor prezintă criterii importante în aprecierea adecvată a materialului vizat pentru utilizare în diferite domenii. Ulterior, bioprodusul Glucan-20 obținut a fost propus în calitate de supliment alimentar și furajer pentru sporirea statutului imun al puietului de pești fitofagi.

4.3.3. Valorificarea bioprodusului Glucan-20 obținut din levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20

Preparatul de β-gluconii a fost utilizat la furajarea puietului de pește, în particular pentru fortificarea viabilității și indicilor de creștere a puietului de cosaș (*Ctenopharyngodon idella*).

Cercetările au fost efectuate în colaborare cu cercetătorii Institutului de Zoologie, laboratorul Ihtiologie și Acvacultură.

Materialul biologic a fost reprezentat de puiet din specia de cosaș (*Ctenopharyngodon idella*) cu greutatea inițială medie de $1,185 \pm 0,318$ g. Pentru a urmări evoluția parametrilor fizico-chimici a apei din incubatoare, pe parcursul desfășurării experiențelor, s-au exercitat măsurări de determinare a temperaturii, oxigenului dizolvat, pH-ului.

Experiențele au fost efectuate pe un număr de 160 exemplare în 3 loturi: lotul martor – 53 larve; lotul II – 54 larve; lotul III- 53 larve. Perioada experimentală a durat 20 zile.

Metoda de furajare utilizată a fost cea manuală, numărul de tainuri a fost adaptat în funcție de vârsta puietului și a constituit 75-50% furaj la o unitate de masă a larvei.

Observațiile asupra dezvoltării larvelor s-au efectuat după 10 și 20 zile de la inițierea experimentelor. La fiecare citire s-a determinat mortalitatea și indicii de creștere a puietului de cosaș.

În experiențele efectuate au fost cercetate următoarele variante de rețete furajere:

Varianta I (unit. masă,%): făină de pește – 35; drojdie de vin uscată – 40; făină de tescovină de struguri –15; lapte praf – 7,9; bioprodusul Glucan-20 – 0,1; metionină – 1,0; premix vitamino-mineral – 1,0.

Varianta II (unit. masă,%): făină de pește – 30; drojdie uscată de vin – 30; făină de tescovină de struguri – 30; lapte praf –7,5; bioprodusul Glucan-20 – 0,5; metionină – 1,0; premix vitamino-mineral – 1,0.

Varianta III (martor) (unit. masă,%): autolizat de drojzii – 48...50; făină de pește – 34...35; făină de grâu – 7...6; lapte praf – 7...8; metionină – 0,5...1,0; premix vitamino-mineral – 0,5...1,0 [3].

Rezultatele au demonstrat că sporul maximal de supraviețuire a larvelor de cosaș este de 26,7% și este specific pentru rețeta II de furaj. Valorile medii a indicilor liniari a larvelor de cosaș la cele două loturi luate în studiu, prezintă o creștere cu 6,3...9,8% comparativ cu indivizii din lotul martor. Analiza masei corporale la puietul de cosaș după 20 zile a constatat diferențe semnificative ($p < 0,01$) în favoarea ambelor rețete furajere comparativ cu lotul martor. Sporul masei corporale constituie 17-24%. Rezultate pozitive s-au stabilit și în cazul estimării greutateii medii corporale. Cele mai mari valori ale ratei de creștere, g greutate medie corporală, se constată în cazul lotului experimental în care puietul de cosaș a fost hrănit cu rețeta II de furaj, unde valorile greutateii medii corporale au constituit $56,128 \pm 7,628$ g sau cu 56,3% mai mult față de martor (Figura 4.24). Pentru receta II de furaj s-a obținut brevet de invenție [8].

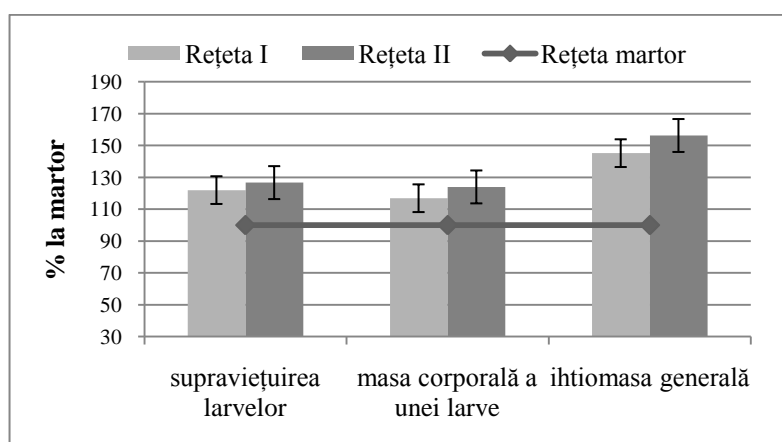


Fig. 4.24. Indicii productivi ai puietului de cosaș *Ctenopharyngodon idella*.

Prin urmare, pe baza rezultatelor cercetărilor efectuate putem face unele recomandări privind utilizarea β -glucanilor obținuți din levuri la îmbunătățirea performanțelor productive ale puietului de pești. Cercetările pot servi la efectuarea altor tipuri de experimente sau tehnologii noi de creștere a puietului de specii fitofage.

Receta nouă de furaj a fost utilizată în condiții de producere industrială. Testarea a fost efectuată la întreprinderea individuală „Marin Alexandru”. Rezultatele confirmă eficiența înaltă a furajului elaborat, care contribuie la sporirea procentului de viabilitate și ihtiomasei puietului

de pești fitofagi cu 20-30% (Act de implementare din 17.07.2014, Act de implementare din 17.07.2015 și Act de implementare din 10.10.2016)

4.4. Concluzii la capitolul 4

1. Reacția de răspuns a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la acțiunea undelor milimetrice cu frecvențele 60,12 GHz; 53,33 GHz; 42,19 GHz se manifestă în dependență de frecvență și durata de iradiere. Efectul biologic al undelor milimetrice are un prag temporar, 20 minute, după care expunerea levurii la iradiere nu conduce la mărirea efectului biologic [62, 89].
2. Procedul elaborat de cultivare a *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, care include etapa de iradiere a inoculului cu undele milimetrice 53,33 GHz timp de 20 minute asigură rentabilitate, datorită creșterii cantității de β -glucani în biomasa levuriană cu 25,7% față de martor [7, 62].
3. Tehnologia complexă de producere a β -glucanilor, elaborată în baza elementelor noi – tulpinii de levuri cu capacități biotehnologice performante, mediilor nutritive eficiente, condițiilor optimizate de cultivare în profunzime, tratarea materialului semincer cu unde milimetrice cu frecvență extra înaltă, aplicarea procedurii modificat de extracție a β -glucanilor, permite obținerea cu 68,2...91,7% mai mult produs comparativ cu tehnologia martor [20, 24].
4. Furajul combinat pentru creșterea puietului de pești fitofagi, ce conține în componența sa bioprodusul Glucan-20 în cantitate de 0,1-0,5 unit. masă, %, duce la sporirea cu 22,0-26,7% a ratei de supraviețuire, cu 16,9-24,0% a masei medii a unei larve și cu 45,2-56,3% a ihtiomasei generale medii [8, 25].

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Realizarea cercetărilor și analiza rezultatelor obținute în cadrul tezei de doctor „**Tehnologie de obținere a β-gluconilor din levuri**” au condus la formularea următoarelor concluzii:

1. Parametrii biotehnologici determinați de cultivare dirijată a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, contribuie la eficientizarea tehnologiei de producere a β-gluconilor cu utilizări polivalente, în vederea aplicării lor în diferite domenii.
2. Mediile de cultură optimizate R-ZZ și YPD-4 și condițiile de cultivare, valorile de temperatură – 25°C, aerație – 81,3...83,3 mg O₂/L, durata de cultivare – 120 ore, specifice tulpinii producătoare, sporesc producerea de β-gluconi la levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 cu 32,8% și respectiv 52,4% [13, 21, 22].
3. Efectele nanoparticulelor TiO₂ și ZnO asupra biosintezei β-gluconilor și altor componente celulare sunt determinate de dimensiunea acestora, concentrația și durata de contact cu tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Nanoparticulele ZnO cu dimensiuni de 30 nm, în concentrație de 5-10 mg/L se manifestă ca factor de stimulare a biosintezei β-gluconilor la levuri [14, 254].
4. Nanoparticulele ZnO, în prezența concentrațiilor de 2% și 5% alcool etilic, intensifică procesele de biosinteză a β-gluconilor, conținutul cărora în biomasa *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 crește cu 19,9% mai mult față de probele martor, dar nu asigură intensificarea biosintezei proteinelor [88].
5. Caracterul acțiunii undelor milimetrice cu frecvențele 60,12 GHz; 53,33 GHz; 42,19 GHz asupra levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 este determinat de frecvența și durata de iradiere. Aplicarea undelor cu frecvența f=53,33 GHz timp de 20 minute la etapa preparării materialului semincer, permite majorarea conținutului de β-gluconi în biomasa celulară cu 25,7% mai mult față de martor, astfel se propune o cale nouă de reglare a biosintezei β-gluconilor la levuri [7, 12, 20, 62, 89].
6. Tehnologia complexă de producere a β-gluconilor, elaborată în baza elementelor noi – tulpina de levuri cu capacități biotehnologice performante, medii nutritive eficiente, condiții optimizate de cultivare în profunzime, tratarea materialului semincer cu unde milimetrice cu frecvență extra înaltă, aplicarea procedurii modificat de extracție a β-gluconilor, permite obținerea a 0,81...1,26 g/L bioprodus, comparativ cu 0,42...0,75 g/L β-gluconi ai tehnologiei martor [24].
7. Preparatul elaborat în baza β-gluconilor, extrași din levuri, manifestă activitate biologică, exprimată prin sporirea cu 22,0-26,7% a ratei de supraviețuire, cu 16,9-24,0% a masei

medii a unei larve și cu 45,2-56,3% a ihtiomasei generale medii a peștilor fitofagi, ceea ce indică asupra perspectivei utilizării lui în domeniul pisciculturii [8, 25].

Problema științifică importantă soluționată în lucrare. Au fost determinați parametrii biotehnologici optimali de cultivare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, ceea ce a contribuit la eficientizarea procedeeleor de sinteză orientată a β -glucanilor, fapt ce a permis elaborarea tehnologiei de obținere a acestor compuși biologic activi valoroși.

Aportul personal. În materialele care reflectă conținutul brevetelor de invenție autoarei îi revine cota parte în corespundere cu lista autorilor. Toate celelalte rezultate obținute, analiza lor, generalizările și concluziile aparțin autoarei.

Recomandări practice

Se recomandă:

1. Tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în calitate de sursă de β -glucani cu utilizări polivalente.
2. Două variante de medii nutritive, care asigură sporirea semnificativă a cantității de β -glucani în biomasa levuriană;
3. Două procedee de sinteză orientată a β -glucanilor cu aplicarea nanoparticulelor oxizilor de metale și undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă ca factori reglatori;
4. Tehnologia de obținere a β -glucanilor din *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pentru producerea industrială a bioproduselor naturale glucanice;
5. Bioprodusul Glucan-20 pentru utilizare în piscicultură și alte domenii.

