

ВЛИЯНИЕ НАНО ОКИСЛОВ НЕКОТОРЫХ МЕТАЛЛОВ НА БИОСИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ГИДРОЛАЗ МИКРОМИЦЕТОВ

Чилочи Александра¹, Тюрина Жанетта¹, Лаблюк Светлана¹, Дворнина Елена¹, Клапко Стелиана¹, Бивол Чезара¹, Гуцул Татьяна², Руссу Емил², Никорич Александр²

¹Институт микробиологии и биотехнологии Академии Наук Молдовы

²Институт электронной инженерии и нанотехнологий им. "Д. Гуцу" Академии Наук Молдовы

Rezumat

Lucrarea include date privind influența nanoparticulelor de TiO_2 , Fe_3O_4 , ZnO , MgO , ZnO/MgO (1:4) asupra activității enzimaticе a micromicetelor *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 și *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – producătoare de proteaze și *Aspergillus niger* CNMN FD 06 – producătoare de amilaze. S-a constatat varierea efectului nanomaterialelor în funcție de compoziția și concentrația compușilor, precum și particularitățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor producătoare și specificitatea complexului enzimatic sintetizat. Astfel, a fost relevată acțiunea benefică a particulelor ZnO и Fe_3O_4 și amestecului ZnO/MgO asupra sintezei proteazelor (în special proteazelor neutre), sporul activității enzimaticе variind în limita de 25,0-188,1%. În cazul micromicetei *Aspergillus niger* CNMN FD 06 – producătoare de amilaze, efectul nanooxidilor a fost preponderent inhibitor, excepție constituind compusul ZnO ce nu a afectat activitatea enzimatică.

Cuvinte-cheie: micromicete, nanoparticule, proteaze, amilaze.

Depus la redacție: 17 octombrie 2016

Adresa pentru corespondență: Ciloci Alexandra, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei 1, MD2028, Chișinău, Republica Moldova; E-mail: alexandra.ciloci@gmail.com; tel. (+373 22) 739824

Введение

В настоящее время наночастицы металлов и их соединений находят широкое применение в электронике, информационных технологиях, лакокрасочной и строительной промышленности. Заметно вырос интерес к изучению путей и возможностей применения частиц нанометровых размеров в качестве новых материалов в различных областях биологии и медицины: как носителей препаратов, применяемых в лечебных целях, в качестве антираковых препаратов, при создании новых лекарственных средств, в иммунологических исследованиях и т.д. Вследствие этого возникла необходимость изучить влияние наночастиц на живые организмы. Как известно, атомы многих металлов (Co, Cu, Mg, Zn, Fe и др.) активно участвуют в регулировании важнейших биохимических процессов живых организмов, входя в состав белков, ферментов, витаминов, гормонов и т.д., повышая активность многих ферментов и ферментных систем [12, 18, 21, 22, 24, 25]. Однако, на наноуровне, металлы и их соединения обладают рядом физических, химических и биологических свойств, которые отличаются от свойств этих же веществ микронного и более крупного размера:

- они настолько малы, что способны проникать через клеточную стенку и мембраны живой клетки вместе с жидкой фазой;
- характеризуются очень высокой удельной (в расчете на единицу массы)

поверхностью, что увеличивает их адсорбционную емкость, химическую реакционную способность и каталитические свойства;

- обладают пролонгированным действием, что отличает их от других соединений (солей хелатов) [14, 16].

К настоящему времени их влияние на различные биологические объекты окончательно не определено. Есть материалы, свидетельствующие об их токсическом воздействии [8, 14, 19, 20]. Также есть публикации, появившиеся в последние годы (2010-2015 гг.), в которых наночастицы соединений металлов характеризуются, как стимуляторы роста, развития и продуктивности (синтез биологически активных веществ) микроорганизмов [1, 4, 7, 8]. Однако, подобные работы, особенно по изучению воздействия нанометаллов и их соединений, на биосинтез внеклеточных гидролаз микроорганизмов находятся в начальной стадии исследования, что делает актуальным их проведение. Такие исследования необходимы как в теоретическом, так и практическом аспекте, учитывая тот факт, что внеклеточные ферменты микроорганизмов широко используются в биотехнологических целях для развития целого ряда прикладных областей сельского хозяйства, пищевой, химико-фармацевтической промышленности, медицины и т.д. [9, 15, 17]

Целью данной работы было выявить влияние нанокислов различных металлов на биосинтез внеклеточных гидролаз микромицетов *Trichoderma koningii* CNMN FD 15 и *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – продуцентов внеклеточных протеаз и *Aspergillus niger* CNMN FD 06 – продуцента внеклеточных амилаз.

