

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis* și poate fi utilizată pentru obținerea enzimelor antioxidante superoxid dismutaza și catalaza cu potențial înalt de aplicare în industria microbiologică, farmaceutică și cosmetică.

În prezent o importanță deosebită au cercetările destinate dezvoltării biotehnologiilor de producere a enzimelor antioxidante superoxid dismutaza (SOD) și catalaza (CAT). SOD și CAT îndeplinesc un rol important în distrugerea radicalilor liberi și neutralizarea consecințelor stresului oxidativ. Un concept inovator în producerea biotehologică a enzimelor este utilizarea nanoparticulelor de Ag ca factor stimulator și regulator al proceselor de biosinteză.

Se cunoaște procedeul de cultivare a microalgei *Chlorococcopsis minuta* cu utilizarea diferitor strategii: excluderea nitrogenului și includerea fosforului, includerea nitrogenului și excluderea fosforului, excluderea nitrogenului și fosforului, includerea nitrogenului și fosforului [1]. Activitatea antioxidantilor enzimatici a fost determinată în condiții de stres oxidativ. Dezavantajul acestui procedeu constă în activitatea insuficientă a enzimelor SOD și CAT, utilizarea regimului de iluminare permanentă și a multor factori de cultivare cu sinecost înalt.

Mai este cunoscut procedeul de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu utilizarea compușilor coordonativi V(IV) și Co(III) cu diferiți liganzi de natură organică: L1 -  $[(VO)_2(2PyTCH)]SO_4 \cdot 4H_2O$ ; L2 -  $[(VO)_2(2PyCH)]SO_4 \cdot 4H_2O$ ; L3 -  $[(VO)_2(2PyFx)]SO_4 \cdot 4H_2O$ ; L4 -  $[Co(L-H)En] \cdot 3H_2O$ ; L5 -  $Na[Co(DH)_2(NO_2)_2]$  [2]. Dezavantajul acestui procedeu constă în timpul îndelungat de cultivare, utilizarea regimului de iluminare permanentă și inhibarea productivității cianobacteriei, iar în cazul utilizării compușilor coordonativi L1, L2 și L3 se manifestă scăderea SOD sub nivelul probei de control.

În calitate de cea mai apropiată soluție servește procedeul de cultivare a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 cu utilizarea mediului YPD, suplimentat cu nanoparticule de oxid de zinc cu dimensiuni de 50 nm și 100 nm. Cultivarea submersă s-a realizat în baloane Erlenmayer, pe agitatoare rotative (200 rot/min) la temperatura de 25°C, cu nivelul de aeraj de 80,0...83,0 mg/L, în decurs de 120 ore [3]. Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că nu asigură un nivel înalt de biosinteză a enzimelor antioxidante SOD și CAT și în timpul îndelungat de cultivare.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu de cultivare a levurilor *Rhodotorula gracilis*, care asigură sporirea biosintezei enzimelor antioxidante superoxid dismutaza și catalaza în biomasa levuriană.

Procedeul, conform invenției, constă în obținerea suspensiei de levuri a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03 prin cultivare timp de 24 de ore pe mediul YPD, inocularea suspensiei în concentrație de 5% vol. pe mediul YPD cu adăugarea nanoparticulelor de Ag cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 10,0...15,0 mg/L și cultivarea la temperatura de 25...28°C cu agitare continuă la 180...200 rot/min în decurs de 72 ore.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea semnificativă a activității SOD cu 40...52% și CAT cu 33...45% în biomasa levuriană și reducerea timpului de cultivare până la 72 ore.

Impactul stimulator al nanoparticulelor de Ag se datorează proprietăților unice de activare a sistemelor antioxidante de protecție a celulelor levuriene și capacității de a modifica metabolismul proteic. Nanoparticulele de Ag posedă un spectru de proprietăți antibacteriene, antiinflamatoare, anticancerigene și prezintă interes pentru aplicare în industria farmaceutică și cosmetică.