Sugestii privind cercetări de perspectivă

1. Sunt de perspectivă cercetările în vederea procesării lichidului cultural, rezultat din producerea biomasei de levuri, datorită conținutului său sporit de componente valoroase: exopolizaharide, vitamine, aminoacizi.
2. Se propun cercetări de determinare a proprietăților imunomodulatoare și anticancerigene ale β -glucanilor obținuți din biomasa levuriană.
3. Sunt de perspectivă cercetările pentru dezvoltarea industrială și experimentală la nivel pilot pentru stabilirea parametrilor tehnologici optimi.

BIBLIOGRAFIE:

În limba română

1. Anghel I. ș.a. Biologia și tehnologia drojdiilor. București: Ed. Tehnică, 1993, vol. 3. 308 p.
2. Anghel I. ș.a. Biologia și tehnologia drojdiilor. București: Ed. Tehnică. 1991, vol. 2. 385 p.
3. Brevet de invenție. 3792 MD. Furaj pentru larve și puiet de pește / Agafia Usafii, Oleg Chiselița, Oleg Crepis, Natalia Chiselița ș. a. (MD) BOPI nr. 1/2009.
4. Brevet de invenție. 4048 C1, MD, C12N 1/16 C12P 39/00. Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* – sursă de β -glucani/ Chiselița O. ș. a. (MD). Cerere depusă 12.02.2010, BOPI nr. 6/2010.
5. Brevet de invenție. 4086 MD, C12N 1/16, C 12 F 7/64. Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpinii de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 / Oleg Chiselița, Agafia Usafii, Natalia Chiselița, Aurelian Gulea. (MD). Cererea depusă 2010.09.08, BOPI nr. 12/2010.
6. Brevet de invenție. 4205 MD. Metodă de determinare a activității catalazei. /Nadejda Efremova, Agafia Usafii, Elena Molodoi (MD). BOPI nr. 2/2013.
7. Brevet de invenție. MD 4329. Procedeu de cultivare a tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 / Agafia Usafii, **Natalia Chiselița** ș. a. (MD). BOPI nr. 2/2015.
8. Brevet de invenție. MD 717. Furaj pentru puiet de pești fitofagi / Agafia Usafii, Ana Dadu, **Natalia Chiselița**, Marin Usafii. (MD). BOPI nr. 1/2014.
9. Buteică S. A. 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.
10. **Chiselița N.** Efectele undelor milimetrice asupra procesului de dezvoltare a populației levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în funcție de durata iradierii. În: Studia Universitatis Moldaviae, seria „Științe reale și ale naturii”. 2014, vol. 1(71), p. 67-72.
11. **Chiselița N.** Influența nanoparticulelor ZnO asupra tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 în condiții de stres alcoolic. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2017, Nr. 1(331), p. 124-132.
12. **Chiselița N.,** ș.a. Efectele undelor milimetrice asupra viabilității și caracterelor morfoculturale ale tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2014, Nr. 1(322), p. 112-119.
13. **Chiselița N.,** ș.a. Optimizarea matematică a mediului de cultură pentru producerea β -glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Studia Universitatis, seria „Științe ale naturii”. 2013, vol. 6(66), p. 49-53.
14. **Chiselița N.,** Usafii A. Efectul nanoparticulelor ZnO asupra parametrilor bioprodactivi ai tulpinii biotehnologice de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2016, Nr. 2(329), p. 134-141.
15. Marinescu Constantin G. Cercetări privind valorificarea biomasei de drojdie reziduală din industria berii. Rezumat teză de doctorat. Galați, 2011. 40 p.
16. Moldoveanu D.; Militaru C.; Moldoveanu I. Microbiologie și inginerie genetică. București: Fiat Lux, 2001. 352 p.
17. Oniscu C., Cașcaval D. Inginerie biochimică și biotehnologie. 1. Ingineria proceselor biotehnologice. Iași: Inter Global, 2002. 451 p.

18. Simion A. Radoi, ș.a. Materiale nanostructurate: aplicații practice în nanomedicină și biosenzoristică. În: Workshop-ul „Nano Sisteme Dinamice: de la Concepte la Aplicații Senzoristice” Centrul Internațional de Biodinamică, București, 22-23 sept. 2010, p. 26.
19. Usatfi A., **Chiselita N.** Metode de extragere din levuri a glucanilor și proprietățile lor fizico-chimice. În: Buletinul AȘM. Științele vieții. 2015, Nr. 1(325), p. 153-160.
20. Usatfi A., **Chiselita N.** Soluții inovative de cultivare a levurilor producătoare de β-glucani. În: Intellectus. 2016, Nr. 4, p. 77-80.
21. Usatfi A., **Chiselita N.**, ș.a. Substraturi nutritive pentru dezvoltarea și biosinteza maximală a β-glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Buletinul AȘM. Științele vieții. 2013, Nr. 3(321), p. 123-131.
22. Usatfi A., **Chiselita N.**, ș.a. Rolul condițiilor de cultivare în biosinteza β-glucanilor la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2013, Nr. 2(320), p. 116-125.
23. Usatfi A., ș.a. *Saccharomyces carlsbergensis* CNMN-Y-15 la cultivare în prezența compușilor coordinați ai Mn(II), Cr(II) și Zn(II). În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. Chișinău, 2009, vol. 1(307), p. 142-147.
24. Usatfi A., Molodoi E., **Chiselita N.**, ș.a. Biotehnologii de obținere din levuri a β-glucanilor și manoproteinelor. În: Akademos. 2015, Nr. 1(36), p. 87-91.
25. Usatfi M., Dadu A., Usatfi A., **Chiselita N.** Fortificarea viabilității și indicilor de creștere a puietului de covaș (*Ctenopharyngodon idella*) prin utilizarea tescovinei de struguri și bioproduselor levuriene. În: Știința Agricolă. 2013, Nr. 2, p. 101-105.
26. Zarnea G., Mihăescu Gh., Velahorschi T. Principii și tehnici de microbiologie generală. București, 1992. vol. 1. 141 p.
În limba rusă
27. Андреев А. В. Применение электромагнитного излучения крайне высокой частоты мм-диапазона и препарата «Этасульфон» при бронхопневмонии телят. Автореф. Дисс. канд ветерин. наук. По специальности 06.02.01 - «Диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных». п. Персиановский, 2012. 22 с.
28. Бабицкая В. Г., и др. Факторы, влияющие на образование полисахаридов *G. lucidum*. В: Прикл. Биохим. и Микробиол., 2005, т. 41(2), с. 194-199.
29. Бескаравайная Е., Митрошин И., Харыбина Т. Тематическая коллекция «Влияние миллиметровых волн КВЧ-диапазона на биологические объекты». В: Информационные ресурсы России, 2009, №1, с. 14-16.
30. Бецкий О., Девятков Н. Электромагнитные миллиметровые волны и живые организмы. В: Радиотехника, 1996, № 9-10, с. 4-10.
31. Бецкий О. В., Котровская Т. И., Лебедева Н. Н. Миллиметровые волны в биологии и медицине. 3 Всерос. Конф. Радиолокация и радиосвязь, 2009, ИРЭ РАН, 26-30 октября 2009, с. 146-150.
32. Бецкий О. В., Лебедева Н. Н. Биологические эффекты миллиметровых волн низкой интенсивности. //12th Int.Crimean Conference “Microwave & Telecommunication Technology”(CriMiCo'2002). 2002, 9-13september, Sevastopol, Crimea, Ukraine.

- ©2002:CriMiCo'2002 Organizing Committee; Weber Co.ISBN: 966-7968-12-X. IEEE Catalog Number: 02EX570.
33. Бурцева С. А., Маслоброд С. Н., Бырса М. Н. Оценка влияния миллиметрового излучения на биологическую активность экзометаболитов стрептомицетов. В: Материалы XXIII Международного Симпозиума «Охрана био-ноосферы. Нетрадиционное растениеводство. Эниология. Экология и здоровье», 2014, Алушта, 7-14 сент., с. 733-739.
 34. Буряков Н. П., Бурякова М. А., Миронов М. М. Показатели обмена веществ и продуктивности цыплят-бройлеров при использовании в кормлении пребиотика «Сель Ист». В: РВЖ СХЖ 2015, № 1, с. 13-15.
 35. Гапеев А. Б., Чемерис Н. К. Механизмы биологического действия электромагнитного излучения крайне высоких частот на уровне организма. В: Биомедицинская радиоэлектроника, 2007, №8-9, с. 30-46.
 36. Гапеев А. Б., Чемерис Н. К. Механизмы биологического действия электромагнитного излучения крайне высоких частот на клеточном уровне. В: Биомед. технологии и радиоэлектроника, 2007, N 2(4), с. 44-61.
 37. Калюжин О. В., и др. Влияние композиции клеточных стенок *Bifidobacterium bifidum* и *Saccharomyces cerevisiae* на выживаемость мышей в условиях экспериментального сепсиса. В: Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье", 2012, № 3, с. 10-14.
 38. Мазуркова Н. А. и др. «Взаимодействие наночастиц диоксида титана с вирусом гриппа». Российские нанотехнологии, 2010, № 5-6.
 39. Маслоброд С. Н., и др. Влияние миллиметрового излучения на жизнеспособность растений. Изменение метаболизма семян при опосредованном воздействии фактора. В: Электронная обработка материалов, 2011, том 47, №1, с. 81-86.
 40. Осадчая А. И., и др. Способность бактерий рода *Bacillus* гидролизовать ксилан. В: Мікробіол. і Біотехнол., 2009, т. 7, с. 63-69.
 41. Савельев С. В., Бецкий О. В., Морозова Л. А. Основные положения теории действия миллиметровых волн на водосодержащие и живые биологические объекты. В: Журнал Радиоэлектроники, 2012, № 11, с. 1-12.
 42. Сырбу Т. Ф., и др. Влияние салицилатных и фууроатных комплексных соединений железа на образование каталазы грибами рода *Penicillium*. В: Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі, 2011, нр. 3, с. 57-61.
 43. Феофилова Е. П. и др. Состав и содержание хитин-глюканового комплекса в онтогенезе гриба *A. niger*. В: Прикл. Биохим. и Микробиол., 2006, т. 42(6), с. 624-628.
În limba engleză
 44. Abramova A., et al. An ultrasound-assisted sol-gel method for the synthesis of nano titanium dioxide. In: Moldavian Journal of the Physical Sciences, 2016, vol. 15(1-2), p. 49-53.
 45. Abu-Lail N. I., Camesano T. A. Polysaccharide properties probed with atomic force microscopy. In: Journal of Microscopy, 2003, vol. 212, p. 217-238.
 46. Aebi H. Catalase in Vitro. In: Methods in Enzymology, 1984, no. 105, p. 121-126.

