

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

Cu titlu de manuscris  
C.Z.U: 663.12:579.6 (043.3)

**CHISELIȚA NATALIA**

**TEHNOLOGIE DE OBȚINERE A  $\beta$ -GLUCANILOR DIN  
LEVURI**

**167.01- BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE**

Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice

**CHIȘINĂU, 2018**

Teza a fost elaborată în cadrul laboratorului Biotehnologia Levurilor al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie

**Conducător științific:**

**USATÎI Agafia**, doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

**Consiliul Științific Specializat D 09.167.01 – 04** din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, abilitat cu dreptul de a organiza susținerea tezei, a fost aprobat de către Consiliul de Conducere al ANACEC prin decizia nr. 7 din 11.05.2018, în următoarea componență:

**RUDIC Valeriu, președinte**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, academician, Om Emerit al Republicii Moldova

**CODREANU Svetlana, secretar științific**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

**DIUG Eugen**, doctor habilitat în științe farmaceutice, profesor universitar

**GUDUMAC Valentin**, doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar

**CEPOI Liliana**, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

**Referenți oficiali:**

**ȘALARU Victor**, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, Universitatea de Stat din Moldova

**BALANUȚĂ Anatol**, doctor în științe tehnice, profesor universitar, Universitatea Tehnică din Moldova

Susținerea va avea loc la „**19 iulie**” 2018, ora 13<sup>00</sup> în ședința Consiliului Științific Specializat D 09.167.01 – 04 la Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, or. Chișinău, str. Academiei 1, birou 352.

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică Centrală a AȘM „A. Lupan” și pe pagina web [www.cnaa.md](http://www.cnaa.md).

Autoreferatul a fost expediat la „**14 iunie**” 2018.

Secretar științific al Consiliului științific specializat,  
**CODREANU Svetlana**, doctor în științe biologice,  
conferențiar cercetător

\_\_\_\_\_

Conducător științific,  
**USATÎI Agafia**, doctor habilitat în biologie,  
profesor cercetător

\_\_\_\_\_

Autor  
**CHISELIȚA Natalia**

\_\_\_\_\_

© Chiselița Natalia, 2018

## REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

**Actualitatea cercetărilor.** Importanța  $\beta$ -glucanilor pentru medicină, farmaceutică, industria alimentară și alte domenii ale economiei condiționează dezvoltarea rapidă a industriei de producere a acestor polizaharide complexe [25]. Levurile genului *Saccharomyces* se numără printre producători performanți de  $\beta$ -glucani cu proprietăți imunologice deosebite [16]. Interesul înalt față de 1,3- și 1,6- $\beta$ -glucani este condiționat și de activitatea antibacteriană, anticancerigenă, antioxidantă, antimutagenă, hipocolesterolemică, detoxifiantă [21, 23].

Pentru dezvoltarea biotehnologiilor moderne de obținere a  $\beta$ -glucanilor este evidentă oportunitatea selectării tulpinilor cu calități performante utilizate în producerea industrială. Producția de  $\beta$ -glucani depinde în mod semnificativ de conținutul lor în peretele celular al levurii. Arhitectura peretelui celular și mecanismele responsabile de sinteza componentelor acestuia pot fi controlate prin compoziția mediului de cultură și condițiile de cultivare [17]. 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 [23, 24].

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 factorilor nominalizați la nivel celular au fost cercetate de către mai mulți specialiști în domeniu, care au elucidat parțial unele procese ce au loc în cazul aplicării acestora [19, 20].

**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 [14]. În ultimii ani în calitate de astfel de surse sunt studiate microorganismele, în special levurile, capabile să sintetizeze un complex de substanțe bioactive, inclusiv  $\beta$ -glucani, care au un rol impunător în activitatea vitală a organismelor vii [27] și obținerea cărora din punct de vedere economic este avantajoasă. Luând în considerație că biomasa de *S. 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 [12, 21], considerăm oportune cercetările orientate spre elaborarea tehnologiilor de cultivare a acestui obiect biotehologic și obținere a  $\beta$ -glucanilor.

**Problema de cercetare** care reiese din analiza situației în domeniu constă în stabilirea parametrilor biotehnologici de cultivare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în scopul sintezei orientate a  $\beta$ -glucanilor.

**Scopul lucrării** constă în elaborarea tehnologiei inovative eficiente de obținere a  $\beta$ -glucanilor din levuri.

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

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

**Metodologia cercetării științifice.** Pentru realizarea cercetărilor au fost utilizate concepțiile practico-științifice aprobate, prin utilizarea cărora au fost estimate modificările în ciclul vital, viabilitatea celulelor, producția de biomasă, de  $\beta$ -glucani, activitatea enzimatică și componența biochimică a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 sub influența diferitor factori de cultivare, surselor de carbon, azot, săruri minerale, nanoparticulelor și undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă. Calculul indicatorilor statistici descriptivi și corelaționali a fost efectuat utilizând softul UVWIN 5.0.5 și MS Excel.

**Noutatea și originalitatea științifică.** În premieră se propune o tehnologie inovativă de cultivare a levurii *S. cerevisiae* și de obținere a  $\beta$ -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  $\beta$ -glucanilor. În premieră s-a demonstrat că nanoparticule  $\text{TiO}_2$  și  $\text{ZnO}$ , utilizate la cultivarea levurii, influențează procesul de biosinteză a  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 a lucrării.** Se propun spre valorificare: tulpina de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, brevetată ca sursă de  $\beta$ -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  $\beta$ -glucani în biomasa levuriană; metoda de extragere a  $\beta$ -glucanilor, caracterul inovațional al căreia permite de a reduce etapele suplimentare de distrugere a peretelui celular și extragere a  $\beta$ -glucanilor; bioprodusul „Glucan-20” cu activitate fiziologică înaltă.

**Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere.**

1. Dirijarea procesului de biosinteză a  $\beta$ -glucanilor prin asigurarea nutrienților specifici și condițiilor optimizate de cultivare a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

2. Nanoparticulele  $\text{TiO}_2$  și  $\text{ZnO}$  induc modificări în procesul de biosinteză  $\beta$ -glucanilor și altor componente celulare la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, efectul exprimându-se în funcție de dimensiuni și concentrații.

3. Undele milimetrice cu frecvență extra înaltă influențează biosinteza  $\beta$ -glucanilor și altor componente celulare la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, nivelul cantitativ al acestora variază în dependență de frecvență și durata de iradiere.

4. Tehnologia de sinteză microbială orientată, cu aplicarea procedeelelor noi, asigură sporirea producției de  $\beta$ -glucani.

**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)

**Aprobarea rezultatelor științifice.** Materialele expuse în teza de doctor au fost comunicate și discutate la: Simpozionul „Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов”, Moscova, 2014; Conferința științifică națională cu participare internațională „Integrare prin cercetare și inovare”, Chișinău, 2014; Conferința 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; Conferința „Научные достижения молодежи – решению проблем питания

человечества в XXI веке”, Kiev, Ucraina, 2016; International Conference „NANO-2016 Ethical, Ecological and Social Problems of Nanoscience and Nanotechnologies”, Chişinău, Moldova, 2016; International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> editions, Chişinău, Moldova, 2014, 2016; Saloanele Internaţionale de invenţie - 40th international invention show, Karlovac, Croatia, 2015; „PROINVENT”, Cluj-Napoca, România, 2016; „EUROINVENT”, Iasi, Romania, 2015, 2016, 2017. Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate în cadrul ședinței laboratorului Biotehнологia levurilor al IMB din 8 noiembrie 2017 și Seminarului Științific de profil 167.01. Biotehnologie, bionanotehnologie, din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie din 14 decembrie 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*,  $\beta$ -glucani, carbohidrați, proteine, nanoparticule, unde milimetrice cu frecvență extra înaltă.

## CONȚINUTUL TEZEI

### 1. LEVURILE – SURSE VALOROASE DE $\beta$ -GLUCANI

Capitolul prezintă o analiză amplă și minuțioasă a publicațiilor științifice de ultimă oră la tema de cercetare. Materialele argumentează oportunitatea studierii  $\beta$ -glucanilor levurieni, care se bazează pe activitatea biologică valoroasă și potențialul lor înalt de utilizare în medicină, farmaceutică, cosmetologie, acvacultură, zootehnie și industria alimentară.

Este elucidat mecanismul de biosinteză a  $\beta$ -glucanilor și evidențiate principalele enzime și gene responsabile de biogeneza diferitor modificări ale acestora, care se realizează pe membrana plasmatică a celulei levuriene, precedată de diverse procese intracelulare complexe.