Материалы и методы

В качестве биологических объектов исследований служили 3 штамма микромицетов с высоким уровнем биосинтеза гидролаз: *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN FD 15 и *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – продуценты протеаз [2, 3], *Aspergillus niger* CNMN FD 06 – продуцент амилаз.

Культивирование продуцентов осуществлялось в колбах Эрленмейера на 1,0 л (объем среды – 200 мл), в условиях постоянного перемешивания на качалках (180-220 об/мин.), при температуре 28-30°C на питательных средах, следующего состава, (г/л):

- для *T. koningii* CNMN FD 15 и *F. gibbosum* CNMN FD 12 – продуцентов протеаз: отруби пшеничные – 20,0; соевая мука – 10,0; CaCO₃ – 2,0; (NH₄)₂SO₄ – 1,0; pH 6,25.

- для *A. niger* 06 – продуцента амилаз: крахмал – 3,0; мука фасолевая – 9,0; отруби пшеничные – 18,0; KН₂PO₄ – 2,0; KCl – 0,5; MgSO₄ – 0,5; pH 5,0.

В качестве посевного материала использовалась водная суспензия спор 12-15-дневной культуры, выращенной на сусло-агаровой среде в количестве 10% от инокулированного объема, с плотностью 2-3x10⁶ спор/мл.

Было изучено влияние нано окислов MgO (11,7 nm), ZnO (30-40 nm), смесь ZnO /MgO (10,2 nm / 11,7 nm) в соотношении 1:4; TiO₂ (30 nm) и Fe₃O₄ (30 nm) [6, 10]. Наноматериалы вносились в стерильные питательные среды в концентрациях 5-10 мг/л одновременно с посевным материалом.

Растворы нужной концентрации наночастиц из твердых или жидких первичных препаратов готовились с использованием деионизированной воды, pH - 6,25. Для

диспергирования наночастиц, непосредственно перед внесением в питательную среду, приготовленные растворы обрабатывались ультразвуком в течение 5-10 мин. в ультразвуковой бане АОУУ-9050 Компании WilTec (Wildanger Technik) GmbH, Германия, 30W-50W, частота 40 кГц [5].

В качестве контрольной среды использовалась соответствующая питательная среда без наноматериалов. Определение энзиматической активности штаммов-продуцентов проводилось по методам, принятым в энзимологии по степени расщепления соответствующих субстратов:

- определение активности протеаз проводилось согласно методу Вильштеттера по степени гидролиза желатина в кислых (pH 3,6) и нейтральных (pH 7,4) условиях до аминокислот и полипептидов с последующим определением количества свободных карбоксильных групп [11].

- определение активности амилаз проводилось колориметрическим методом с йодом по степени гидролиза растворимого крахмала до декстринов различной молекулярной массы [23].

- статистическая обработка проводилась в соответствие с методом, предложенным Доспеховом с использованием компьютерной программы Microsoft Excel [13].

Результаты и их обсуждение

Было проведено тестирование биологических свойств нано-окислов различных металлов. Для исследования были взяты штаммы микромицетов с различными физиолого-биохимическими особенностями, синтезирующие внеклеточные ферментные комплексы с различной специфичностью действия: штаммы *T. koningii* CNMN FD-15 и *F. gibbosum* CNMN FD-12 – продуценты протеаз и штамм *A. niger* CNMN FD-06 – продуцент амилаз. К особенностям каждого штамма следует отнести также тот факт, что максимум своей энзиматической активности они проявляют в разные сроки культивирования. Поэтому для выяснения воздействия наноматериалов на оптимальную продолжительность культивирования (стационарная фаза) выращивание продуцентов и определение энзиматической активности проводилось в течение нескольких суток, в период, когда наблюдается максимум энзиматической активности продуцента при культивировании в классических условиях.