47. Aguilar-Uscanga B., et al. Effect of *Agave tequilana* juice on cell wall polysaccharides of three *Saccharomyces cerevisiae* strains from different origins. In: Antonie van Leeuwenhoek. 2007, V. 91, nr. 2, p. 151-157.
48. Aguilar-Uscanga B., François J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. In: Lett. Appl. Microbiol., 2003, vol. 37(3), p. 268-274.
49. Ahmad A., et al. Perspective of β -Glucan as Functional Ingredient for Food Industry. In: J. Nutr. Food Sci., 2012, vol. 2(2), p.1-6.
50. Ahmed Istiaque, Istivan T., Pirogova E. Irradiation of *E. coli* by extremely-low frequency (ELF) pulsed electromagnetic fields (PEMF): evaluation of bacterial survival. In: JEMWA, 2015, vol. 29(1), p. 26-37.
51. Albeituni S.H., Yan Jun. The Effects of β -Glucans on Dendritic Cells and Implications for Cancer Therapy. In: Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents), 2013, vol. 13(5), p. 689-698.
52. Anton E., et al. Links between extremely high frequency electromagnetic waves and their biological manifestations. In: Archives of Biological Sciences, 2015, vol. 67(3), p. 895-897.
53. Ariane Fernanda da Silva, et al. Anticlastogenic effect of β -glucan, extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, on cultured cells exposed to ultraviolet radiation. In: Cytotechnology, 2013, vol. 65, p. 41-48.
54. Arora S., Radjwade J. M., Paknikar K. M. Nanotoxicology and *in vitro* studies-the need of the hour. In: Toxicol Appl Pharmacol., 2012, vol. 258, p. 151-165.
55. Auinger A., et al. Yeast (1,3)-(1,6)-beta-glucan helps to maintain the body's defence against pathogens: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicentric study in healthy subjects. In: European Journal of Nutrition, 2013, vol. 52(8), p. 1913-1918.
56. Backhaus K., et al. Milk and sugar: regulation of cell wall synthesis in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*. In: Eur. J. Cell Biol., 2011, vol. 90, p. 745-750.
57. Badia R., et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* and β -galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged *in vitro* with *Escherichia coli* F4 (K88). In: Vet. Res., 2012, vol. 43(4), p. 1-11.
58. Balasundaram B., Harrison S., Bracewell D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. In: Trends Biotechnol., 2009, vol. 27, p. 477-485.
59. Ban D. K., Subhankar P. 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.
60. Barberis M., et al. Cell size at S phase initiation: an emergent property of the G1/S network PLoS. In: Comput. Biol. 2007, Vol. 13, N. 3(4), p. 64.
61. Bayr E., et al. The effects of different intensities, frequencies and exposure times of extremely low-frequency electromagnetic fields on the growth of *S. aureus* and *E. coli* O157:H7. In: Electromagnetic Biol. and Medicine, 2015, vol. 34(1), p. 14-18.
62. Bejenaru L., Usatfi A., Tofan E., **Chiselita N.**, Efremova N. Modification of Biomass Production and Biochemical Composition of *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-18 and *Saccharomyces Cerevisiae* CNMN-Y-20 Yeasts under the Action of Extremely High Frequency Electromagnetic Radiation. In: Surface Engineering and Applied Electrochemistry. Elektronnaya Obrabotka Materialov. 2017, Vol. 53, Nr. 1, p. 71-76.

63. Belinchón M. M., Gancedo J. M. Glucose controls multiple processes in *S. cerevisiae*. through diverse combinations of signaling pathways. In: FEMS Y. Res., 2007, vol. 7(6), p. 808-818.
64. Berit A., et al. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review. In: Mol. Nutr. Food Res., 2014, vol. 58, p. 183-193.
65. Berthels N. J., et al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *S. cerevisiae* wine yeast strains. In: FEMS Y. Res., 2004, vol. 4(7), p. 683-689.
66. Beuse M., et al. O₂, pH value, and carbon source induced changes of the mode of oscillation in synchronous continuous culture of *S. cerevisiae*. In: Biotechnol. Bioeng. 1999, vol. 20, nr 63(4), p. 410-417.
67. Blazejak St., et al. Impact of magnesium and mannose in the cultivation media on the magnesium biosorption, the biomass yield and on the cell wall structure of *Candida utilis* yeast. In: Eur. Food Res. Technol., 2008, vol. 227, p. 695-700.
68. Borchani Ch., et al. Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). In: Food Chemistry, 2014, vol. 163, p. 108-113.
69. Borchani Ch., et al. Structural Characterization, Technological Functionality and Physiological Aspects of Fungal β -D-Glucans: A Review. In: Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, vol. 56(10), p. 1746-1752.
70. Brian K. McFarlin, et al. Baker's Yeast Beta Glucan Supplementation Increases Salivary IgA and Decreases Cold/Flu Symptomatic Days After Intense Exercise. In: Journal of Dietary Supplements, 2013, vol. 10(3), p. 171-183.
71. Broadway P. R., Carroll J. A., Burdick Sanchez N. C. Live Yeast and Yeast Cell Wall Supplements Enhance Immune Function and Performance in Food-Producing Livestock: A Review. In: Microorganisms, 2015, vol. 3, p. 417-427.
72. Bruna Leonel Goncalves, et al. The in vitro ability of different *Saccharomyces cerevisiae* - Based products to bind aflatoxin B1. In: Food Control, 2015, vol. 47, p. 298-300.
73. Burtseva S. A., et al. Effect of Millimeter Electromagnetic Radiation on the Protein Content and Amino Acid Composition of *Streptomyces* Biomass. In: Surface Engineering and Applied Electrochemistry, 2012, vol. 48(4), p. 359-364.
74. Bzducha-Wróbel A., Błażej St., Tkacz K. Cell wall structure of selected yeast species as a factor of magnesium binding ability. In: Eur. Food Res. Technol., 2012, vol. 235(2), p. 355-366.
75. Bzducha-Wrobel A., et al. Biosynthesis of β (1,3)/(1,6)-glucans of cell wall of the yeast *C. utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol. In: Eur. Food Res. Technol., 2015, vol. 240(5), p. 1023-1034.
76. Bzducha-Wrobel A., et al. Evaluation of the Efficiency of Different Disruption Methods on Yeast Cell Wall Preparation for β -Glucan Isolation. In: Molecules, 2014, vol. 19, p. 20941-20961.
77. Bzducha-Wróbel A., Kieliszek M., Błażej St. Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source. In: Eur. Food Res. Technol., 2013, vol. 237(4), p. 489-499.
78. Cabib E., Blanco N., Arroyo J. Presence of a large beta(1-3)glucan linked to chitin at the *Saccharomyces cerevisiae* motherbudneck suggests involvement in localized growth control. In: Eukaryotic cell, 2012, vol. 11 (4), p. 388-400.

79. Campetelli A. N., et al. Activation of the plasma membrane H⁺-ATPase of *S. cerevisiae*. by glucose is mediated by dissociation of the H⁺-ATPase acetylated tubulin complex. In: FEBS J., 2005, vol. 272(22), p. 5742-5752.
80. Carpenter K. C., et al. Baker's yeast β-glucan supplementation increases monocytes and cytokines post-exercise: implications for infection risk? In: British Journal of Nutrition, 2013, vol. 109, p. 478-486.
81. Chagas B., et al. Chitin-glucan complex production by *Komagataella (Pichia) pastoris*: impact of cultivation pH and temperature on polymer content and composition. In: New Biotechnology, 2014, vol. 31(5), p. 468-474.
82. Charoenchai C., Fleet G., Henschke P. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth rates and cells biomass of wine yeasts. In: Am. J. of Enol. and Viticul., 1998, vol. 49, p. 283-288.
83. Chen Jiezhong, Zhang Xu Dong, Jiang Zhengyi. The Application of Fungal Beta-glucans for the Treatment of Colon Cancer. In: Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2013, vol. 13(5), p. 725-730.
84. Chen Jiezhong. Recent Advance in the Studies of Beta-glucans for Cancer Therapy. In: Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2013, vol. 13(5), p. 679-680.
85. Chen S. C.-A., Slavin M. A., Sorrell T. C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections. In: Drugs, 2011, vol. 71, p. 11-41.
86. Chi Z. M., Zhao S. Z. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. In: Enzym. Microb. Technol., 2003, vol. 33, p. 206-211.
87. Chin-Hang S., Ko-Jung L., Bor-Jiun W. Effects of culture temperature on the production of bioactive polysaccharides by *A. blazei* in batch cultures. In: J. of Chem. Technol. & Biotechnol., 2007, vol. 82(9), p. 831-836.
88. **Chiselita N.**, Usatii A., Efremova N. The effects of ZnO nanoparticles in combination with alcohol on biosynthetic potential of *Saccharomyces cerevisiae*. În: Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology, 2017, v. XXI (2), p. 19-24.
89. **Chiselita N.**, et.al. Biosynthetic potential of *Saccharomyces yeasts* at the treatment with extremely high frequency millimeter waves. În: Analele Universității din Oradea - Fascicula Biologie. 2016, v. XXIII (1), p. 12-16.
90. Chris D. P., David E. Q., Smart K. A. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. In: FEMS Y. Res., 2003, vol. 3(2), p. 149-157.
91. Cifra M., et al. Ultra Low Frequency Yeast Cells Electric Activity. In: Microwave Technigues, 2008, COMITE 2008, 14 th Conferece on Microwave Techniques, Prague, Czech Republic, 23-24 april 2008, p. 1-4.
92. Citlali Garcia Saucedo. Developing a Yeast Cell Assay for Measuring the Toxicity of Inorganic Oxide Nanoparticles. Chemical & Environmental Engineering Departament University of Arizona. May 6th 2010. http://www.erc.arizona.edu/seminar/Current-2010/CitlaliGarcia_UA_5-6-10.pdf
93. Coulon J., et al. Glycosylated Quantum Dots for the Selective Labelling of *K. bulgaricus* and *S. cerevisiae* Yeast Strains. In: J. Fluoresc., 2010, vol. 20, p. 591-597.