O atenție deosebită se atrage posibilității modelării biosintezei  $\beta$ -glucanilor prin varierea surselor nutritive și optimizarea condițiilor de cultivare, aplicarea nanoparticulelor oxizilor de metale și undelor milimetrice. Sunt reflectate diverse metode de extracție a  $\beta$ -glucanilor, care permit obținerea preparatelor  $\beta$ -glucanice de calitate cu activitate înaltă. Prin analiza literaturii de specialitate se ajunge la concluzia că levurile *S. cerevisiae* sunt o sursă biotehнологică importantă pentru obținerea preparatelor  $\beta$ -glucanice. În final este formulată problema de cercetare și direcțiile de rezolvare a acesteea, sunt definite scopul și obiectivele cercetării.

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

Capitolul este dedicat cercetărilor ce țin de eficientizarea metodei de extragere a  $\beta$ -glucanilor, evaluarea gradului de acumulare a biomasei și  $\beta$ -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, în funcție de necesitățile nutritive și condițiile de cultivare.

Pentru efectuarea cercetărilor au fost utilizate metode microbiologice de determinare a viabilității levurilor [22], biochimice cantitative și spectrofotometrice de determinare a carbohidraților totali [13],  $\beta$ -glucanilor [26], proteinelor [18], matematice de planificare a experiențelor [7] și statistice de prelucrare a rezultatelor obținute, care au contribuit la evaluarea corectă a rezultatelor cercetărilor și formularea concluziilor. Ca obiect de studiu a servit tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 – sursă de  $\beta$ -glucani [2], cultivată pe medii nutritive, specifice tulpinii studiate: YPD – 1% extract de drojdie, 2% peptonă, 2% glucoză, apă potabilă 1L, pH-5,5 [11] și 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 10 ml autolizat de drojdii; apă potabilă 1L; pH-5,0-6,0 [1]. Utilizarea metodelor descrise a permis obținerea unor rezultate adecvate și reproductibile, care elucidează valoarea fundamentală a cercetărilor și subliniază aspectul lor aplicativ.

Rezultatele cercetărilor efectuate asupra eficientizării metodei de extracție a  $\beta$ -glucanilor au demonstrat că din 5 metode cercetate (autoliza timp de 8, 24 ore, ultrasonare, omogenizare, congelare/decongelare urmate de extracția alcalino-acidă), eficiență este metoda de omogenizare cu durata de tratare a biomasei 10 minute, care are un grad de distrugere a celulelor de 95%.

Aplicarea acestui procedeu sporește cu 34,5% conținutul de  $\beta$ -glucani extrași din pereții celulari levurieni și cu 7,8% a carbohidraților și reduce durata de extragere cu 24 ore comparativ cu procedeul martor (Figura 2.1).

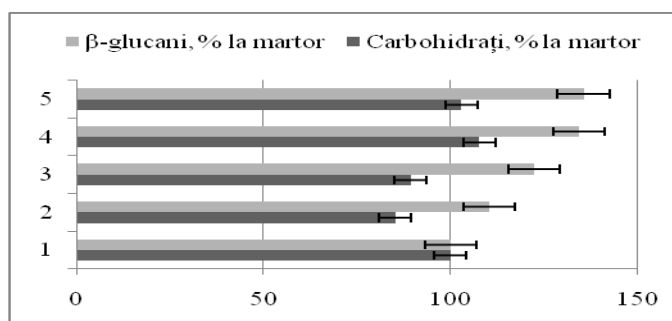


Fig. 2.1. Eficiența metodelor de extragere a  $\beta$ -glucanilor din pereții celulari ai *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

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.

În scopul selectării nutrienților pentru sporirea biosintezei  $\beta$ -glucanilor au fost efectuate cercetări de evaluare a efectelor diferitor surse de carbon, azot și săruri minerale adăugate în concentrații variate la mediile nutritive YPD și Rieder. Studiul efectelor surselor de carbon (glucoza, zaharoza, fructoza, manoză, melasa, etanolul) în concentrații de (w/v): 2% și 3% incluse în mediile de fermentație a demonstrat, că cantitatea de  $\beta$ -glucani în toate variantele mediului YPD are valori de 15,27...18,91% la B.U., maximul fiind specific glucozei. În cazul cultivării levurii pe mediul Rieder conținutul de  $\beta$ -glucani în biomasa levurii se află în limitele 14,16...19,85% la B.U., maximul s-a observat în variantele de mediu suplimentate cu zaharoză.

Ulterior, pentru selectarea concentrațiilor optime a sursei de carbon au fost utilizate concentrațiile, (w/v): 1%, 2%, 3%, 4%, 5% de glucoză și zaharoză adăugate la mediul YPD și respectiv la mediul Rieder. În rezultatul cercetărilor conținut maximal de  $\beta$ -glucani în biomasă a fost specific variantelor de mediu YPD cu 3-4% glucoză, iar randamentul maxim de producere a  $\beta$ -glucanilor exprimat la 1L de mediu s-a înregistrat la utilizarea glucozei în concentrație de 4% (Figura 2.2a).

Analizând rezultatele la cultivarea tulpinii pe mediul Rieder putem menționa că, maximul de  $\beta$ -glucani în biomasa levuriană s-a observat în varianta de mediu cu 3% zaharoză. Recalculul cantității de  $\beta$ -glucani la 1L mediu de cultură evidențiază superioritatea acestei variantei experimentale (Figura 2.2b).

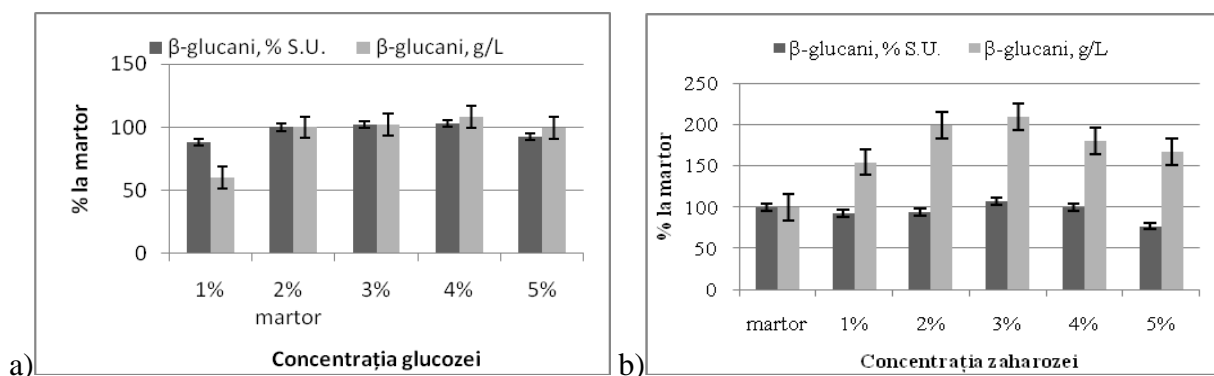


Fig. 2.2. Efectul diferitor concentrații de glucoză și zaharoză asupra conținutului de  $\beta$ -glucani la cultivarea tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pe mediile YPD (a) și Rieder (b).

Azotul este un element esențial pentru microorganisme și are rol important în creșterea și dezvoltarea lor, deaceia, în continuare, s-a studiat influența sulfatului și hidrogenofosfatului de amoniu în concentrație de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 și 0,5%, asupra producției de biomasă și activității biosintetice a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

În rezultatul cercetărilor s-a stabilit că ambele surse diminuează semnificativ conținutul de  $\beta$ -glucani. Merită însă de menționat că hidrogenofosfatul de amoniu este un stimulator



eficient al producției de biomasă ce asigură acumularea cu până la 38,9% mai multă biomasă comparativ cu mărtoarea.

Pe lângă sursele de carbon și azot o cale relevantă de stimulare a creșterii și biosintezei componentelor celulare la levuri sunt microelementele, necesare pentru nutriția și dezvoltarea acestora. Deoarece zincul este un microelement esențial pentru metabolismul levurilor, în continuare s-a urmărit influența acetatului de zinc asupra producerii  $\beta$ -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Compusul s-a adăugat în concentrații de 5, 10, 20 și 30 mg/L la mediile nutritive: YPD-4 (YPD modificat cu 4% glucoză) și Rieder-M (Rieder modificat – glucoza substituită cu 3% zaharoză). În calitate de mărtoare au servit mediile enunțate fără acetat de zinc. În rezultat s-a stabilit că efectul acetatului de zinc este variabil, depinde de concentrație și mediul de cultivare. Astfel, cantitatea de  $\beta$ -glucani în variantele de mediu YPD-4 completat cu acetat de zinc este inferioară mărtoareii cu 5,8-11,4% (Figura 2.3a). Deaceia în continuare pentru cercetări a fost folosit mediu YPD-4.