Известно, что биологическая активность металлов в сильнейшей степени зависит не только от формы, в которой он попадает в живой организм, но и от применяемой концентрации. Для ряда металлов характерен узкий интервал концентраций, необходимый для жизнедеятельности организмов или являющийся токсичным для них [18]. Чтобы учесть этот третий аспект исследований, каждое тестируемое соединение было взято для исследований в двух или трех концентрациях.

На первых этапах исследований было изучено влияние тестируемой группы наноматериалов на энзиматическую активность штаммов микромицетов *T. koningii* CNMN FD 15 и *F. gibbosum* CNMN FD 12 – синтезирующих протеолитические ферменты. Протеазы представляют собой комплекс ферментов, которые осуществляют частичный или полный гидролиз высокомолекулярных белковых соединений до олигомеров и мономеров (аминокислот) благодаря их способности расщеплять пептидные связи. Все известные протеиназы в соответствии с

природой их функциональных групп в активном центре распределены на шесть основных классов: сериновые, цистеиновые, треониновые, аспартатные, глутаматные и металлопептидазы [17]. Большое разнообразие протеаз в контрасте специфичности их действия, привлекает внимание исследователей на мировом уровне в виду достижения максимального использования их физиологического и биотехнологического потенциала [9].

В последние годы растет интерес к протеазам микробного происхождения, что вызвано широкими возможностями их использования для решения как теоретических (при изучении процессов метаболизма живых организмов), так и практических задач в связи с применением в биотехнологических производствах.

В таблице 1 представлены результаты по изменению активности кислых и нейтральных протеаз микромицета *Trichoderma koningii* под влиянием 5 типов наночастиц окислов различных металлов: MgO, смесь ZnO и MgO в соотношении 1:4, ZnO, TiO₂ и Fe₃O₄.

Таблица 1. Изменение энзиматической активности кислых и нейтральных протеаз микромицета *Trichoderma koningii* – 15 под влиянием наночастиц окислов различных металлов.

Нано-материал	Конц, мг/л	кислые протеазы				нейтральные протеазы			
		9 сутки		10 сутки		9 сутки		10 сутки	
		ед/мл	%	ед/мл	%	ед/мл	%	ед/мл	%
MgO	5	2,81±0,01	94,2	1,34±0,03	100,0	1,97±0,01	93,8	1,58±0,02	101,9
	10	3,05±0,01	102,3	1,38±0,01	102,7	2,18±0,04	103,8	1,47±0,08	94,8
ZnO/MgO	5	2,93±0,03	98,3	1,34±0,03	100,0	4,03±0,01	191,9	2,86±0,04	184,5
	10	3,64±0,02	122,3	2,52±0,02	188,1	6,05±0,01	288,1	2,35±0,07	151,6
ZnO	5	2,98±0,04	100,0	0,52±0,02	38,8	5,88±0,01	280,0	2,02±0,06	130,3
	10	3,34±0,01	112,1	2,85±0,01	212,7	5,42±0,01	258,0	2,87±0,02	185,2
TiO ₂	5	3,23±0,01	108,4	0,99±0,07	73,8	2,35±0,01	111,9	1,19±0,03	76,7
	10	2,94±0,03	98,8	0,60±0,04	44,8	2,10±0,04	100,0	2,02±0,06	130,6
Fe ₃ O ₄	5	3,00±0,01	100,8	1,85±0,01	138,1	2,96±0,01	140,9	1,36±0,06	87,7
	10	3,56±0,01	119,5	2,18±0,02	162,7	4,66±0,01	221,9	1,53±0,02	98,7
контроль	-	2,98±0,04	100,0	1,34±0,03	100,0	2,10±0,00	100,0	1,55±0,04	100,0

Наибольший интерес представляют данные, получаемые на 9-е сутки культивирования продуцента, так как это период, когда наблюдается максимум биосинтеза как кислых - 2,98 ед/мл, так и нейтральных протеаз – 2,10 ед/мл в контрольном варианте. На 10 сутки наблюдается снижение активности до 1,34 ед/мл и 1,55 ед/мл, соответственно.