94. Davidson J. F., et al. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *S. cerevisiae*. In: Proc. Natl. Acad. Sci. 1996, V. 93, N.10, p. 5116-5121.
95. De Araujo T. V., et al. Effects of beta-glucans ingestion (*S. cerevisiae*) on metabolism of rats receiving high-fat diet. In: J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 2017, vol. 101(2), p. 349-358.
96. De Oliveira Silva V., et al. β -Glucans (*S. cerevisiae*) Reduce Glucose Levels and Attenuate Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats with Periodontal Disease. In: PLoS One, 2015, vol. 10(8): e0134742.
97. De Vita A., et al. Nonlinear interaction of electromagnetic radiation the cell membrane level: response to stochastic fields. In: Progress In Electromagnetics Research B, 2011, vol. 33, p. 45-67.
98. Demirdoven A., Baysal T. The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. In: Food Rev. Int., 2009, vol. 25, p. 1-11.
99. Deryabin D. G., et al. Comparative sensitivity of the luminescent *Photobacterium phosphoreum*, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis* strains to toxic effects of carbon-based nanomaterials and metal nanoparticles. In: Microbiology, 2016, 85(2), p. 198-206.
100. Desai Kiran M., et al. Use of an artificial neural network in modeling yeast biomass and yield of β -glucan. In: Process Biochemistry. 2005, vol. 40 p. 1617-1626.
101. Dey P., Harborn J. Methods in Plant Biochemistry. Carbohydr. Academic Press, 1993, vol. 2. 529 p.
102. Ding S. Y., Himmel M. E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. In: J. Agric. Food Chem., 2006, vol. 54, p. 597-606.
103. Dong-Ho Seo, et al. Effects of millimeter wave treatment on the germination rate and antioxidant potentials and gamma-aminobutyric acid of the germinated brown rice. In: Food Science and Biotechnology, 2016, vol. 25(1), p. 111-114.
104. Du B., Bian Z., Xu B. Skin health promotion effects of natural beta-glucan derived from cereals and microorganisms: a review. In: Phytother Res., 2014, vol. 28(2), p. 159-166.
105. Du Bin, et al. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. In: Trends in Food Science & Technology, 2015, vol. 41(1), p. 49-59.
106. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the safety of "yeast beta-glucans" as a novel food ingredient. In: EFSA J., 2011, 9(5), p. 2137.
107. Egorova E., Kubatiev A., Schvets V. Biological Effects of Metal Nanoparticles. Springer International Publishing, 2016. 292 p.
108. Elba M. Alcazar V., et al. Extracción y cuantificación de los polisacáridos de la pared celular de las levaduras. In: e-Gnosis [online], 2016, vol. 14(2), art. 2, p. 1-7.
109. El-Diasty E. M., et al. Antifungal activity of ZnO Nanoparticles against dermatophytic lesions of cattle. In: Romanian J. Biophys., 2013, vol. 23(3), p. 191-202.
110. El-Said Karim Samy, et al. 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, vol. 12(1), p. 48-57.
111. Farkas V. Structure and biosynthesis of fungal cell walls: methodological approaches. In: Folia Microbiology, 2003, vol. 48(4), p. 469-478.

112. Feng Shi, Jikui Shi, Yongfu Li. Mechanochemical phosphorylation and solubilisation of β -D-Glucan from Yeast *S. cerevisiae* and its biological activities. In: PLoS One, 2014, vol. 9(7), e103494.
113. Forsberg H., Ljungdahl, P. O. Genetic and bioch. analysis of the yeast plasma membrane Sy1p-Ptr3p-Sy5p sensor of extracellular amino acids. In: Mol. Cell Biol., 2001, vol. 21, p. 814-826.
114. Francois J. M. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. In: Nature Protocols, 2006, vol 1(6), p. 2995-3000.
115. Freimund S., et al. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *S. cerevisiae*. In: Carbohydrate Polymers. 2003, vol.54, p. 159-171.
116. Gamaiurova V., Krinitskaya A., Astrahantseva M. The influence of EHF EMR non-thermal intensity on the growth of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. In: Biomed. Technologies and Radioelectronics, 2004, vol. 1-2, p. 117-120.
117. Garello F., et al. Successful Entrapping of Liposomes in Glucan Particles: An Innovative Micron-Sized Carrier to Deliver Water-Soluble Molecules. In: Mol. Pharmaceutics, 2014, 11 (10), p. 3760-3765.
118. Garkusha O. M., et al. Influence of Low-Intensity Electromagnetic Millimeter Radiation on the Vital Activity of *S. cerevisiae* Cells. In: Biophysics, 2008, vol. 53(5), p. 402-405.
119. Giavasis I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. In: Current Opinion in Biotechnology, 2014, vol. 26, p. 162-173.
120. Giavasis I. Production of microbial polysaccharides for use in food. In Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals. Edited by McNeil B, Archer D, Giavasis I, Harvey L. Woodhead Publishing; 2013. 656 p.
121. Gopal Rao M., Bharathi P., Akila R.M. A comprehensive review on biopolymers. In: Sci. Revs. Chem. Commun., 2014, vol. 4(2), p. 61-68.
122. Gromozova E. N., Voychuk S.I. Influence of radiofrequency EMF on the yeast *S. cerevisiae* as model eukaryotic system. Inst. of Microbiol. and Virology, NAS Ukraine, 2005, p.167-175.
123. Guțul T., et. al. Preparation of poly(N-vinylpyrrolidone)-stabilized ZnO colloid nanoparticles. In: Beilstein J. Nanotechnol., 2014, vol. 5, p. 402-406.
124. Hashimoto K. Comprehensive analysis of glycosyltransferases in eukaryotic genomes for structural and functional character of glycans. In: Carbohydr. Res., 2009, vol. 344(7), p. 881-887.
125. Hassan A. A., Howayda M. E., Mahmoud H. H. Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Growth of Mycotoxigenic Mould. In: SCPT., 2013, vol. 1(4), p. 66-74.
126. He L., et al. The difference between oats and beta-glucan extract intake in the management of HbA1c, fasting glucose and insulin sensitivity: A meta-analysis of randomized controlled trials. In: Food Funct., 2016, vol. 7(3), p. 1413-1428.
127. Hideki Aoyagi, Mikiko Ishizaka, Hideo Tanaka. Secretory production of cell wall components by *S. cerevisiae* protoplasts in static liquid culture. In: Biotechnology Letters, 2012, vol. 34(4), p. 695-700.
128. Hong-Zhi Liu, et al. Effects of spaceflight on polysaccharides of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. In: Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008, nr 81, p. 543-550.

129. Hong-Zhi Liu, et al. Statistical Optimization of Culture Media and Conditions for Production of Mannan by *Saccharomyces cerevisiae*. In: Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2009, vol. 14(5), p. 577-583.
130. Hromadkova Z., et al. Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate (1–3) β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. In: Carbohydr. Polym., 2003, vol. 51, p. 9-15.
131. Huang Gangliang, Li Jing. Efficient preparation of alkali-insoluble (1,3)- β -D-glucan. In: Int. J. Food Sci. Nutr., 2012, vol. 63(2), p. 184-186.
132. Hurtado-Guerrero Ramon, et al. Molecular Mechanisms of Yeast Cell Wall Glucan Remodeling. In: J. of Biol. Chem., 2009, vol. 284(13), p. 8461-8469.
133. Javmen A., et al. β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* Induces IFN- γ Production In Vivo in BALB/c Mice. In: In Vivo, 2015, vol. 29, p. 359-364.
134. Javmen A., Grigiškis S., Gliebute R. β -glucan extraction from *S. cerevisiae* yeast using *A. rutgersensis* 88 yeast lysing enzymatic complex. In: Biologija, 2012, vol. 58(2), p. 51-59.
135. Jawhara S, et al. Modulation of Intestinal Inflammation by Yeasts and Cell Wall Extracts: Strain Dependence and Unexpected Anti-Inflammatory Role of Glucan Fractions. In: PLoS One, 2012, vol. 7(7), e40648.
136. Jesenak M., et al. β -Glucans in the treatment and prevention of allergic diseases. In: Allergologia et Immunopathologia, 2014, vol. 42(2), p. 149-156.
137. Jie Tian, et al. β -Glucan enhances antitumor immune responses by regulating differentiation and function of monocytic myeloid-derived suppressor cells. In: Eur. J. Immunol., 2013, vol. 43, p.1220-1230.
138. Jun Yan, Daniel J. Allendorf, Brian Brandley. Yeast whole glucan particle (WGP) β -glucan in conjunction with antitumor monoclonal antibodies to treat cancer. In: Expert Opin. Biol. Ther., 2005, vol. 5(5), p. 691-702.
139. Kalantaryan V., et al. Influence of low intensity coherent electromagnetic millimeter radiation (EMR) on aqua solution of DNA. In: PIER Letters., 2010, vol. 13, p. 1-9.
140. Ka-Lung Lam, Peter Chi-Keung Cheung. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. In: Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, vol.2(1), p. 45-64.
141. Katayoon Nofouzi, et al. Influence of extremely low frequency electromagnetic fields on growth performance, innate immune response, biochemical parameters and disease resistance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Fish Physiology and Biochemistry, 2015, vol. 41(3), p. 721-731.
142. Kiran G. S., et al. Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardioopsis sp.* MSA13A. In: BMC Biotechnology, 2014, vol. 14, p. 48-57.
143. Klis F. M., Boorsma A., de Groot P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Yeast, 2006, vol. 23, p. 185-202.
144. Kopecka M., Yamaguchi M, Kawamoto S. Effects of the F-actin inhibitor latrunculin A on the budding yeast *S. cerevisiae*. In: Microbiology, 2015, vol. 161, p. 1348-1355.
145. Krinitskaya A., Suhanov P., Sedelinikov Iu. The influence of the effects of EHF-radiation on the activity of baker's yeasts. In: Millimeter waves in biol. and medicine, 2004, vol. 4, p. 17-27.

146. Krizková L., et al. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: mannan-human serum albumin and mannan-penicillin G acylase. In: *Mutat. Res.*, 2006, vol. 606(1, 2), p. 72-79.
147. Kuan-Chen Cheng, Ali Demirci, Jeffrey M. Catchmark. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, vol. 92(1), p. 29-44.
148. Kuhlwein H., et al. Effects of dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio L.*). In: *J. of Animal Physiol. and Animal Nutr.*, 2014, vol. 98(2), p. 279-289.
149. Kusmiati T., Rizky Dhewantara F.X. Cholesterol-Lowering Effect of Beta Glucan Extracted from *S. cerevisiae* in Rats. In: *Sci. Pharm.*, 2016, vol. 84(1), p. 153-165.
150. Kwang S.K., Hyun S.Y. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *S. cerevisiae*. In: *Enz. and Microb. Technol.*, 2006, vol. 39(3), p. 496-500.
151. Kwiatkowski S., et al. A study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucans. In: *J. Inst. Brew.*, 2009, vol. 115(2), p. 151-158.
152. Kwiatkowski S., Kwiatkofski S.E. Yeast (*S. cerevisiae*) Glucan Polysaccharides-Occurrence, Separation and Application in Food and Health Industries. The Complex World of Polysaccharides. (Ed. D.N. Karunaratne), In Tech, Croatia, 2012. 648 p.
153. Laroche C., Michaud P. New developments and prospective applications for β -(1,3)-glucans. In: *Recent Patents on Biotechnology*, 2007, vol. 1(1), p. 59-73.
154. Laugier Olga B., et al. The effects of repetitive alkaline/acid extractions of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall on antioxidative and bifidogenic efficacy. In: *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2012, vol. 47(2), p. 369-375.
155. Lesage G., Bussey H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2006, vol. 70(2), p. 317-343.
156. Levin David E. Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The Cell Wall Integrity Signaling Pathway. In: *Genetics*. 2011, vol. 189(4), p. 1145-1175.
157. Li Zhang, et al. Releasing polysaccharide and protein from yeast cells by ultrasound: Selectivity and effects of processing parameters. In: *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, vol. 21, p. 576-581.
158. Liepins J., et al. Drying enhances immunoactivity of spent brewer's yeast cell wall β -D-glucans. In: *Journal of Biotechnology*, 2015, vol. 206, p. 12-16.
159. Liu D., et al. Disruption and proteins release by ultrasonication of yeast cells. In: *Innov. Food Sci. Emerg.*, 2013, vol. 18, p. 132-137.
160. Liu X.Y., et al. A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Food Hydrocoll.*, 2008, vol. 22, p. 239-247.
161. Lobato R.V., et al. Metabolic effects of β -glucans (*S. cerevisiae*) per os administration in rats with streptozotocin-induced diabetes. In: *Nutr. Hosp.*, 2015, vol. 32(1), p. 256-264.
162. Lowry O., et. al. Protein measurment with the folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, p. 265-275.
163. Luo Y, et al. Effect of Yeast Cell Morphology, Cell Wall Physical Structure and Chemical Composition on Patulin Adsorption. In: *PLoS One*, 2015, vol. 10(8): e0136045.
164. Machi K., et al. Rot1p of *S. cerevisiae* is a putative membrane protein required for normal levels of the cell wall 1,6- β -glucan. In: *Microbiol.*, 2004, vol. 150, p. 3163-3173.