#### Exemple de realizare a invenției

##### Exemplul I

Se obține suspensia de levuri a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03, crescută timp de 24 de ore pe mediul YPD. Ulterior, suspensia de levuri se inoculează în 200 ml de mediu nutritiv YPD, ce conține g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie - 10 ml; apă potabilă – 1 L, pH 5,5, în volum de 5%. Se adaugă în condiții sterile în calitate de factor stimulator nanoparticule de Ag cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 10,0 mg/L. Cultivarea tulpinii se realizează în baloane Erlenmayer cu capacitate de 1,0 L în condiții de agitare continuă la 180...200 rot/min la temperatura de +28...30°C, în decurs de 72 ore. În calitate de control servește proba de biomasă levuriană din mediul nutritiv fără adăugarea nanoparticulelor. Activitatea catalazei a fost determinată conform metodei spectrofotometrice (Titova N.M., Subbotina T.N. Enzymology: Laboratory Workshop. Krasnoyarsk, Siberian Federal University, 2012, p. 60). Metoda se bazează pe tratarea probei suspensiei de levuri cu peroxid de hidrogen și un amestec de acetonă și iodură de potasiu. Activitatea superoxid dismutazei se măsoară prin metoda spectrofotometrică bazată pe capacitatea superoxid dismutazei de a inhiba reducerea tetrazolului nitro-albastru prin superoxid în prezența riboflavinei. O unitate de activitate a enzimei SOD a fost determinată ca cantitatea de SOD necesară pentru o reducere cu 50% a tetrazolului nitro-albastru. Activitatea SOD a fost exprimată în unități/mg/proteină (Nekrasova G.F., Kiseleva I.S. Guide to laboratory and practical classes. Ural State University, Ekaterinburg, 2008, p. 157).

Extractul proteic se caracterizează prin activitatea SOD de  $275 \pm 1,04$  unități/mg proteină față de  $196 \pm 0,5$  unități/mg proteină în cazul celei mai apropiate soluții și activitatea CAT de  $73,27 \pm 0,15$  unități/mg proteină față de  $55,0 \pm 0,8$  unități/mg proteină în cazul celei mai apropiate soluții. Sporul activității SOD este de 40% și CAT de 33%.

##### Exemplul II

Se obține suspensia de levuri a tulpinii *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03, crescută timp de 24 de ore pe mediul YPD. Ulterior, suspensia de levuri se inoculează în 200 ml de mediu nutritiv YPD ce conține, g/L: peptonă – 20,0; glucoză – 20,0; extract de drojdie - 10 ml; apă potabilă – 1,0 L, pH 5,5, în volum de 5%. Se adaugă în condiții

sterile în calitate de factor stimulator nanoparticule de Ag cu dimensiunea de 5 nm în concentrație de 15,0 mg/L. Cultivarea tulpinii se realizează în baloane Erlenmeyer cu capacitate de 1,0 L în condiții de agitare continuă la 180...200 rot/min la temperatura de +28...30°C, în decurs de 72 ore. În calitate de variantă de control servește proba cu mediul nutritiv fără aplicarea nanoparticulelor.

Extractul proteic se caracterizează prin activitatea SOD de 258±0,82 unități/mg proteină față de 196±0,5 unități/mg proteină în cazul celei mai apropiate soluții și activitatea CAT de 80,0±0,12 unități/mg proteină față de 55,0±0,8 unități/mg proteină în cazul celei mai apropiate soluții. Sporul activității SOD este de 52% și CAT de 45%.

Tabel

Impactul nanoparticulelor (NPs) de Ag (5 nm) asupra activității SOD și CAT la tulpina de levuri *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-03

Variante	Concentrația, mg/L	SOD, unități/mg proteină	%	CAT, unități/mg proteină	%
Invenția	10	275±1,04	140	73.27±0,15	133
	15	298±0,82	152	80.0±0,12	145
Cea mai apropiată soluție	NPs ZnO (50 nm) 30 mg/l	196±0,5	100	55,0±0,8	100

Rezultatele prezentate demonstrează o creștere a activității enzimice antioxidante și confirmă posibilitatea utilizării nanoparticulelor de Ag pentru sporirea activității SOD și CAT la levurile pigmentate *Rhodotorula gracilis*.