Efect diferit al acțiunii acetatului de zinc s-a înregistrat la cultivarea levurii pe mediul Rieder-M. S-a constatat că acetatul de zinc în concentrații de 5-30 mg/L, adăugat la mediul de cultură, asigură sporirea cu 23...44,1% față de mărtoare a conținutului de  $\beta$ -glucani în biomasă *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 (Figura 2.3b).

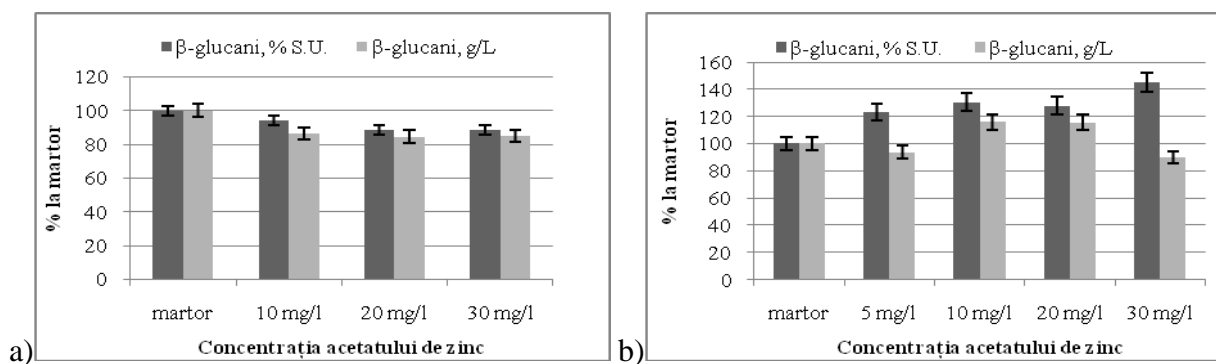


Fig. 2.3. Influența acetatului de zinc asupra conținutului de  $\beta$ -glucani la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare pe mediile modificate YPD-4 (a) și Rieder-M (b).

Rezultatele investigațiilor au stat la baza optimizării matematice a componenței mediului nutritiv cu 2 factori (zaharoza și acetatul de zinc) în vederea obținerii conținutului maximal de  $\beta$ -glucani. A fost elaborat mediul nutritiv, numit convențional R-ZZ, cu următoarea componență (în 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;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,0; acetat de zinc - 0,00816; autolizat de levuri - 10 ml; apă potabilă - 1L, care permite sporirea  $\beta$ -glucanilor [5].

Deoarece condițiile și durata de cultivare influențează semnificativ creșterea și activitatea biosintetică a levurilor, la următoarea etapă a fost evaluată influența condițiilor de cultivare (temperatura, pH-ul, gradul de aerare) și duratei de cultivare asupra sintezei  $\beta$ -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 pe mediu elaborat R-ZZ.

În rezultat s-a stabilit, că optime pentru creșterea și dezvoltarea levurii în vederea acumulării cantității maxime de  $\beta$ -glucani sunt temperatura de 25°C; pH-ul-5,5; gradul de aerare – 81,3...83,3 mg O<sub>2</sub>/L și durata de cultivare submersă – 120 ore [8].

Cercetările destinate optimizării compoziției mediului nutritiv și a condițiilor de cultivare au permis de a propune un procedeu eficient de sporire a conținutului de  $\beta$ -glucani având ca obiect biotehnologic tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, mediile nutritive R-ZZ și YPD-4, condițiile de cultivare optimizate, care permit obținerea unei cantități sporite de  $\beta$ -glucani – respectiv cu 32,8% și 52,4% mai mult față de martor.

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

În capitol sunt prezentate rezultatele cercetărilor 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. În calitate de modulatori ai proceselor biosintetice și de creștere a levurii au fost cercetate nanoparticulele TiO<sub>2</sub> cu dimensiunea de 30 nm [10], ZnO cu dimensiunile 10 și 30 nm [15] în concentrații de 0,5; 1; 5; 10; 15, 20 mg/L, suplimentate la mediul nutritiv YPD la etapa inoculării.

Pentru a elucida eficiența nanoparticulelor TiO<sub>2</sub> în tehnicile de cultivare a levurii s-a cercetat dinamica multiplicării, s-au apreciat valorile conținutului de  $\beta$ -glucani, producției de biomasă și altor componente celulare. S-a demonstrat, că nanoparticulele TiO<sub>2</sub> nu modifică semnificativ procesul de reproducere a celulelor. Procesele care au loc în fiecare din etapele vitale ale levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 decurg în conformitate cu schemele clasice. Cantitatea de biomasă colectată după 120 ore de cultivare în profunzime, s-a micșorat nesemnificativ (cu 3-6%) comparativ cu martorul (Figura 3.1a). În cazul determinării conținutului de  $\beta$ -glucani, se observă, că nanoparticulele manifestă un potențial stimulator pronunțat. La aplicarea concentrațiilor de 10,0-20,0 mg/L în biomasa levurii se acumulează în medie 18,8-21,0% la S.U.  $\beta$ -glucani. Valoare maximă, cu 19,8% mai mult față de martor, a fost specifică concentrației 15 mg/L (Figura 3.1a).

Studierea și evidențierea particularităților de acțiune a nanoparticulelor dioxidului de titan asupra conținutului de carbohidrați în biomasă a pus în evidență valori diferite în funcție de

concentrația utilizată de nanoparticule. Astfel, nanoparticulele  $\text{TiO}_2$  stimulează nesemnificativ (cu 7,5%) conținutul de carbohidrați comparativ cu martorul (Figura 3.1b).

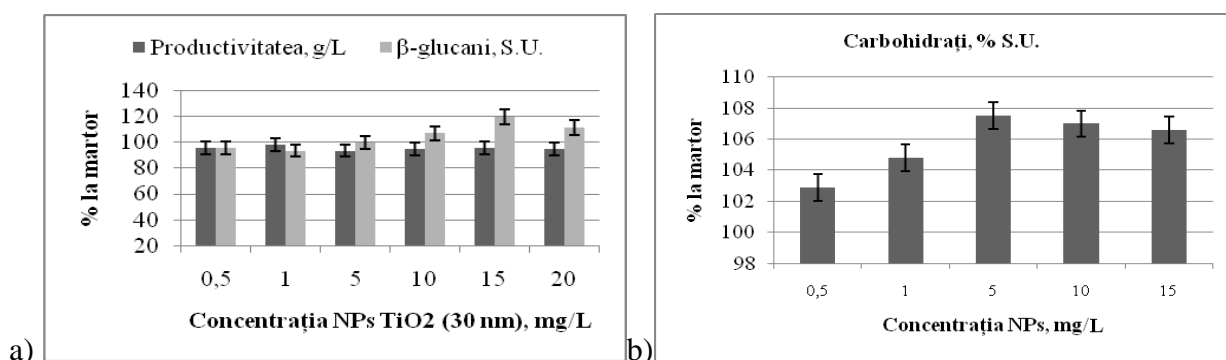


Fig. 3.1. Efectul diferitor concentrații a nanoparticulelor  $\text{TiO}_2$  (30 nm) asupra producției de biomasă și  $\beta$ -glucani (a) și conținutului de carbohidrați (b) la tulpina *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

În următoarele experiențe au fost investigate efectele nanoparticulelor oxidului de zinc. Pentru a argumenta utilizarea nanoparticulelor ZnO în scopuri biotehnologice a fost comparat efectul acestora în funcție de dimensiuni și concentrație asupra producției de biomasă, conținutului de  $\beta$ -glucani și altor componente celulare (carbohidrați, proteine).

Rezultatele obținute privind efectul nanoparticulelor ZnO în funcție de dimensiuni (10 și 30 nm) în concentrație de 0,5; 1 mg/L confirmă, că parametrii bioproductivi ai tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 nu se modifică substanțial comparativ cu variantele martor. Rezultatele modeste obținute ne-au sugerat necesitatea continuării cercetărilor în direcția majorării concentrațiilor.

Cercetările au fost orientate spre elucidarea efectelor nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație. Au fost utilizate nanoparticule ZnO cu aceleași dimensiuni 10 și 30 nm în concentrații mai mari (5, 10 și 15 mg/L) adăugate în mediu de cultură YPD.

Studiul privind conținutul de biomasă celulară a relevat că nanoparticule ZnO (10 nm) sunt tolerate de *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Fluctuațiile conținutului de biomasă la 1L mediu de cultură în variantele experimentale cu nanoparticule de 30 nm se caracterizează prin valori apropiate, ce se încadrează în marja de eroare 5% (Figura 3.2a).