165. Machova E, Bystricky S. Antioxidant capacities of mannans and glucans are related to their susceptibility of free radical degradation. In: *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, vol. 61, p. 308-311.
166. Maedeh Galedar and Habibollah Younesi. Biosorption of ternary cadmium, nickel and cobalt ions from aqueous solution onto *S. cerevisiae* cells: batch and column studies. In: *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2013, vol. 9(1), p. 47-60.
167. Magnani M., et al. Optimized methodology for extraction of (1,3)(1,6)- β -D-glucan from *S. cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. In: *Carbohydrate Polymers*, 2009, vol. 78, p. 658-665.
168. Makar V. R., et al. Effect of cyclophosphamide and 61.22 GHz millimeter waves on T-cell, B-cell, and macrophage functions. In: *Bioelectromagnetics*, 2006, vol. 27(6), p. 458-466.
169. Mantovani M.S., et al. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. In: *Mut. Res.*, 2008, vol. 658(3), p. 154-161.
170. Many Josephine Nirmala and Kayal vizhi. Analysis of Different Extraction Methods on the Yield and Recovery of β -Glucan from Baker's Yeast (*S. cerevisiae*). In: *IJSET – Intern. J. of Innovative Science, Engineering & Technology*, 2014, vol. 1(6), p. 268-271.
171. Marambio-Jones C., Hoek E.M.V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. In: *J Nanopart. Res.*, 2010, vol. 12(5), p. 1531-1551.
172. Markkanen Ari. Effects of Electromagnetic Fields on Cellular Responses to Agents Causing Oxidative Stress and DNA Damage. Doctoral dissertation. Kuopio University Publications C. Natural and Environmental Sciences 253, 2009. 59 p.
173. Martinez F. E., Negrete J., Torres V. G. Structure and properties of Zn-Al-Cu alloy reinforced with alumina particles. In: *Mater. Des.*, 2003, vol. 24, p. 281-286.
174. Mastan S. A. Use of Immunostimulants in aquaculture disease management. In: *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2015, vol. 2(4), p. 277-280.
175. Michels C.A. In *Genetic Techniques for Biological Research: A Case Study Approach*. (Ed. John Wiley and Sons Eds), John Wiley & Sons Ltd, Chichester UK, 2002. 254 p.
176. Miest J. J., et al. Dietary β -glucan (MacroGard®) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota. In: *Fish and Shellfish Immunol.*, 2016, vol. 48, p. 94-104.
177. Miguel Pulido Rodriguez, et al. Influence of Live Cells or Cells Extract of *S. cerevisiae* on in Vitro Gas Production of a Total Mixed Ration. In: *Ital. J. Anim. Sci.*, 2015, vol. 14(4), p. 590-595.
178. Minju Jeong, et al. Cytotoxicity of Ultra-pure TiO₂ and ZnO Nanoparticles Generated by Laser Ablation. In: *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2013, vol. 34(11), p. 3301-3306.
179. Mitchell D. N., Godwin H.A., Claudio E. Nanoparticle Toxicity in *S. cerevisiae*: A Comparative Study Using Au Colloid, Ag Colloid, and H₂AuCl₄•3H₂O in Solution. In: *Nanoscape*, Spring, 2004, vol. 1, p. 59-69.
180. Mossman B. T., et al. Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular diseases. In: *Part. Fibre Toxicol.*, 2007, vol. 4, p. 4.
181. Mrinmoy De, Partha S. Ghosh, and Vincent M. Rotello. Applications of Nanoparticles in Biology. In: *Adv. Mater.*, 2008, vol. 20, p. 4225-4241.

182. Mudasir A. D., Avinash I., Mahendra R. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. In: Nanomedicine: Nanotechnol., Biol. and Medicine, 2013, vol. 9(1), p. 105-110.
183. Na Lei, et al. Effects of Low Molecular Weight Yeast β -Glucan on Antioxidant and Immunological Activities in Mice. In: Int. J. Mol. Sci., 2015, vol. 16(9), p. 21575-21590.
184. Naruemon M., et al. Influence of additives on *Saccharomyces cerevisiae* β -glucan production. In: International Food Research Journal., 2013, vol. 20(4), p. 1953-1959.
185. Nasr N.F. Applications of Nanotechnology in Food Microbiology. In: Int.J. Curr. Microbiol. App. Sci., 2015, vol. 4(4), p. 846-853.
186. Nedjoud, G., et.al. Effect of zinc on growth, metabolism and activity of antioxidant enzymes in the yeast *S. cerevisiae*. In: Glob. J. Biodivers. Sci. Manag., 2013, nr 3(2), p. 243-248.
187. Nicolaz C. N., et al. Study of narrow band millimeter-wave potential interactions with endoplasmic reticulum stress sensor genes. In: Bioelectromagnetics. 2009, vol. 30(5), p. 365-373.
188. Nicolaz C. N., et al. Absence of direct effect of low-power millimeter-wave radiation at 60.4 GHz on endoplasmic reticulum stress. In: Cell Biol. Toxicol. 2009, vol. 25(5), p. 471-478.
189. Noppawat Pengkumsri, et al. Extraction of β -glucan from *S. cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. In: Food Sci. Technol., Campinas, 2017, vol. 37(1), p. 124-130.
190. Nowak J., Lasik M. High temperature bioremediation of potato industry wastewaters by bacteria mixed culture. In: Nauka Przyroda Technologie, 2009, vol. 3(4), p. 1-10 (In Polish).
191. Okada H., et al. Multiple functional domains of the yeast 1,3- β -glucan synthase subunit Fks1p revealed by quantitative phenotypic analysis of temperature sensitive mutants. In: Genetics, 2010, vol. 184, p. 1013-1024.
192. Oncul S., et al. Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on bacterial membrane. In: International Journal of Radiation Biology, 2016, vol. 92(1), p. 42-49.
193. Otero-Gonzalez Lila, et al. Toxicity of TiO₂, ZrO₂, FeO, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. In: Chemosphere, 2013, vol. 93, p. 1201-1206.
194. Padrova K., et al. Enhancing the lipid productivity of yeasts with trace concentrations of iron nanoparticles. In: Folia Microbiol. (Praha), 2016, vol. 61(4), p. 329-335.
195. Parrou J., et.al. Dynamic response of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitation in *S. cerevisiae*. In: Yeast. 1999, vol. 15, p. 191-203.
196. Patent EP2091352 A2. Animal feeds and veterinary compositions. Elvebo Odd. Biotec Pharmacon ASA, Application date: 13.10.2007, Publication date: 26.08.2009.
197. Patent US 5322841A, Int. Cl.⁵ A61K 31/715. Method for producing neutral glucans for pharmaceutical applications. Jamas S. E., Davidson Easson D., Ostroff G.R., Alpha-Beta Technology, Inc., Application date: 02.11.1992, Publication date: 21.06.1994.
198. Patent US 5622939A, Int. Cl.⁵ A61K 31/715. Glucan preparation. Jamas S. E., Davidson Easson D., Ostroff G. R., Alpha-Beta Technology, Inc., Application date: 21.08.1992, Publication date: 22.04.1997.
199. Perez Espitia P. J., et al. Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications. In: Food Bioprocess Technol., 2012, vol. 5, p. 1447-1464.

200. Petit J., Wiegertjes G. F. Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish. In: Dev. Comp. Immunol., 2016, vol. 64, p. 93-102.
201. Pillet F., et al. Uncovering by atomic force microscopy of an original circular structure at the yeast cell surface in response to heat shock. In: BMC Biology, 2014, vol. 12(1), p. 2-24.
202. Piotrowska Małgorzata, Masek Anna. *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Components as Tools for Ochratoxin A Decontamination. In: Toxins, 2015, vol. 7(4), p. 1151-1162.
203. Pirogova E., Vojisavljevic V., Cosic I. Biological effects of electromagnetic radiation, Biomedical Engineering, Carlos Alexandre Barros de Mello (Ed.), Vukovar: InTech, 2009. 658 p.
204. Pişkin S., Palantöken A., and Yılmaz M.S. Antimicrobial Activity of Synthesized TiO₂ Nanoparticles. In: International Conference on Emerging Trends in Engineering and Technology (ICETET'2013), Patong Beach, Phuket (Thailand), Dec. 7-8, 2013, p. 91-94.
205. Pooley David T. Bacterial Bioluminescence, Bioelectromagnetics and Function. In: Photochemistry and Photobiology, 2011, vol. 87(2), p. 324-328.
206. Quiñones-Jurado Zoe Vineth, et al. Silver Nanoparticles Supported on TiO₂ and Their Antibacterial Properties: Effect of Surface Confinement and Nonexistence of Plasmon Resonance. In: Materials Sciences and Applications, 2014, vol. 5, p. 895-903.
207. Rahar S., et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. In: J. Adv. Pharm. Technol. Res., 2011, vol. 2, p. 94-103.
208. Rai M., Yadav A., Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. In: Biotechnology Advances, 2009, vol. 27(1), p. 76-83.
209. Rai M. N., Duran (eds.), Metal Nanoparticles in Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. 303 p.
210. Raimondi S., et al. Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. In: Microb. Cell Fact., 2014, vol. 13(83), p. 1-11.
211. Riggi S. J.; Di Luzio N. R. Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. In: The American journal of physiology, 1961, vol. 200, p. 297-300.
212. Rinaldi L., et al. In vitro bioaccessibility of peptides and amino acids from yogurt made with starch, pectin, or β -glucan. In: International Dairy Journal, 2015, vol. 46, p. 39-45.
213. Romanenko S., et al. Effects of millimeter wave irradiation and equivalent thermal heating on the activity of individual neurons in the leech ganglion. In: Journal of Neurophysiology. 2014, vol. 112(10), p. 2423-2431.
214. Roselli M., et al. Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *Escherichia coli*. In: Journal of Nutrition, 2003. vol. 133(12), p. 4077-4082.
215. Rudic V., et al. Coordination compounds of copper (II) as regulators of productivity and biosynthesis of cyanobacterium *Spirulina platensis*. 2nd French-Romanian Colloquium on Medicinal Chemistry, Iasi, Romania, 3-5 october, 2012, p. 57.
216. Ruiz-Gomez M. J., et al. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *S. cerevisiae*. In: Bioelectrochemistry, 2004, vol. 64, p. 151-155.
217. Sahayaraj K., Rajesh S. Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, A. Méndez-Vilas (Ed.), Formatex 2011, p. 228-244.
218. Salah N. Farhan, Anees A. Khadom. Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *S. cerevisiae*. In: Int. J. of Industrial Chemistry, 2015, vol. 6(2), p. 119-130.