Анализ результатов показывает, что наночастицы окиси магния оказывают практически нейтральное воздействие на протеолитическую активность продуцента. Ее уровень в опытных вариантах колеблется от 94,2% до 102,7% (кислые протеазы) и от 93,8% до 103,8% (нейтральные протеазы) независимо от использованной концентрации и периода культивирования. Наночастицы TiO₂ оказывают слабое стимулирующее воздействие, проявляемое при концентрации 5 мг/л на 9 сутки культивирования. Активность кислых протеаз в этом случае увеличивается на 8,4%, а нейтральных – на 11,9%, составляя 3,23 ед/мл и 2,35 ед/

мл, соответственно. На 10 сутки наблюдается снижение активности обоих типов протеаз по сравнению с максимальным контролем.

Наночастицы Fe_3O_4 оказывают более значительный стимулирующий эффект, чем наночастицы TiO_2 , проявляемый в большей степени при концентрации 10 мг/л (9 сутки). Для кислых протеаз он составляет – 19,5%, а для нейтральных – 121,9%, то есть уровень активности в этом варианте достигает значительных величин – 4,66 ед/мл, по сравнению с 2,10 ед/мл в контроле (увеличение более, чем в 2 раза). Наиболее высокий стимулирующий эффект наблюдается при использовании наночастиц смеси окислов цинка и магния (соотношение 1:4) и наночастиц окиси цинка. Активность кислых протеаз при концентрации 10 мг/л (9 сутки) составила 3,64 ед/мл и 3,34 ед/мл соответственно, что на 22,3% и 12,1% выше, чем в контрольном варианте (2,98 ед/мл). Воздействие этих наночастиц на активность нейтральных протеаз было более ощутимым, чем кислых при их использовании в обеих концентрациях – 5, 10 мг/л. Уровень активности нейтральных протеаз при использовании смеси ZnO/MgO составил 4,03 ед/мл (5 мг/л) и 6,05 ед/мл (10 мг/л) соответственно, что на 91,9% и 188,1% выше, чем в контроле (2,1 ед/мл). При внесении в среду культивирования наночастиц ZnO продуцент активно синтезирует нейтральные протеазы с активностью 5,88 ед/мл (конц. 5 мг/л) и 5,42 ед/мл (конц 10 мг/л), что на 180,0% и 158,0% выше, чем в контроле.

Таким образом, наночастицы смеси ZnO/MgO , ZnO , Fe_3O_4 можно рассматривать в качестве наиболее эффективных стимуляторов биосинтеза, как кислых, так и нейтральных протеаз микромицета *T. koningii* 15.

Микромицет *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 максимум активности как кислых, так и нейтральных протеаз проявляет на 5 сутки культивирования: 2,80 ед/мл (кислые протеазы) и 2,52 ед/мл (нейтральные протеазы). В таблице 2 представлены результаты по изменению активности обоих типов протеаз этого штамма под влиянием той же группы наноматериалов, которые были использованы для штамма *T. koningii*.

Из представленных результатов видно, что на активность кислых протеаз все использованные вещества оказывают нейтральное или ингибирующее воздействие, независимо от используемой концентрации или продолжительности культивирования. В качестве стимуляторов биосинтеза нейтральных протеаз изучаемого штамма могут быть использованы те же наноматериалы, что и для биосинтеза нейтральных протеаз *T. koningii* 15.