Cu toate că cantitatea de biomasă sub influența nanoparticulelor practic nu se modifică,  $\beta$ -glucanii înscriu anumite variații cantitative. În dependență de dimensiunile și concentrațiile nanoparticulelor sporul de  $\beta$ -glucani a constituit 9-19%. Conținutul de  $\beta$ -glucani în biomasă celulară din variantele cu utilizarea nanoparticulelor ZnO cu dimensiunile de 30 nm a înregistrat o creștere mai mare comparativ cu cel din variantele cu aplicarea nanoparticulelor cu dimensiunile de 10 nm (Figura 3.2b).

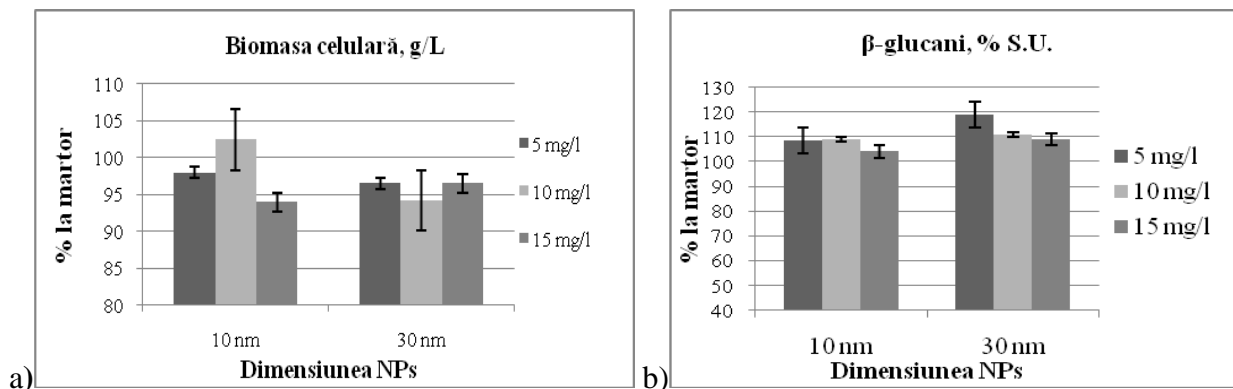


Fig. 3.2. Conținutul de biomasă (a) și β-glucani (b) a *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație.

Analiza rezultatelor cuantificării carbohidraților a pus în evidență tendința de creștere a conținutului acestora în probele experimentale cu aplicarea nanoparticulelor de ZnO de 30 nm în concentrații de 5, 10 și 15 mg/L. În aceste variante, cantitatea 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 au fost apropiate martorului (Figura 3.3a) [6].

Analiza comparativă a cantității de proteine acumulate de levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în experiențe a demonstrat, 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 3.3b).

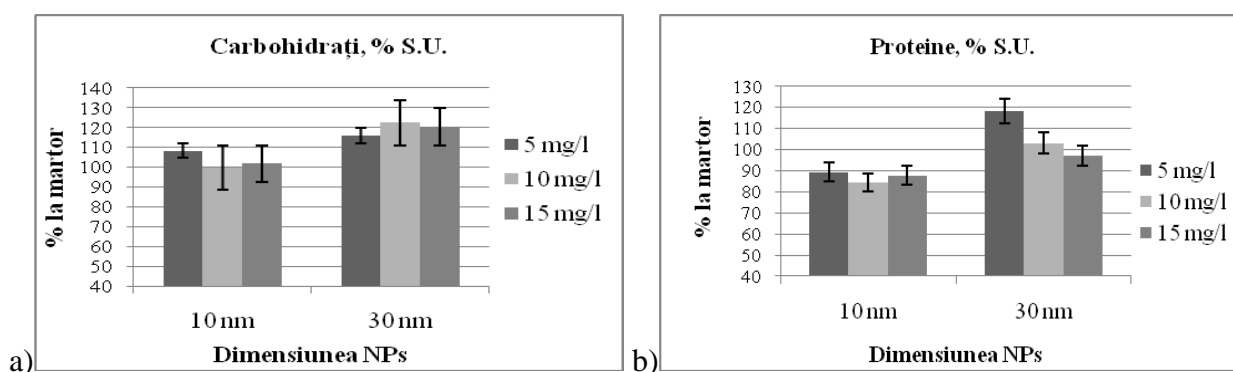


Fig. 3.3. Conținutul de carbohidrați (a) și proteine (b) în biomasă *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO în funcție de concentrație.

Datele privitor la aplicarea nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de 30 nm demonstrează că cantitatea de proteine în varianta cu concentrația 5 mg/L atinge valori cu 18% mai înalte față

de cea determinată în martor. Aceasta relevă nivelul înalt de eficiență a nanoparticulelor cu dimensiuni mai mari și superioritatea avansată comparativ cu nanoparticulele cu dimensiuni mici.

Generalizând rezultatele studiului putem concluziona că efectul nanoparticulelor TiO<sub>2</sub> și ZnO asupra dezvoltării tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 este determinat de dimensiunile și concentrațiile acestora. Pentru sporirea randamentului procedeele de cultivare dirijată a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și obținerea β-gluconilor se recomandă nanoparticulele ZnO cu dimensiunile de 30 nm în concentrație de 5-10 mg/L [28].

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, care pot duce la dereglări a proceselor metabolice, scopul cercetărilor expuse mai jos a constat în aplicarea nanoparticulelor ZnO (30 nm) pentru înlăturarea efectelor negative ale alcoolului. Aprecierea gradului de influență a nanoparticulelor oxidului de zinc s-a efectuat cercetând morfologia celulelor, reproducerea, producția de biomasă și componentelor celulare la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în prezența alcoolului etilic în mediul nutritiv în concentrație de 2, 5 și 10%.

Inițial s-a cercetat influența diferitor concentrații de alcool (2, 5 și 10%) asupra multiplicării celulelor, indicilor productivi și biosintetici ai tulpinii. S-a stabilit că alcoolul inclus în mediul de cultură YPD în concentrație de 5 și 10% inhibă multiplicarea celulelor. În consecință, la utilizarea concentrației 10% de alcool, scade considerabil cantitatea de biomasă cu 71% față de martor. Pentru a înlătura efectul toxic al alcoolului etilic au fost utilizate nanoparticule ZnO cu dimensiuni de 30 nm în concentrații de 5, 10 și 15 mg/L.

Un indicator important, ce caracterizează desfășurarea proceselor metabolice a culturii de levuri în condițiile acțiunii diferitor factori de cultivare, sunt proteinele. S-a stabilit, că nanoparticulele ZnO (30 nm) 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. Totodată, conținutul lor în variantele experimentale cu 5% alcool și nanoparticule ZnO crește nesemnificativ, cu 4-5% față de variantele martor (Figura 3.4).

Astfel, putem concluziona că nanoparticulele ZnO (30 nm), 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.

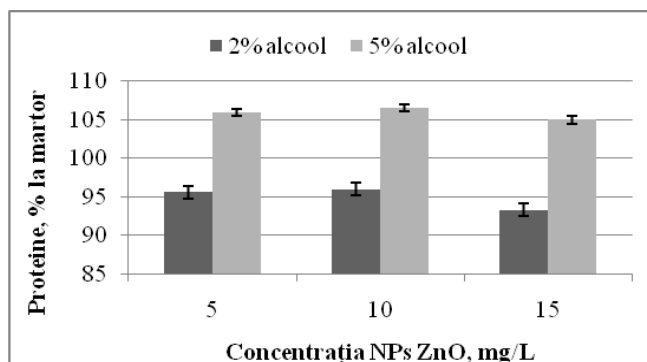


Fig. 3.4. Efectele nanoparticulelor ZnO (30 nm) în combinație cu alcoolul etilic asupra conținutului de proteine la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

În ce privește acumularea de biomasă, efect inhibitor s-a observat numai în variantele care conțineau 5% alcool și 10, 15 mg/L nanoparticule ZnO (30 nm), în care cantitatea de biomasă uscată s-a redus cu 13-18%. În variantele cu 2% alcool și 5-15 mg/L nanoparticule oxidului de zinc s-a stabilit o stimulare cu până la 10% a cantității de biomasă obținută (Figura 3.5a).

Analizând rezultatele ce țin de cantitatea  $\beta$ -glucanilor în biomasă levurii, s-a constatat că combinația alcool și nanoparticule provoacă activizarea procesului de biosinteză a acestora cu 12,1-19,9% față de martor, efect stimulator maximal observându-se la combinația 2% alcool și 5 mg/L nanoparticule (Figura 3.5b). Deci, în funcție de concentrația alcoolului din mediul de cultură, nanoparticulele ZnO (30 nm) pot produce schimbări semnificative ale unor indici funcționali ai levurii.