219. Santimano M.C., Kowshik M. Altered growth and enzyme expression profile of ZnO nanoparticles exposed non-target environmentally beneficial bacteria. In: *Environ Monit Assess*, 2013, vol. 185, p. 7205-7214.
220. Sarah Dantas Viana Medeiros, et al. Effects of Purified *S. cerevisiae* (1→3)- β -Glucan on Venous Ulcer Healing. In: *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, vol. 13(7), p. 8142-8158.
221. Sarinho E., et al. Production of interleukin-10 in asthmatic children after beta-1-3-glucan. In: *Allergol. Immunopathol.*, 2009, vol. 37, p. 188-92.
222. Sawai J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. In: *J. Microbiol. Methods*, 2003, vol. 54(2), p. 177-182.
223. Schiavone M., et al. A combined chemical and enzymatic method to determine quantitatively the polysaccharide components in the cell wall of yeasts. In: *FEMS Yeast Res.*, 2014, vol. 14, p. 933-947.
224. Scrimale T., et al. The Unfolded Protein Response Is Induced by the Cell Wall Integrity Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Cascade and Is Required for Cell Wall Integrity in *S. cerevisiae*. In: *Mol. Biol. Cell*, 2009, vol. 20(1), p. 164-175.
225. Selitrennikoff P.C. Antifungal proteins. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67 (7), p. 2883-2894.
226. Shahram Amirnia, Madhumita B. Ray, Argyrios Margaritis. Heavy metals removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae* in a novel continuous bioreactor–biosorption system. In: *Chemical Engineering Journal*, 2015, vol. 264, p. 863-872.
227. Shokri H., Asadi F., Khosravi A.R.. Isolation of β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Nat. Prod. Res.*, 2008, vol. 22(5), p. 414-421.
228. Silke C. J., et al. Antioxidative activity of (1-3), (1-6)- β -D-glucan from *S. cerevisiae* grown on different media. In: *LWT-Food Sci. and Technol.*, 2008, vol. 41(5), p. 868-887.
229. Šillerová S., et al. Preparation of zinc enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by cultivation with different zinc salts. In: *JMBFS.*, 2012, vol. 1 (Special issue), p. 689-695.
230. Sirbu T., et al. Influence of Dispersed Solutions of Copper, Silver, Bismuth and Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Catalase Activity of *P. funiculosum*. In: *IFMBE Proceedings*, 3rd International Conf. on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. September 23-26, 2015, Chisinau, Republic of Moldova, vol. 55 of the series 2015, p. 271-274.
231. Soares E.V. & Soares Helena M. V. M. Bioremediation of industrial effluents containing heavy metals using brewing cells of *Saccharomyces cerevisiae* as a green technology: a review. In: *Environ Sci. Pollut Res. Int.*, 2012, vol. 19(4), p. 1066-1083.
232. Soghomonyan D., Trchounian K., Trchounian A. Millimeter waves or extremely high frequency electromagnetic fields in the environment: what are their effects on bacteria? In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, vol. 100(11), p. 4761-4771.
233. Soltanian S., et al. The protective effect against *V. campbellii* in *A. nauplii* by pure β -glucan and isogenic yeast cells differing in β -glucan and chitin content operated with a source dependent time lag. In: *Fish Shellfish Immunol.* 2007, V. 23, nr. 5, p. 1003-1014.
234. Stephen J. Free. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis, In Theodore Friedmann, Jay C. Dunlap and Stephen F. Goodwin, editors: *Advances in Genetics*, vol. 81, Burlington: Academic Press, 2013, p. 33-82.

235. Stier H., Ebbeskotte V., Gruenwald J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. In: Nutrition Journal, 2014, vol. 13, p. 38-46.
236. Storz G., Imlay J. Oxidative stress. In: Curr. Opin. Microbiol. 1999, vol. 2(2), p.188-194.
237. Stratmeyer M.E., et al. What we know and don't know about the bioeffects of nanoparticles: developing experimental approaches for safety measurements. In: Biomed. Microdevices, 2010, vol. 12(4), p. 569-573.
238. Syed A. Jamal. Application of Nanoparticles of Ceramics, Peptides, Silicon, Carbon, and Diamonds in Tissue Engineering. In: Chemical Sciences Journal, 2013, vol. CSJ-91, p. 1-10.
239. Synytsya A., Novak M. Structural analysis of glucans. In: Annals of Translational Medicine, 2014, vol. 2(2), p. 17-30.
240. Talbott S. M., et al. β -Glucan supplementation, allergy symptom, and quality of life in self-described ragweed allergy sufferers. In: Food Sci Nutr., 2013, vol. 1(1), p. 90-101.
241. Tambiev A. Kh., Skalny A. V. Electromagnetic Radiation and Life: Bioelementological Point of View, Biophysics, Dr. Prof. Dr. A.N. Misra (Ed.), InTech., 2012. 220 p.
242. Teparic R., Mrsa V. Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls. In: Current Genetics, 2013, vol. 59(4), p. 171-185.
243. Ter Schure E. G., Van Riel N. A., Verrips, C. T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *S. cerevisiae*. In: FEMS Microbiol. Rev., 2000, vol. 24, p. 67-83.
244. Thammakiti S., et al. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. Int. J. of Food Science&Technol., 2004, vol. 39(1), p. 21-29.
245. Ting Wu, T. S. Rappaport, C. M. Collins. The Human Body and Millimeter-Wave Wireless Communication Systems: Interactions and Implications. In: Communications (ICC), IEEE International Conf. on Communications, London 8-12 June, 2015, p. 2423-2429.
246. Tingting Sun., et al. Copper Oxide Nanoparticles Induce Autophagic Cell Death in A549 Cells. In: PLoS One, 2012, vol.7(8), e43442.
247. Topfer F., Oberhammer J. Millimeter-Wave Tissue Diagnosis: The Most Promising Fields for Medical Applications. In: IEEE Microwave Magazine, 2015, vol. 16(4), p. 97-113.
248. Torello C. O., Souza-Queiroz J. and Queiroz M. L. S. β -1,3-Glucan given orally modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumour-bearing mice. In: Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2012, vol. 39, p. 209-217.
249. Torgomyan H., Trchrounian A. Bactericidal effects of low-intensity extremely high frequency electromagnetic field: an overview with phenomenon, mechanisms, targets and consequences. In: Critical Reviews in Microbiology, 2013, vol. 39(1), p. 102-111.
250. Toshi M., et al. Effect of Low Power Microwave Radiation on Microorganisms and other Life Forms. In: Advances in Microwave and Wireless Technol., 2013, vol. 1(1), p. 4-11.
251. Tran Minh Tam, et al. Optimization of β glucan extraction from waste brewer's yeast *S. cerevisiae* using autolysis, enzyme, ultrasonic and combined enzyme – ultrasonic treatment. In: American J. of Research Communication, 2013, vol. 1(11), p. 149-158.
252. Tukmechi B. A., Bandboni M. Effects of *S. cerevisiae* supplementation on immune response, hematological parameters, body composition and disease resistance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). In: J. Appl. Ichthyol., 2014, vol. 30, p. 55-61.
253. Ulbricht C., Windsor R. C. An Evidence-Based Systematic Review of Beta-Glucan by the Natural Standard Research Collaboration. In: J. Diet. Suppl., 2014, vol. 11(4), p. 361-475.