Довольно стабильный стимулирующий эффект оказывают два типа наноматериалов смесь ZnO/MgO (1:4) и ZnO в обеих изученных концентрациях (5 и 10 мг/л): 12,3% и 40,0% и 30,5% и 37,6%, соответственно. На 6 сутки культивирования продуцента стимулирующий эффект сохраняется, то есть падение активности менее резкое, чем в контроле. При использовании TiO_2 – стимулирующий эффект при концентрации 10 мг/л несколько меньше, чем при использовании предыдущих наноматериалов и составляет 25,0% от максимального контроля (2,52 ед/мл). Наиболее интересные данные получены при внесении в среду культивирования нано-окиси железа - Fe_3O_4 : активность нейтральных протеаз при концентрации 10 мг/л почти в два раза выше, чем в контроле - 4,84 ед/мл по сравнению с 2,52 ед/мл (Таб. 2).

Таблица 2. Изменение энзиматической активности кислых и нейтральных протеаз микромицета *Fusarium gibbosum* CNMN FD12 под влиянием наночастиц оксидов различных металлов.

Нано-материал	Конц, мг/л	кислые протеазы				нейтральные протеазы			
		5 сутки		6 сутки		5 сутки		6 сутки	
		ед/мл	%	ед/мл	%	ед/мл	%	ед/мл	%
MgO	5	2,16±0,01	77,1	0,00	0,00	2,66±0,01	105,6	1,26±0,03	141,7
	10	2,58±0,00	92,0	0,00	0,00	2,29±0,05	90,8	1,03±0,02	115,7
ZnO/MgO	5	2,39±0,02	85,0	1,01±0,04	109,0	2,83±0,01	112,3	1,09±0,08	122,5
	10	2,25±0,02	80,4	0,36±0,07	39,1	3,53±0,01	140,0	1,34±0,06	121,3
ZnO	5	2,30±0,01	82,3	0,84±0,01	91,3	3,29±0,02	130,5	1,08±0,06	121,3
	10	2,99±0,00	106,9	0,36±0,07	39,1	3,47±0,01	137,6	1,76±0,02	197,7
TiO ₂	5	2,80±0,01	100,0	0,52±0,05	56,5	3,02±0,01	119,8	1,54±0,04	173,0
	10	2,60±0,02	92,9	0,25±0,07	27,2	3,15±0,03	125,0	1,62±0,04	182,0
Fe ₃ O ₄	5	2,40±0,04	85,9	0,51±0,02	54,4	2,38±0,01	94,4	1,05±0,07	117,9
	10	2,21±0,01	78,9	0,85±0,04	91,4	4,84±0,00	192,1	1,51±0,05	169,7
контроль	-	2,80±0,00	100,0	0,92±0,09	100,0	2,52±0,07	100,0	0,89±0,01	100,0

Следующим этапом исследований было изучение влияния тестируемой группы наноматериалов на амилолитическую активность микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD-06. Амилолитические ферменты представляют собой комплекс ферментов, которые осуществляют гидролитическое расщепление крахмала и крахмалосодержащих материалов до декстринов различной молекулярной массы и особенно широко используются в различных отраслях пищевой промышленности [15]. Полученные результаты, представленные в таблице 3 показывают, что максимум амилолитической активности в контрольном варианте штамм проявляет на 5 сутки культивирования – 55,22 ед/мл; на 6 сутки наблюдается снижение активности до 41,02 ед/мл.

Внесение тестируемой группы наноматериалов в среду культивирования микромицета в концентрации 5 и 10 мг/л оказывает ингибирующее воздействие на амилолитическую активность продуцента независимо от использованной концентрации и продолжительности культивирования (5-6 сутки). Так, на 5 сутки культивирования уровень активности амилаз в опытных вариантах составляет 24,97-46,96 ед/мл (45,2-85,04% от активности контроля), на 6 сутки – 7,74-31,64 ед/мл (18,9-76,15% от контроля). Исключение составляет нано-соединение ZnO (концентрация 10 мг/л). При его использовании активность амилаз держится практически на уровне контроля.

Таблица 3. Изменение амилолитической активности (рН 4,7) микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 06 под влиянием наночастиц оксидов металлов.

Наноматериал	конц., мг/л	5 сутки		6 сутки	
		ед/мл	%	ед/мл	%
MgO	5	24,97±0,02	45,21	23,42±0,03	57,09
	10	27,72±0,01	50,20	7,77±0,02	18,94
ZnO/ MgO	5	38,72±0,02	70,12	31,24±0,01	76,16
	10	41,46±0,04	75,08	18,21±0,01	44,39

Таблица 3 (продолжение).