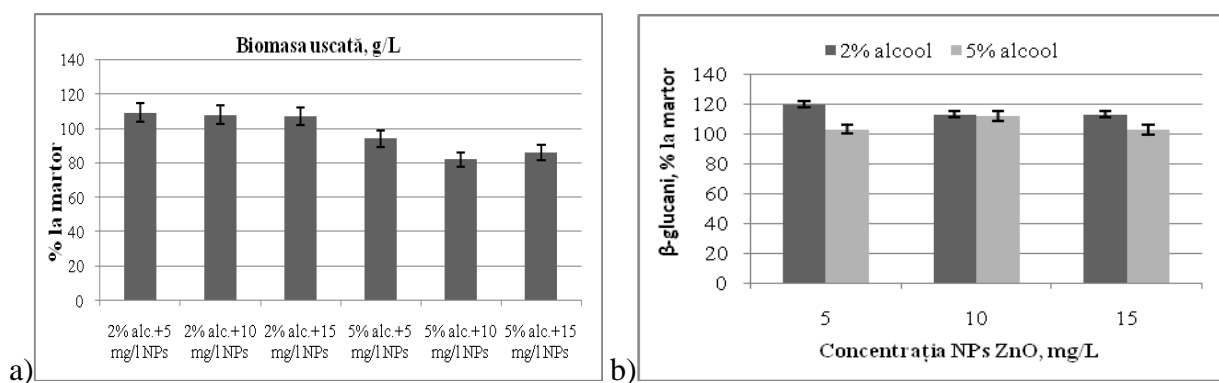


Fig. 3.5. Efectele nanoparticulelor ZnO (30 nm) în combinație cu alcoolul etilic asupra producției de biomasă (a) și conținutului de  $\beta$ -glucani, % S.U. (b) la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

În baza rezultatelor experimentale se propune un procedeu nou de sinteză orientată a  $\beta$ -glucanilor, care constă în adăugarea la mediul de nutriție YPD a 5 mg/L nanoparticule ZnO în combinație cu alcoolul etilic în volum de 2%.

Procedeul 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 5,5-6,6. La acest mediu se adaugă 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%, ( $2 \times 10^6$  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 se extrag  $\beta$ -glucanii. Aplicarea procedurii permite de a obține 1,32 g/L  $\beta$ -glucani, ceea ce constituie cu 30,7% mai mult față de martor.

#### **4. ELABORAREA TEHNOLOGIEI DE CULTIVARE A TULPINII *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CNMN-Y-20 ȘI DE OBȚINERE A $\beta$ -GLUCANILOR**

Undele milimetrice cu frecvență extra înaltă se studiază intensiv în calitate de modulatori ai structurii biochimice a diferitor obiecte medico-biologice. Efectele biologice se evidențiază în funcție de caracteristicile undelor milimetrice. În cadrul acestui capitol sunt prezentate rezultatele cercetărilor, care au fost orientate spre elucidarea efectelor undelor milimetrice asupra tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20, în funcție de frecvență și durata de iradiere.

Cercetările ce reflectă acțiunea undelor milimetrice în funcție de frecvență asupra viabilității tulpinii în studiu, particularităților morfo-culturale ale celulelor și coloniilor, parametrilor productivi și biosintetici au stabilit, că undele cu frecvența 60,12 GHz; 53,33 GHz și 42,19 GHz utilizate la tratarea materialului semincer în regim continuu, majorează viabilitatea celulelor, pe durata de iradiere 10-20 minute. Efect maximal de stimulare s-a observat după 24 ore de cultivare la iradiere cu frecvența  $f=42,19$  GHz timp de 10 minute sau iradierea la  $f=60,12$  GHz timp de 20 minute. Studiul particularităților morfo-culturale ale celulelor și coloniilor tulpinii, expuse la iradiere cu unde milimetrice de diferită frecvență ( $f=60,12$  GHz; 53,33 GHz; 42,19 GHz) pe durata a 10, 20 și 30 minute, indică asupra stabilității caracterelor examinate după 6, 24, 48 ore de la momentul iradierii.

Analizând producția de biomasă menționăm că undele milimetrice cu frecvențele examinate, emise timp de 10, 20, 30 minute în regim continuu 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 nesemnificativă a conținutului de biomasă (Figura 4.1a).

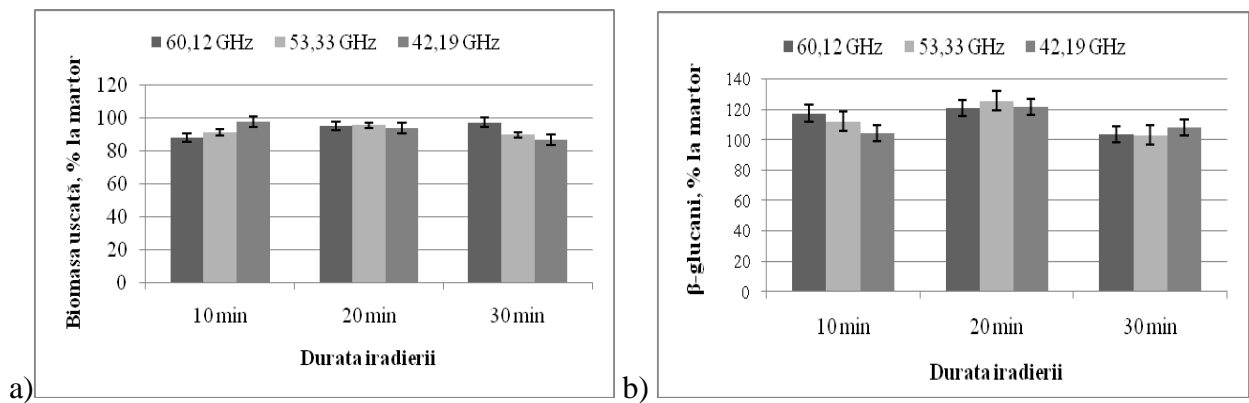


Fig. 4.1. Efectul undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă ( $f=60,12$  GHz;  $53,33$  GHz;  $42,19$  GHz) asupra acumulării biomasei (a) și conținutului de  $\beta$ -glucani (b)

la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Datele studiului biosintezei  $\beta$ -glucanilor au demonstrat că utilizarea undelor milimetrice în procesul de cultivare a levurii a contribuit la sporirea conținutului cantitativ al  $\beta$ -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. Devierea procentuală de la indicii martor constituie  $17,4\%$  și  $25,7\%$  spre stimularea cantității de  $\beta$ -glucani (Figura 4.1b). S-a constatat că lipsește tendința sigură atât spre sporire cât și spre micșorare a conținutului de  $\beta$ -glucani în variantele expuse undelor milimetrice timp de 30 minute, specifică tuturor frecvențelor utilizate.

În viziunea noastră, efectul biologic al undelor milimetrice are un prag temporal, 20 minute, după care expunerea obiectului biologic la iradiere nu conduce la mărirea efectului biologic. Din cele expuse este evident că creșterea semnificativă a conținutului de  $\beta$ -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.

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  $\beta$ -glucanilor.

În continuare, cercetările au avut drept scop evidențierea efectelor duratei de iradiere asupra componentelor celulare la *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 și identificarea valorilor maxime de acumulare a  $\beta$ -glucanilor cu utilizarea frecvenței selectate ( $f=53,33$  GHz).

Din rezultatele cercetărilor prezentate în Figura 4.2 putem observa că cantitatea maximală de  $\beta$ -glucani, carbohidrați și biomasă uscată (B.U.) este acumulată la iradierea culturii timp de 20



minute. Conținutul de biomasă este de 4,85-4,98 g/L, ceea ce depășește martorul cu 14,1-17,2%; al carbohidraților - de 35,94-36,33% din biomasa uscată sau cu 19,6-20,8% mai mult comparativ cu martorul neiradiat; al  $\beta$ -glucanilor - de 18,84-20,0% la substanța uscată sau cu 18,5-25,7% mai mult față de martor.