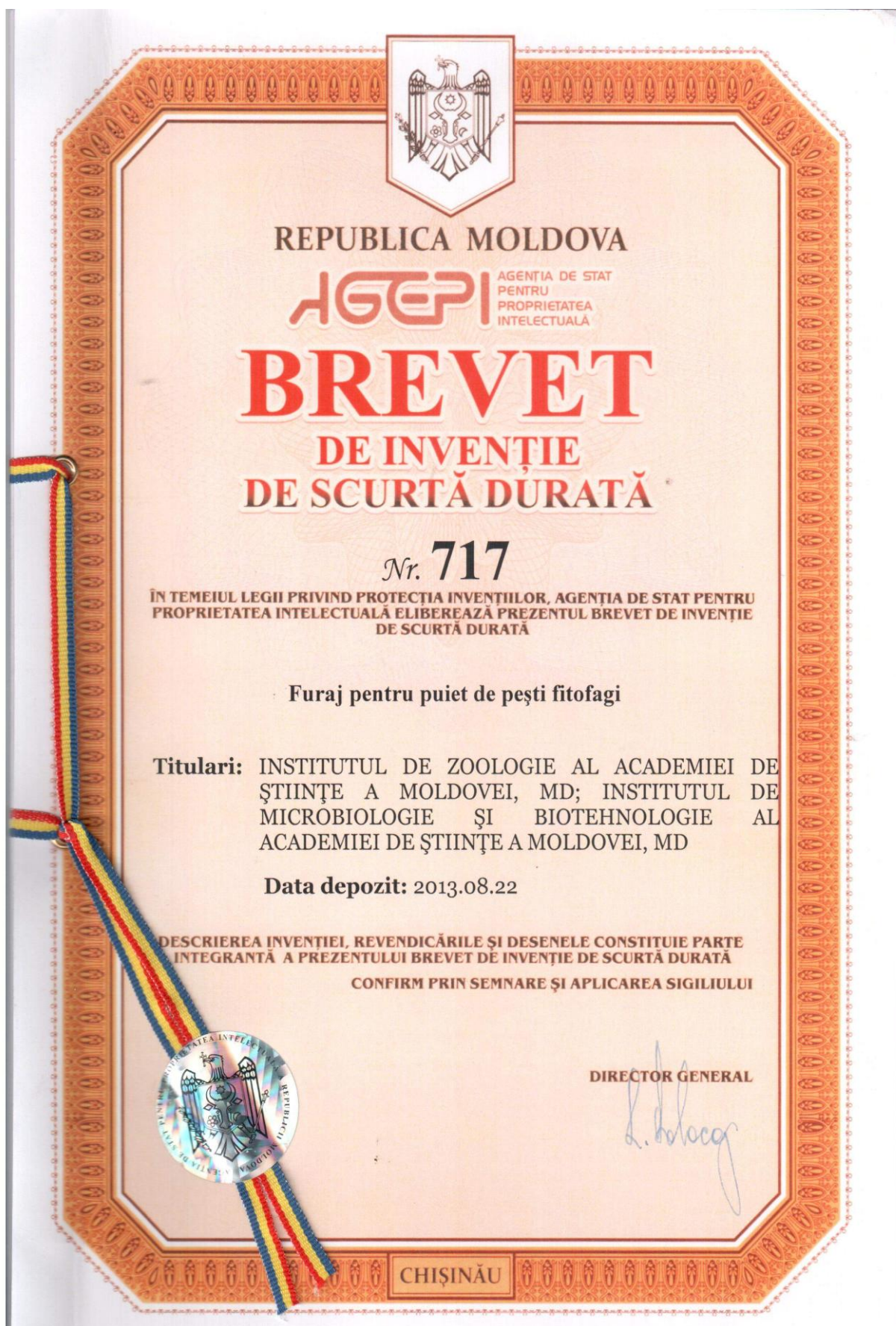
254. Usatfi A., **Chiselita N.**, Efremova N. The evaluation of nanoparticles ZnO and TiO₂ effects on *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast strain. În: Acta Universitatis Cibiniensis Series E : Food Technology. 2016, v. XX (1), p. 85-92.
255. Usatfi A., et al. The effects of some compounds of Mn(II) and Zn(II) on the multiplication of wine yeast and biosynthesis of carbohydrates in the biomass. In: Analele Universității din Oradea- Fascicula Biologie, 2010, vol. XYII(2), p. 208-212.
256. Varelas V., et al. An evaluation study of different methods for the production of β-D-glucan from yeast biomass. In: Drug Test. Analysis, 2015, vol. 8, p. 46-55.
257. Varelas V., et al. Valorization of Winery Spent Yeast Waste Biomass as a New Source for the Production of β-Glucan. In: Waste Biomass Valor., 2016, vol. 7(4), p. 807-817.
258. Vaseem M., Umar A., Hahu Y.B. ZnO nanoparticles: Growth, properties, and application. Metal oxide nanostructures and their applications. Metal Oxide Nanostructures and Their Applications. Edited by Ahmad Umar and Yoon-Bong Hahn. 2010, vol. 5, p.1-36.
259. Vetvicka V. Effects of β-glucan on some environmental toxins: An overview. In: Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub., 2014, vol. 158(1), p. 1-4.
260. Vilma Barbosa da Silva Araujo, et al. Followed extraction of β-glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (*S. uvarum*) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise. In: Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 2014, vol. 23, p. 164-170.
261. Vrhovac I., Hrascan R., Franekic J. Effect of 905 MHz microwave radiation on colony growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains FF18733, FF1481 and D7. In: Radiol. Oncol., 2010, vol. 44(2), p. 131-134.
262. Wanna Sirimanapong, et al. The effects of feeding immunostimulant β-glucan on the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*. In: Fish & Shellfish Immunology, 2015, vol. 45(2), p. 357–366.
263. Waszkiewicz-Robak B. Spent Brewer's Yeast and Beta-Glucans Isolated from Them as Diet Components Modifying Blood Lipid Metabolism Disturbed by an Atherogenic Diet. In: Lipid Metabolism, Edition: 1, Chapter: 12, Publisher: Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, Editors: Rodrigo Valenzuela Baez, 2013, p.261-290.
264. Waszkiewicz-Robak B., Bartnikowska E. Effects of spent brewer's yeast and biological β-glucans on selected parameters of lipid metabolism in blood and liver in rats. In: Journal of Animal and Feed Sciences, 2009, vol. 18, p. 699-708.
265. Worrasinchai S., et al. β-Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. In: Food Hydrocoll., 2006, vol. 20, p. 68-78.
266. X. Y. Liu, et al. A new isolation method of β-D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Food Hydrocoll., 2008, vol. 22, p. 239-247.
267. Xihai Li, et al. Millimeter wave radiation induces apoptosis via affecting the ratio of Bax/Bcl-2 in SW1353 human chondrosarcoma cells. In: Oncology Reports, 2012, vol. 27(3), p. 664-672.
268. Yadollahpour A., Jalilifar M., Rashidi S. Antimicrobial Effects of Electromagnetic Fields: A Review of Current Techniques and Mechanisms of Action. In: Journal of pure and applied microbiology, 2014. vol. 8(5), p. 4031-4043.
269. Ya-Nan Chang, et al. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. In: Materials, 2012, vol. 5, p. 2850-2871.

270. Yannikouris A., et al. Alkali extraction of β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their absorptive properties toward Zeralenone. In: J. Agric. Food Chem., 2004, vol. 52, p. 3666-3673.
271. Yeast Stress Response. First edition, Editors: Professor Dr. St. Hohmann, Dr. Willem H. Mager. Topics in Current Genetics, Springer-Verlag Berlin Heideberg, Germany, 2003. 389 p.
272. Yinxia Li., et al. Molecular Control of TiO₂-NPs Toxicity Formation at Predicted Environmental Relevant Concentrations by Mn-SODs Proteins. In: PLoS One, 2012, vol. 7(9), e44688.
273. Yoon T. J., et al. Anti-tumor metastatic activity of β -glucan purified from mutated *S. cerevisiae*. In: International Immunopharmacolog., 2008, vol. 8(1), p. 36-42.
274. Zechner-Krpan V., et al. Application of different drying methods on β -glucan isolated from spent brewer's yeast using alkaline procedure. In: Agric. Conspec. Sci., 2010, vol.75(1), p. 45-50.
275. Zechner-Krpan Vesna. Potential Application of Yeast β -Glucans in Food Industry. In: Agriculturae Conspetus Scientificus, 2009, vol. 74(4), p. 277-282.
276. Zechner-Krpan V., et al. Characterization of β -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. In: Food Technol. Biotechnol., 2010, vol. 48(2), p. 189-197.
277. Zekovic Djordje B., et al. Natural and Modified (1 \rightarrow 3)- β -D Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. In: Critical Reviews in Biotechnol., 2005, vol. 25, p. 205-230.
278. Zeng X. B., et al. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of eucalyptene A and xyloketal A from *Xylaria sp.* 2508 using response surface methodology. In: Process Biochemistry, 2006, vol. 41(2), p. 293-298.
279. Zhadobov M., et al. Complex Permittivity of Representative Biological Solutions in the 2-67 GHz Range. In: Bioelectromagnetics, 2012, vol. 33, p. 346-355.
280. Zhu F. M., et al. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: characteristics, physicochemical and biological activities. In: J. Food Compost. Anal., 2015, vol. 41, p. 165-173.
281. Zhu Fengmei, Du Bin, Xu Baojun. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. In: Food Hydrocolloids. 2016, vol. 52, p. 275-288.

ANEXE

Brevet de invenție. MD 4048. Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae*-sursă de β -glucani.
BOPI nr. 6/2010







Act nr. 85a din 04.09.2017 de implementare a tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20

APROB
 Directorul Institutului de Microbiologie și
 Biotehnologie al AȘM
 academician,

Valeriu RUDIC

„4” septembrie 2017

ACT
 de implementare a elaborării Nr.

mun. Chișinău
 din 04.09.2017

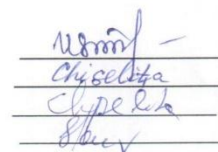
nr. 85-a

Subsemnații, comisia în componența: Usatii Agafia, dr. hab., prof. cercet., Chiselița Natalia, cercet. șt., laboratorul Biotehnologia Levurilor al IMB al AȘM; Chiselița Oleg, dr., șef Colecția Națională de Microorganisme Nematogene a IMB a AȘM; Slanina Valerina, cercet. șt. al CNMN a IMB al AȘM, au întocmit prezentul act privitor la evaluarea implementării:

1. **Denumirea elaborării:** Tehnologie de obținere din levuri a β -glucanilor
2. **Autorii elaborării:** USATȚI Agafia, dr. hab., prof. cercet., CHISELIȚA Natalia, cercet. șt., EFREMOVA Nadejda, dr., cercet. șt. coord., BORISOVA Tamara sp. microbiolog, laboratorul Biotehnologia Levurilor al IMB al AȘM.
3. **Beneficiar:** Colecția Națională de Microorganisme Nematogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.
4. **Volumul de lucrări efectuate:** Tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 cu potențial înalt de sinteză a β -glucanilor (Br. inv. MD 4048, BOPI 6/2010), păstrată în Colecție timp îndelungat în stare liofilizată a fost revitalizată și cultivată în profunzime pe mediul nutritiv cu parametri optimizați și aplicarea procedului nou de tratare a inoculului cu unde milimetrice de intensitate extra înaltă (Br. inv. MD 4329, BOPI 2/2015). Pentru extragerea și purificarea β -glucanilor din biomasa levuriană a fost utilizat procedul optimizat, descris în tehnologie.
5. **Rezultate:** Regulamentul tehnologic de obținere din levuri a β -glucanilor a fost valorificat în procesul de evaluare a viabilității, a caracterelor morfo-culturale a celulelor și coloniilor și potențialului biosintetic al tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 păstrată în condiții de liofilizare. Eficiența aplicării Regulamentului tehnologic este confirmată de rezultatele superioare obținute în raport cu procedeele clasice.
6. **Propuneri:** Tehnologia prezintă interes pentru industria microbiologică, alimentară, farmaceutică, ca unul din elemente ce țin de producerea β -glucanilor cu utilizări polivalente.

Semnăturile membrilor comisiei:

USATȚI Agafia, dr. hab., prof. cercet., IMB al AȘM
 CHISELIȚA Natalia, cercet. șt., IMB al AȘM
 CHISELIȚA OLEG, dr., șef CNMN a IMB al AȘM
 SLANINA Valerina, cercet. șt. CNMN, a IMB al AȘM



Act de implementare a rezultatelor Nr.1 eliberat de ÎI „Marin-Alexandru” la 17.07.2014

Aprob
 Directorul Întreprinderii Individuale
 „Marin Alexandru”
 „17 iulie” 2014

ACT DE IMPLEMENTARE Nr. 1
 din 17.07.2014

1. Denumirea propunerii pentru implementare:

Furaj pentru puietul de pești fitofagi (Brevet de invenție nr. 717).

2. Autorii propunerii:

Dadu Ana, Vidaico Valeriu, Usatii Agafia, Usatii Marin, Chiselita Natalia

Instituția unde s-a implementat și perioada de implementare

Întreprinderea Individuală „Marin Alexandru”

Volumul de lucrări efectuate:

A fost testată o rețetă nouă de furaj pentru creșterea puietului de pești fitofagi, brevetată, care sporește rata de supraviețuire și indicii de producție. Eficiența înaltă a furajului se datorează făinei de tescovină de struguri, drojdiei de vin uscată și suplimentului biologic activ β -glucani. Testarea a fost efectuată într-un iaz cu suprafața de 2 ha.