ZnO	5	42,84±0,01	77,58	23,42±0,02	57,09
	10	57,96±0,01	104,96	40,37±0,04	98,42
TiO ₂	5	46,96±0,06	85,04	28,64±0,07	69,82
	10	44,22±0,02	80,08	20,81±0,02	50,73
Fe ₃ O ₄	5	46,96±0,04	85,04	12,98±0,01	31,64
	10	46,96±0,01	85,04	31,24±0,06	76,15
контроль	-	55,22±0,02	100,0	41,02±0,02	100,0

Таким образом, из представленных результатов видно, что:

– Для усиления биосинтеза протеаз микромицетами *Trichoderma koningii* и *Fusarium gibbosum* в качестве наиболее эффективных стимуляторов могут быть использованы наночастицы смеси ZnO/MgO (1:4), ZnO и Fe₃O₄. Степень воздействия наночастицы на протеолитические комплексы варьирует в зависимости от штамма продуцента, что может быть обусловлено различием их свойств. У штамма *Trichoderma koningii* изучаемые наносоединения повышают активность как кислых (на 12,1-22,3%), так и нейтральных протеаз (на 121,9-188,1%). При этом, стимулирующий эффект для нейтральных протеаз значительно выше. У штамма *Fusarium gibbosum* отобранные наночастицы окислов металлов повышают активность только нейтральных протеаз, при этом в значительно меньшей степени, чем у штамма *Trichoderma koningii*. Стимулирующий эффект составляет 25-40% от контроля, и только наночастицы Fe₃O₄ обеспечивают проявление более значительного стимулирующего эффекта, который составляет 92,1% от контрольного варианта;

– На биосинтез амилаз микромицетом *Aspergillus niger*, изученная группа наноматериалов оказывает ингибирующее действие, за исключением ZnO в концентрации 10 мг/л. Его использование в этой концентрации оказывает нейтральное воздействие на амилолитическую активность продуцента.

Анализ полученных результатов позволяет сделать следующий **вывод**: воздействие наноматериалов на биосинтез внеклеточных гидролаз микромицетов зависит как от типа используемого нано-соединения, так и от физиолого-биохимических особенностей штамма и свойств синтезируемого им ферментного комплекса, и в первую очередь специфичности его действия.

Литература

1. Deependra, K.B., Subhankar, P. Zinc oxid nanoparticles modulates the production of β -glucosidase and protects its Functional State Under Alcoholic Condition in *Saccharomyces cerevisiae*. //Appl. Biochem. Biotechnol, 2014, 173, p. 155-166.
2. Deseatnic-Ciloci, A., Tiurina, J., Bivol, C., Clapco, S., Labliuc, S., Dvornina, E., Stratan M. Tulpina de fungi *Trichoderma koningii* Oudemans CNMN15 - producatoare de proteaze acide, neutre și alkaline. Brevet de invenție MD 4285. 2014-05-31.
3. Deseatnic-Ciloci, A., Tiurina, J., Lupașcu, G., Clapco, S., Labliuc, S., Stratan, M., Dvornina, E., Sașco, E. Tulpină de fungi *Fusarium gibbosum* CNMN FD 11 producător de proteaze acide și neutre, ilanaze și β -glucozidaze. Brevet MD 4186, BOPI 11/2012.
4. Driouch, H., Sommer, B., Wittmann, C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. //Biotechnol. Bioeng. 2010, 105(6), p. 1058-1068.
5. Gutul, T., Rastemisina, I., Postolachi, O., Nicoric, A., Dvornikov, D., Petrenco, P. Synthesis and biological application of magnetite nanoparticles. //Moldavian Journal of the

Physical Sciences, 2015, Vol.14, N 3-4, p.177-188.