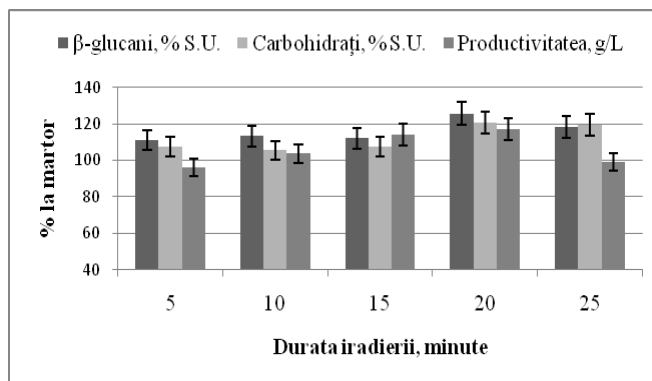


Fig. 4.2. Efectul undelor milimetrice cu frecvența  $f=53,33$  GHz asupra conținutului de  $\beta$ -glucani, carbohidrați și producției de biomasă la tulpina *S. cerevisiae* CNMNY-20 în funcție de durata iradierii.

Prin urmare, undele milimetrice cu frecvența 53,33 GHz pot fi utilizate în calitate de factor de sporire a procesului de biosinteză a  $\beta$ -glucanilor la tulpina *S. cerevisiae* CNMNY-20.

În baza acestor rezultate a fost elaborat un procedeu de stimulare a sintezei  $\beta$ -glucanilor, bazat pe iradierea tulpinii cu unde milimetrice cu frecvență  $f=53,33$  GHz timp de 20 minute. Avantajul procedurii propus constă în majorarea conținutului de  $\beta$ -glucani cu 25,7% față de martor. Procedeu a fost brevetat [3]. Procedeu de intensificare a biosintezei  $\beta$ -glucanilor include: prepararea materialului semincer prin cultivarea germenilor în submers 24 ore, la temperatura de 25°C; iradierea timp de 20 minute cu unde milimetrice cu frecvența extra înaltă ( $f=53,33$  GHz) emise în regim continuu; însămânțarea ulterioară a mediului de fermentație steril cu inocul iradiat ( $2 \times 10^6$  celule/ml), în concentrație de 5% în bază volumetrică; cultivarea în profunzime, în condiții de agitare continuă (200 rot/min) la 25°C, timp de 120 ore; separarea biomasei de lichidul cultural și extragerea  $\beta$ -glucanilor.

Revenind la rezultatele prezentate în capitolele 2 și 4 cu referință la metoda optimizată de extracție a  $\beta$ -glucanilor, utilizării nutrienților preferențiali, condițiilor optime de cultivare submersă, undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă a fost necesar de a combina procedeele elaborate într-un flux tehnologic avantajos, care permite obținerea de biomasă levuriană cu conținut sporit de  $\beta$ -glucani cu proprietăți biologice valoroase. În continuare sunt descrise cercetările care au permis să fie definite fazele principale ale tehnologiei.

După cum a fost demonstrat pe parcursul întregii lucrări, realizarea acestui obiectiv a fost posibilă datorită eficientizării procedeeului de extragere și purificare a  $\beta$ -glucanilor din biomasa levuriană, optimizării mediilor nutritive, condițiilor de cultivare, utilizării undelor milimetrice, procedee ce au contribuit la intensificarea procesului de biosinteză a  $\beta$ -glucanilor.

Schema fluxului tehnologic cu procedeele elaborate de obținere a  $\beta$ -glucanilor din levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 este prezentată în Figura 4.3.

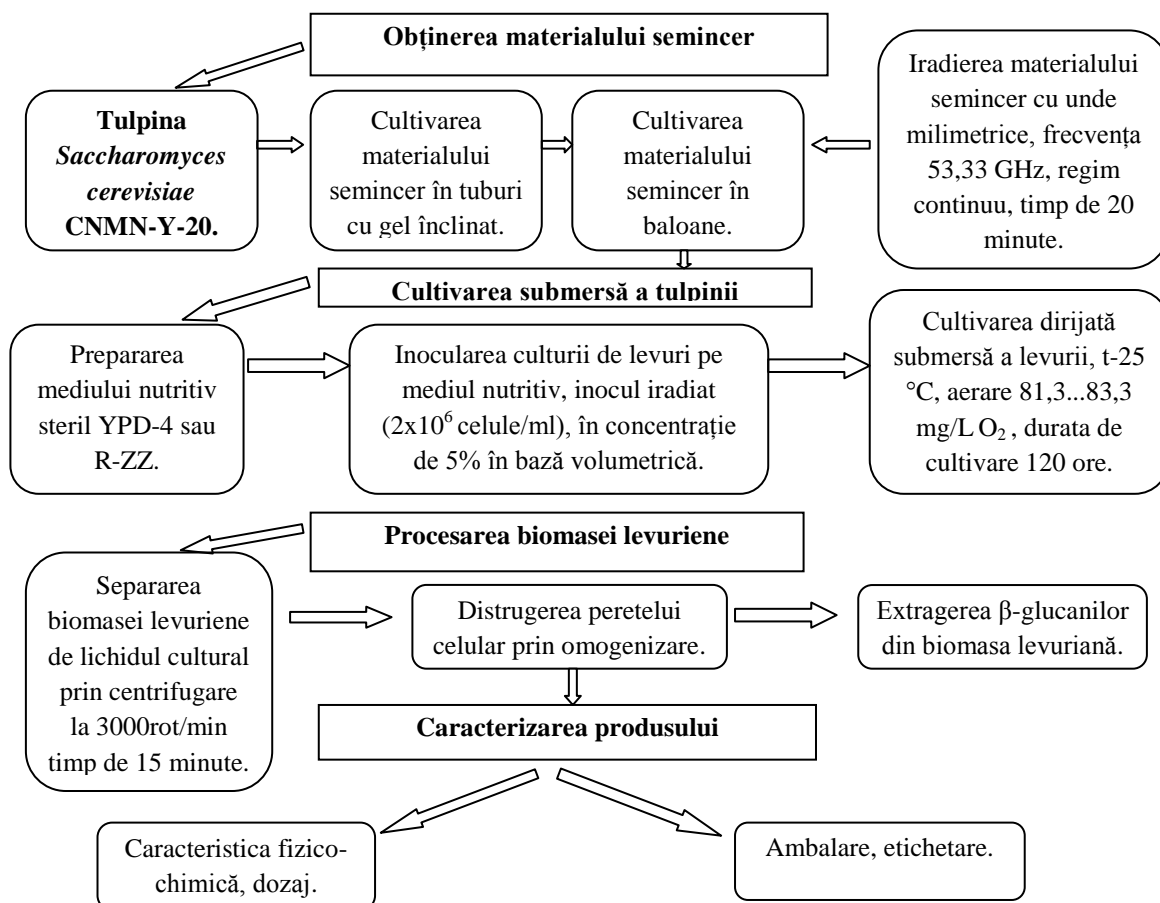


Fig. 4.3. Schema tehnologică de obținere a  $\beta$ -glucanilor din levura *S. cerevisiae* CNMN-Y-20.

Procesul tehnologic de cultivare a levurii în scopul obținerii de biomasă cu conținut sporit de  $\beta$ -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 aerație;

- Procesarea biomasei levuriene conform metodei optimizate pentru extragerea  $\beta$ -glucanilor.

Pentru a evalua 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  $\beta$ -glucanilor propusă de Thammakiti [26], 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.

Analiza rezultatelor obținute în cadrul experiențelor cu aplicarea tehnologiei elaborate în care s-a utilizat mediul YPD-4 a scos în evidență eficiența acesteia, care constă în obținerea a  $1,26 \pm 0,29$  g/L glucani, ceea ce depășește martorul cu 68,2%. Conținutul de  $\beta$ -glucani în peretele celular constituie 20,29% comparativ cu 16,2% determinate în variantele de control, ceea ce este cu 25,2 la sută mai mult comparativ cu indicii obținuți la utilizarea tehnologiei martor.

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 glucani ceea ce depășește martorul cu 91,7%.  $\beta$ -glucanii izolați din biomasa levuriană se analizează prin spectroscopia în infraroșu (FTIR) [29].

Astfel, putem afirma cu siguranță că tehnologia propusă permite sporirea conținutului de  $\beta$ -glucani, obținut la 1L de mediu de cultivare 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 mai mult bioproduct față de procedeul de referință [9].

Preparatul obținut în baza  $\beta$ -glucanilor a fost utilizat la furajarea puietului de pește, în particular pentru fortificarea viabilității și indicilor de creștere a puietului de coșac (*Ctenopharyngodon idella*). Cercetările au fost efectuate în colaborare cu cercetătorii Institutului de Zoologie, laboratorul Ihtiologie și Acvacultură. S-a stabilit, că furajul combinat pentru creșterea puietului de pești fitofagi, ce conține în componența sa bioproductul 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 [4].