Rezultatele implementării:

S-a administrat făină de tescovină de struguri și a bioprodusului β -glucani în furajele pentru cosaș care a contribuit la sporirea procentului de viabilitate a puietului cu cca 30%.

Propuneri:

Furajul combinat pentru creșterea puietului de pești fitofagi care conține: făină de tescovină de struguri și bioprodusul β -glucani obținut din levurile rezultate după fermentarea vinului manifestă proprietăți de stimulator al ratei de supraviețuire și masei corporale a puietului de pești fitofagi.

Responsabili pentru implementare:

Dadu Ana

Institutul de Zoologie al A.Ș.M.

Chiselita Natalia

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Aprob

Directorul Întreprinderii Individuale

„Marin Alexandru”

” 17” 27” 2015

ACT DE IMPLEMENTARE Nr. 3
din 17.07.2015

1. *Denumirea propunerii pentru implementare:*

Furaj pentru puietul de pești fitofagi (Brevet de invenție nr. 717).

2. *Autorii propunerii:*

Dadu Ana, Vidaico Valeriu, Usatii Agafia, Usatii Marin, Chiselița Natalia,

3. *Instituția unde s-a implementat și perioada de implementare:*

Întreprinderea Individuală „Marin Alexandru” (01.06.15 – 17.07.15)

4. *Volumul de lucrări efectuate:*

A fost testată repetat o rețetă nouă de furaj pentru creșterea puietului de pești fitofagi, brevetată, care sporește rata de supraviețuire și indicii de producție. Eficiența înaltă a furajului se datorează făinei de tescovină de struguri, drojdiei de vin uscată și suplimentului biologic activ β -glucan. Testarea a fost efectuată într-un iaz cu suprafața de 1,2 ha.

5. *Rezultatele implementării:*

S-a administrat făină de tescovină de struguri și a bioprodusului β -glucan în furajele pentru cosaș care a contribuit la sporirea procentului de viabilitate a puietului cu cca 32%. Considerăm oportună utilizarea pe scară largă a rețetei noi de furaj pentru creșterea puietului de pești fitofagi.

Responsabili pentru implementare:

Dadu Ana 
Institutul de Zoologie al A.Ș.M.

Chiselița Natalia 
Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

Aprob
Directorul SRL „Acces-Activ”

” 10” *A. Tudor Bîtcă*
10



ACT DE IMPLEMENTARE Nr. 4
Din” 10 “ 10 2016

1. *Denumirea propunerii pentru implementare:*

Furaj pentru puietul de pești fitofagi (Brevet de invenție nr. 717).

2. *Autorii propunerii:*

Dadu Ana, Vidaico Valeriu, Usatii Agafia, Usatii Marin, Chiselita Natalia

Instituția unde s-a implementat și perioada de implementare

SRL „Acces-Activ”, s. Românești r. Strășeni, perioada iunie-august 2016

3. *Volumul de lucrări efectuate:*

A fost testată o rețetă nouă de furaj pentru creșterea puietului de pești fitofagi, brevetată, care sporește rata de supraviețuire și indicii de producție. Eficiența înaltă a furajului se datorează făinei de tescovină de struguri, drojdiei de vin uscată și suplimentului biologic activ β -glucani. Testarea a fost efectuată într-un iaz cu suprafața de 2.6 ha.

4. *Rezultatele implementării:*

S-a administrat făină de tescovină de struguri și a bioprodusului β -glucani în furajele pentru coșăș care a contribuit la sporirea procentului de viabilitate a puietului cu cca 32%.

Responsabili pentru implementare:

Cercetător științific al Laboratorului de
Ihtiologie și Acvacultură al Institutului
de Zoologie a AȘM

și
cercetătorului științific stagiar
al Laboratorului de Ihtiologie și
Acvacultură al Institutului
de Zoologie a AȘM

Aureliu Cebanu

Ana Dadu

Mențiuni la Saloane de Inventii și Expoziții Internaționale

Diploma European Exhibition of Creativity and Innovation „EUROINVENT”, Iași 2015, (Silver medal) „Feed for phytophagous fish fry”.



Diploma European Exhibition of Creativity and Innovation „EUROINVENT”, Iași 2015, (Silver medal) „New proceeding for obtaining β -glucans from yeasts with application of millimetric waves”.



DIPLOMA

New proceeding for obtaining β -glucans from yeasts
with application of millimetric waves
Usatîi Agafia, Chiselita Natalia, Efremova Nadejda,
Molodoi Elena, Fulga Ludmila

SILVER MEDAL

President of International Jury
Dr.Eng. Mohd Mustafa A) Bakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof. Ion SANDU



EUROINVENT
2015

May 16, 2015

Diploma „40th International Invention Show 11th Invention and Prototype Show and Student Business Plan Competition” Karlovac, 2015, (Silver medal) „Fish spawn incubation and larvae storage device and feeding them with specialized feed”



Diploma European Exhibition of Creativity and Innovation „EUROINVENT”, Iași 2016, (Silver medal) „Technology of β -glucans products obtaining from *Saccharomyces* yeast”.



Technology of β -glucans products obtaining from *Saccharomyces* yeast

Usafii Agafia, Chiselița Natalia, Chiselița Oleg.

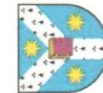
SILVER MEDAL

President of International Jury
Dr.Eng. Mohd Mustafa Al Bakri ABDULLAH

President of Exhibition
Prof. Ion SANDU



EUROINVENT 2016



EURO
INVENT



Diploma Salonul internațional al cercetării, inovării și inventicii „PROINVENT”, Cluj-Napoca 2016, (Medalia de aur cu mențiune specială) „Technology of β -glucans products obtaining from *Saccharomyces* yeast”



UNIVERSITATEA TEHNICĂ DIN CLUJ-NAPOCA
sub egida MINISTERULUI EDUCAȚIEI NAȚIONALE ȘI CERCETĂRII ȘTIINȚIFICE
ȘI ACADEMIEI DE ȘTIINȚE TEHNICE DIN ROMÂNIA, FILIALA CLUJ

**SALONUL INTERNAȚIONAL DE INVENTICĂ
PRO INVENT, Ediția a XIV-a, 2016, Cluj-Napoca, România**

DIPLOMA
DE EXCELENȚĂ
ȘI MEDALIA DE AUR CU MENȚIUNE SPECIALĂ

Se acordă Usatii Agafia, Chiselița Natalia, Chiselița Oleg
De la INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
Pentru TEHNOLOGIE DE OBTINERE A β -GLUCANILOR DIN LEVURILE GENULUI SACCHAROMYCES

PREȘEDINTELE SALONULUI,
Prof. dr. ing. VASILE ȚOPA
Rector al
Universității Tehnice din Cluj-Napoca

PREȘEDINTELE JURIULUI,
Prof. dr. ing. RADU MUNTEANU
Radu Munteanu



Diploma de participare European Exhibition of Creativity and Innovation „EUROINVENT”, Iași 2017, „New proceeding for obtaining β -glucans from yeasts using ZnO nanoparticles”.



DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

CHISELIȚA Natalia

Data:

CURRICULUM VITAE

Numele, prenume:

CHISELIȚA NATALIA



Cetățenia

Republica Moldova

Studii

1991-1996 Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Chimie, specialitatea Chimie
2012-2014 Universitatea de Stat din Tiraspol, Facultatea de Biologie și Chimie, specialitatea Biologie aplicată
2014-2017 Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, doctorandă, specialitatea „167.01 – Biotehnologie, bionanotehnologie”

Domeniile de interes științific

Microbiologia și biotehnologia levurilor;
Biochimie, specializare în domeniul biochimiei levurilor;
Elaborarea procedeelelor de cultivare dirijată a levurilor.

Participări în proiecte științifice naționale și internaționale

06.411.015 F. (2006-2010) „Fundamentarea științifică a sintezei orientate a substanțelor bioactive de către microorganisme”;
07.411.11 IND A. (2007-2008) „Evaluarea principiilor bioactive a levurilor de la vinificație ca sursă pentru obținerea biopreparatelor”;
09.819.08.03. IND F. (2009-2010) „Procesarea drojdiilor rezultate în urma vinificării în scopul obținerii carbohidraților pentru utilizare în diverse domenii”;
11.817.08.19A (2011-2014) „Tehnologii inovative microbiene pentru producerea polizaharidelor și enzimelor hidrolitice cu utilizări polivalente”;
14.05.076A (2015-2018) „Utilizarea nanomaterialelor în biotehnologia cultivării fungilor miceliali și levurilor ca strategie de sporire a performanțelor biotehnologice”.

Participări la foruri științifice

Всероссийский симпозиум с международным участием „Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов”, Москва, 2014;
Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare”, Chișinău, 2014;
Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, Chișinău, 2015, 2016, 2017;
Conferința Științifică Internațională “Științele vieții în dialogul generațiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri”, Chișinău, 2016;
Международная научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов „Научные достижения молодежи – решению проблем питания человечества в XXI веке”, Киев, Украина, 2016;
International Conference „NANO-2016 Ethical, Ecological and Social Problems of Nanoscience and Nanotechnologies”, Chișinău, 2016;
International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 2nd and 3rd editions, Chișinău, 2014, 2016.

<i>Lucrări științifice publicate</i>	36 publicații științifice: 15 articole în reviste recenzate, 12 teze la conferințe internaționale și naționale, 3 brevete de invenție, 6 materiale la saloane de invenții.
<i>Premii și mențiuni</i>	Bursa de Excelență a Guvernului (2016); Bursa unică de performanță „Mircea Ciuhrii”. 40 th international invention show 11 th invention and prototype show and student business plan competition Karlovac, Croatia, 2015 (Medalie de argint); European Exhibition of Creativity and Innovation E U R O I N V E N T, Iasi, Romania, 2015 (Medalie de argint); European Exhibition of Creativity and Innovation E U R O I N V E N T, Iasi, Romania, 2015 (Medalie de argint); European Exhibition of Creativity and Innovation E U R O I N V E N T, Iasi, Romania, 2016 (Medalie de argint); Salonul internațional al cercetării, inovării și invenției PROINVENT, Cluj-Napoca, România, 2016, (Diplomă de excelență, Medalia de aur); European Exhibition of Creativity and Innovation E U R O I N V E N T, Iasi, Romania, 2017 (Diplomă de participare).
<i>Apartenența la societăți:</i>	Membru al Federației Societăților Europene de Microbiologie (FEMS).
<i>Cunoașterea limbilor:</i>	română, rusă, engleză, portugheză.
<i>Date de contact de serviciu:</i>	Laboratorul Biotehnologia levurilor Institutul de Microbiologie și Biotehnologie MD 2028, str. Academiei 1, bir. 202 Tel.: +373 (22) 73 80 13, e-mail: chiselita.natalia@gmail.com