6. Gutul, T., Rusu, E., Condur, N., Ursaki, V., Goncareenko, E., Vlazan, P. Preparation of Poly(N-vinylpyrrolidone) Stabilized ZnO Colloid Nanoparticles. //Beilstein Journal of Nanotechnology, 2014, 5, p. 402-406.

7. Mahendra, R., Nelson, E. Duran. Metal particles in microbiology. Berlin, Heidelberg; New York: Springer, 2011, 305 p.

8. Otero-Gonzalez, L., Garcia-Saucedo, C., Field, J. A., Sierra-Alvarez, R. Toxicity of TiO₂, ZrO₂, FeO, Fe₂O₃, and Mn₂O₃ nanoparticles to the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.// Chemosphere, 2013, 93, p. 1201-1206.

9. Rao, M.A.B., Aparna, M. Tanksale, Monini, S. Ghatge, Vasanti V. Deshpande. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. //Microbiology and Molecular Biology Reviews. Sept. 1998, vol. 62, Nr. 3, p.507-635

10. Rusu, E., Ursaki, V., Gutul, T., Vlazan, P., Siminel, A. Characterization of TiO₂ Nanoparticles and ZnO/TiO₂ Compozite Obtained by Hydrothermal Method. //IFMBE Proceeding 55, p.93-97,2016. DOI:10.1007/878-981-287-736-9-22

11. Грачёва, И.М., Грачёв, Ю.П. и др. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. – М.: Легкая и пищ. пром., 1982. - с. 41-44.

12. Дедюхин, Э.Г., Ерошин, В.К. Незаменимые химические элементы в регуляции метаболизма микроэлементов. //Успехи микробиологии. РАН, 1991. 25. с. 172-141.

13. Доспехов, Б., Планирование полевого опыта и статистическая обработка данных. Москва, Колос, 1985 с. 192-196.

14. Завильгельский, Г.Б., Котова, В.Ю., Хрульнова, С.А., Манухов, И.В. Оценка токсического действия наноматериалов на живые организмы. //Биотехнология, 2013, № 6, с. 8-17.

15. Квеситадзе, Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. Тбилиси: Мецниереба, 1984. 154 с.

16. Копач, О.В., Кузовкова, А.А., Азизбекян, С.Г., Решетников, В.Н. Использование наночастиц микроэлементов в биотехнологии лекарственных растений: воздействие наночастиц меди на клеточные культуры *Silybum marianum* L. //Труды БГУ 2013, том 8, часть 2, с. 20-23.

17. Кудрявцева, Н.Н., Софьин, А.В., Ревина, Т.А., Гвоздева, Е.Л., Иевлева, Е.В., Валуева, Т.А. Секрция протеолитических ферментов тремя фитопатогенными микроорганизмами. //Прикладная биохимия и микробиология. 2013, т. 49, № 5, с. 513-521.

18. Леменовский, Д.А. Соединения металлов в живой природе. Соровский образовательный журнал. 1997, № 9, с. 48-54.

19. Минуллина, Р. Т. Оценка токсичности наноматериалов с использованием микроорганизмов. Автореферат докт. диссерт. Казань, 2014.

20. Муха, Ю.П., Еременко, А.М., Смирнова, Н.П. и др. Антимикробная активность стабильных наночастиц серебра заданного размера. //Прикл. биохимия и микробиология, 2013, т.49, №2, с.215-223.

21. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Серба Е.М., Трифонова В.В. Сравнительная характеристика микробных протеаз по степени гидролиза субстратов. //Прикладная биохимия и микробиология, 1997, том 33, № 1, с.43-48.

22. Роуз Э. Химическая микробиология. Москва: Мир, 1971, 293 с.

23. Рухлядева А.П., Палыгина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. М.: Легкая и пищ. Пром., 1981, с. 50-69.

24. Феоктистова, Н. В., Знаменская, Л. В., Лецинская, И. Б. Влияние ионов металлов на синтез внеклеточных ферментов спорообразующими бактериями. //Биологические науки. Москва: Высшая школа, № 2 (338), 1992, с. 22-24.

25. Фогарти, В.М. Микробные ферменты и биотехнология. Москва: Агропромиздат, 1986, с. 153-184.