Prin urmare, pe baza rezultatelor cercetărilor efectuate recomandăm utilizarea  $\beta$ -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 pești de specii fitofage.

## 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 O<sub>2</sub>/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% [5, 8].
3. Efectele nanoparticulelor TiO<sub>2</sub> 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 [6, 28].
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.
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 [3].
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 [9].
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 [4].

**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 procedeele de sinteză orientată a  $\beta$ -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  $\beta$ -glucani cu utilizări polivalente.
2. Două variante de medii nutritive, care asigură sporirea semnificativă a cantității de  $\beta$ -glucani în biomasa levuriană;
3. Două procedee de sinteză orientată a  $\beta$ -glucanilor cu aplicarea nanoparticulelor oxizilor de metale și undelor milimetrice cu frecvența extra înaltă ca factori reglatori;
4. Tehnologia de obținere a  $\beta$ -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  $\beta$ -glucanilor obținuți din biomasa levuriană.
3. Sunt de perspectivă cercetările pentru dezvoltarea industrială și experimentală la nivel pilot pentru stabilirea parametrilor tehnologici optimi.

### **BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ**

1. Anghel I. ș.a. Biologia și tehnologia drojdiilor. București: Ed. Tehnică, 1993, vol. 3. 308 p.
2. Brevet de invenție. 4048 C1, MD, C12N 1/16 C12P 39/00. Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* – sursă de  $\beta$ -glucani/ Chiselița O. ș. a. (MD). Cerere depusă 12.02.2010, BOPI nr. 6/2010.

3. Brevet de invenție. MD 4329. Procedeu de cultivare a tulpinii de levuri *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 / Agafia Usatfi, **Natalia Chiselița** ș.a. (MD). BOPI nr. 2/2015.
4. Brevet de invenție. MD 717. Furaj pentru puiet de pești fitofagi / Agafia Usatfi, Ana Dadu, **Natalia Chiselița**, Marin Usatfi. (MD). BOPI nr. 1/2014.
5. **Chiselița N.**, ș.a. Optimizarea matematică a mediului de cultură pentru producerea  $\beta$ -glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Studia Universitatis, seria „Științe ale naturii”. 2013, vol. 6(66), p. 49-53.
6. **Chiselița N.**, Usatfi A. Efectul nanoparticulelor ZnO asupra parametrilor bioproductivi 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.
7. Oniscu C., Cașcaval D. Inginerie biochimică și biotehnologie. 1. Ingineria proceselor biotehnologice. Iași: Inter Global, 2002. 451 p.
8. Usatfi A., **Chiselița N.**, ș.a. Rolul condițiilor de cultivare în biosinteza  $\beta$ -glucanilor la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2013, Nr. 2(320), p. 116-125.
9. Usatfi A., Molodoi E., **Chiselița N.**, ș.a. Biotehnologii de obținere din levuri a  $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor. În: Akademos. 2015, Nr. 1(36), p. 87-91.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Dey P., Harborn J. Methods in Plant Biochemistry. Carbohydr. Academic Press, 1993, vol. 2, 529 p.
14. 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.
15. Guțul T., et. al. Preparation of poly(N-vinylpyrrolidone)-stabilized ZnO colloid nanoparticles. In: Beilstein J. Nanotechnol., 2014, vol. 5, p. 402-406.

16. Javmen A., et al.  $\beta$ -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* Induces IFN- $\gamma$  Production In Vivo in BALB/c Mice. In: In Vivo, 2015, vol. 29, p. 359-364.
17. Lesage G., Bussey H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2006, vol. 70(2), p. 317-343.
18. Lowry O., et. al. Protein measurement with the folin phenol reagent. In: J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, p. 265-275.
19. 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.
20. Minju Jeong, et al. Cytotoxicity of Ultra-pure TiO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticles Generated by Laser Ablation. In: Bull. Korean Chem. Soc., 2013, vol. 34(11), p. 3301-3306.
21. Naruemon M., et al. Influence of additives on *Saccharomyces cerevisiae*  $\beta$ -glucan production. In: International Food Research Journal., 2013, vol. 20(4), p. 1953-1959.
22. 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.
23. Silke C. J., et al. Antioxidative activity of (1-3), (1-6)- $\beta$ -d-glucan from *S. cerevisiae* grown on different media. In: LWT-Food Sci. and Technol., 2008, vol. 41(5), p. 868-887.
24. Soltanian S., et al. The protective effect against *V. campbellii* in *A. nauplii* by pure  $\beta$ -glucan and isogenic yeast cells differing in  $\beta$ -glucan and chitin content operated with a source dependent time lag. In: Fish Shellfish Immunol. 2007, V. 23, nr. 5, p. 1003-1014.
25. 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.
26. Thammakiti S., et al. Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potential applications in the food industry. Int. J. of Food Science&Technol., 2004, vol. 39(1), p. 21-29.
27. 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.
28. Usatfi A., **Chiselita N.**, Efremova N. The evaluation of nanoparticles ZnO and TiO<sub>2</sub> effects on *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast strain. În: Acta Universitatis Cibiniensis Series E : Food Technology. 2016, v. XX (1), p. 85-92.
29. Zechner-Krpan V., et al. Characterization of  $\beta$ -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. In: Food Technol. Biotechnol., 2010, vol. 48(2), p. 189-197.

## PUBLICAȚIILE LA TEMA TEZEI:

### 2. Articole în diferite reviste științifice

#### 2.1. în reviste internaționale cotate ISI și SCOPUS

1. **Chiselița N.**, Usafii A., Bejenaru L., Tofan E., Efremova N. 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. ISSN 1224-5119

#### 2.2. în reviste din străinătate recunoscute

1. Usafii A., **Chiselița N.**, Efremova N. The evaluation of nanoparticles ZnO and TiO<sub>2</sub> effects on *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast strain. In: Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology. 2016, v. XX (1), p. 85-92. ISSN 2344-1496

2. **Chiselița N.**, Usafii A., Efremova N. The effects of ZnO nanoparticles in combination with alcohol on biosynthetic potential of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology, 2017, v. XXI (2), p. 19-24. ISSN 2344-1496

#### 2.3. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei

##### *Reviste de Categoria A:*

1. Bejenaru L., Usafii A., Tofan E., **Chiselița 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. ISSN 1068-375.

##### *Reviste de Categoria B:*

1. Usafii A., **Chiselița N.**, Molodoi E., Efremova N., Fulga L., Borisova T. Substraturi nutritive pentru dezvoltarea și biosinteza maximală a  $\beta$ -glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2013, Nr. 3(321), p. 123-131. ISSN 1857-064X

2. Usafii A., **Chiselița N.**, Molodoi E., Efremova N., Fulga L., Borisova T. Rolul condițiilor de cultivare în biosinteza  $\beta$ -glucanilor la *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2013, Nr. 2(320), p. 116-125. ISSN 1857-064X

3. Usafii M., Dadu A., Usafii A., **Chiselița N.** Fortificarea viabilității și indicilor de creștere a puietului de coșăș (*Ctenopharyngodon idella*) prin utilizarea tescovinei de struguri și bioproduselor levuriene. În: Știința Agricolă. 2013, Nr. 2, p. 101-105. ISSN 1857-0003

4. **Chiselița N.**, Usafii A., Borisova T., Rotaru A. Efectele undelor milimetrice asupra viabilității și caracterelor morfo-culturale ale tulpinii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2014, Nr. 1(322), p. 112-119. ISSN 1857-064X

5. Usafii A., **Chiselița N.** Metode de extragere din levuri a glucanilor și proprietățile lor fizico-chimice. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2015, Nr. 1(325), p. 153-160. ISSN 1857-064X



6. Usatfii A., Molodoi E.; **Chiselița N.**, Fulga L., Efremova N. Biotehnologii de obținere din levuri a  $\beta$ -glucanilor și manoproteinelor. În: Akademos. 2015, Nr. 1(36), p. 87-91. ISSN 1857-0461.
7. **Chiselița N.**, Usatfii A. Efectul nanoparticulelor ZnO asupra parametrilor bioproductivi 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. ISSN 1857-064X
8. Usatfii A., **Chiselița N.** Soluții inovative de cultivare a levurilor producătoare de  $\beta$ -glucani. În: Intellectus. 2016, Nr. 4, p. 77-80. ISSN 1810-7079
9. **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. ISSN 1857-064X

#### **Reviste de Categoria C:**

1. **Chiselița N.**, Usatfii A., Molodoi E., Efremova N., Fulga L., Borisova T. Optimizarea matematică a mediului de cultură pentru producerea  $\beta$ -glucanilor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Studia Universitatis, seria „Științe ale naturii”. 2013, vol. 6(66), p. 49-53. ISSN 1814-3237
2. **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. ISSN 1814-3237

#### **4. Materiale/ teze la forurile științifice**

##### **4.1. conferințe internaționale (peste hotare)**

1. Усатый А., Молодой Е., Ефремова Н., **Киселица Н.**, Фулга Л., Борисова Т. Оптимизация технологии получения  $\beta$ -глюканов и маннанов из клеточных стенок дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae*. Всероссийский симпозиум с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». Тезисы. 24-27 декабря 2014, Москва, стр. 233.
2. Усатый А., **Киселица Н.**, Гуцул Т. Влияние наночастиц ZnO на рост и биосинтез белка у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Международная научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов “Научные достижения молодежи – решению проблем питания человечества в XXI веке”. Киев, Украина, 11-12 апреля 2016, стр. 401.

##### **4.2. conferințe internaționale în republică**

1. **Chiselita N.** Nutrient medium for growing *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 strain – sources of  $\beta$ -glucan. In: 2<sup>nd</sup> edition for Scientific international conference on Microbial Biotechnology. 9-10 october, 2014, Chisinau, p. 113. ISBN 978-9975-4432-8-9.
2. Usatyi A., **Chiselitsa N.**, Borisova T., Cebotarenco S. New activation method of  $\beta$ -glucan biosynthesis by yeasts. In: 2<sup>nd</sup> edition for Scientific international conference on Microbial Biotechnology. 9-10 october, 2014, Chisinau, p. 191. ISBN 978-9975-4432-8-9.
3. **Chiselița N.** Influența surselor de carbon asupra biosintezei  $\beta$ -glucanilor la tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Conferința Științifică Internațională a Doctoranzilor

„Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”. 10 martie 2015, Chișinău, p. 69.

4. **Chiselița N.** The influence of ZnO nanoparticles on biosynthesis of  $\beta$ -glucans of *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeasts. În: Conferința Științifică Internațională “Științele vieții în dialogul generațiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri”. Chișinău, Moldova, 25 martie 2016, p. 72.

5. Usatfi A., Tofan E., Bejenaru L., **Chiselița N.**, Efremova N. Biotechnological aspects of physiologically active mannoproteins and  $\beta$ -glucans obtaining from yeasts. În: Conferința Științifică Internațională “Științele vieții în dialogul generațiilor: conexiuni dintre mediul academic, universitar și de afaceri”. Chișinău, Moldova, 25 martie 2016, p. 153.

6. **Chiselița N.**, Usatfi A., Guțul T. The influence of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on biosynthesis of  $\beta$ -glucans of *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast. În: The International Conference “NANO-2016 Ethical, Ecological and Social Problems of Nanoscience and Nanotechnologies”. Chișinău, Moldova, 11-14 Mai 2016, p. 9.

7. **Chiselița N.** Influence of ZnO nanoparticles on the biomass production and catalase activity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: International Scientific Conference on Microbial Biotechnology 3rd edition dedicated to the 70th anniversary of foundation of first research institutions and the 55th anniversary of the inauguration of the Academy of Sciences of Moldova. CHISINAU, MOLDOVA, OCTOBER 12-13, 2016, p.164.

#### **4.3. conferințe cu participare internațională**

1. **Chiselița N.**, Usatfi A. Modelarea biosintezei  $\beta$ -glucanilor la levuri prin aplicarea unor factori fizico-chimici. În: Integrare prin cercetare și inovare. Conferința științifică națională cu participare internațională. 10-11 noiembrie 2014, Chișinău, p. 30-33.

2. **Chiselița N.** Procedeu de stimulare a sintezei  $\beta$ -glucanilor cu ajutorul undelor milimetrice de frecvență extra înaltă la tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Conferința Științifică (cu participare internațională) a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, 25 mai 2016, p. 160-163.

3. **Chiselița N.** Procedeu de stimulare a sintezei  $\beta$ -glucanilor la tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. În: Conferința Științifică a Doctoranzilor (cu participare internațională) „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători”, Chișinău, 15 iunie 2017, p. 196-200. ISBN 978-9975-108-16-4.

#### **7. Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții**

1. Chiselița O., Usatfi A., Taran N., Rudic V., **Chiselița N.**, Adajuc V. Tulpină de drojdie *Saccharomyces cerevisiae* – sursă de  $\beta$ -glucani. Brevet de invenție MD 4048, BOPI 6/2010, p. 20-21.

2. Usatfi A., Dadu A., **Chiselița N.**, Usatfi M. Furaj pentru puiet de pești fitofagi. Hotărâre pozitivă, nr. 7671 din 15.11.2013. Brevet de invenție MD 717, BOPI 1/2014, p. 26.

3. Usatfi A., **Chiselița N.**, Efremova N., Molodoi E., Fulga L., Borisova T. Procedeu de cultivare a tulpinii de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20. Brevet de invenție MD 4329, BOPI 2/2015, p. 29-30.

## ADNOTARE

**Chiselița Natalia „Tehnologie de obținere a  $\beta$ -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*,  $\beta$ -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  $\beta$ -glucanilor din levuri.

**Obiectivele lucrării:** Selectarea nutrienților și condițiilor optime de cultivare submersă a tulpinii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 în vederea ameliorării biosintezei  $\beta$ -glucanilor; Elucidarea acțiunii nanoparticulelor oxizilor de metale asupra biosintezei  $\beta$ -glucanilor și altor constituente celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20; Evaluarea efectelor undelor milimetrice cu frecvență extra înaltă asupra biosintezei  $\beta$ -glucanilor și altor constituente celulare a levurii *S. cerevisiae* CNMN-Y-20; Elaborarea tehnologiei de obținere a  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -glucanilor. În premieră s-a demonstrat că nanoparticule  $\text{TiO}_2$  și  $\text{ZnO}$ , utilizate la cultivarea levurii, influențează procesul de biosinteză a  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -glucani în biomasa levuriană; metoda de extragere a  $\beta$ -glucanilor, caracterul inovațional al căreia permite de a reduce etapele suplimentare de distrugere a peretelui celular și extragere a  $\beta$ -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  $\beta$ -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*,  $\beta$ -глюканы, углеводы, белки, наночастицы, миллиметровые волны.

**Область исследования:** 167.01 – Биотехнология, бионанотехнология.

**Цель работы:** разработка эффективной инновационной технологии получения  $\beta$ -глюканов из дрожжей.

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

**Научная новизна и оригинальность.** Впервые предлагается инновационная технология культивирования дрожжей *S. cerevisiae* для получения  $\beta$ -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  $\beta$ -глюканов штаммом *S. cerevisiae* CNMN-Y-20. Впервые показано, что наночастицы  $\text{TiO}_2$  и  $\text{ZnO}$ , используемые в культивировании дрожжей, влияют на процесс биосинтеза  $\beta$ -глюканов и других клеточных компонентов, эффект которых зависит от их размера и концентрации. Впервые выявлен характер действия высокочастотных миллиметровых волн на биосинтез  $\beta$ -глюканов и других клеточных компонентов в зависимости от спектра и времени их действия. Впервые были разработаны два новых способа культивирования способствующих увеличению содержания  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -глюканов в биомассе дрожжей; метод экстракции  $\beta$ -глюканов, который позволяет сократить этапы разрушения клеточной стенки и экстракции  $\beta$ -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  $\beta$ -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*,  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -glucans; Elucidation of the action of the metal oxides nanoparticles on the biosynthesis of  $\beta$ -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  $\beta$ -glucans and other cellular constituents of *S. cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast; Elaboration of technology of obtaining  $\beta$ -glucans from the yeasts biomass.

**Scientific novelty of reasearch.** For the first time, an innovative technology is proposed for *S. cerevisiae* yeast cultivation and  $\beta$ -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  $\beta$ -glucan biosynthesis were established. For the first time, it has been demonstrated that TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles used in yeast cultivation influence the biosynthesis process of  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -glucans amount in the yeast biomass; the method of  $\beta$ -glucan extraction, the innovative character of which allows to reduce additional steps of cell wall destruction and  $\beta$ -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).

**CHISELIȚA NATALIA**

**TEHNOLOGIE DE OBȚINERE A  $\beta$ -GLUCANILOR DIN  
LEVURI**

**167.01- BIOTEHNOLOGIE, BIONANOTEHNOLOGIE**

Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice

Aprobat spre tipar: 12.06.2018

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Coli de tipar:1,8

Formatul hârtiei 60x84 1/16

Tirajul 50 ex.

Comanda nr. 58/18

Centrul Editorial-Poligrafic al USM

Str. Al. Mateevici, 60. Chișinău, MD 2009