

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN CHIMIE**

***MECANISME MOLECULARE IMPLICATE ÎN
BIOACUMULAREA IONILOR METALICI***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Doctorand,
Lavinia Liliana Ruță (Cocîrlă)**

**Conducător doctorat,
Prof. univ. dr. Ion Baci**

2014

CUPRINS

(numerotarea paginilor este cea din teza de doctorat)

Lista de abrevieri	1
Introducere	3
Partea I. Considerații teoretice și date din literatură	3
I.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - eucariot model utilizat ca potențial biosorbent	8
I.1.1. Avantajele utilizării <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ca biosorbent în biosorpția metalelor	9
I.1.2. Diferite forme de celule de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizate în procesele de bioremediere	10
I.1.3. Mecanisme utilizate de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pentru îndepărtarea metalelor grele	11
I.1.4. Efectul pretratării celulelor asupra biosorpției	16
I.1.5. Factori externi care influențează capacitatea <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de preluare a metalelor	17
I.5.1.1. Influența <i>pH</i>-ului asupra preluării ionilor metalici de către <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
I.5.1.2. Influența concentrației inițiale de metale asupra preluării acestora de către <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
I.5.1.3. Influența temperaturii asupra preluării metalelor de către <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
I.5.1.4. Influența timpului de contact cu ionii metalici în cazul preluării acestora de către <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
I.5.1.5. Influența condițiilor de mediu asupra preluării ionilor metalici de către <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
I.5.1.6. Influența caracteristicilor ionului metalic asupra preluării ionilor metalici de către <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
I.5.1.7. Influența mediului de cultură al celulelor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> asupra preluării ionilor metalici	21
I.1.6. Factori interni ce influențează capacitatea de preluare a metalelor de către <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
I.1.6.1. Influența tipului de celule de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> asupra preluării metalelor	22
I.1.6.2. Influența vârstei celulelor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> asupra preluării metalelor	22
I.2. Metale grele	23
I.2.1. Surse de metale grele în mediu înconjurător	23
I.2.2. Impactul metalelor grele asupra mediului înconjurător	24
I.2.3. Îndepărtarea metalelor din mediu înconjurător	24
I.2.4. Toxicitatea metalelor grele	25
I.2.5. Efectul metalelor grele asupra celulelor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
I.2.5.1. Nichel	26
I.2.5.2. Cobalt	27
I.2.5.3. Mangan	28
I.2.5.3.1. Transportul ionului de mangan în celulele de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
I.2.5.3.2. Transportul ionului fosfat în celulele de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
I.2.5.3.3. Conexiunea fosfat-mangan: preluarea Mn^{2+} de către <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediată de Pho84p	36
I.2.5.4. Cadmiu	38
I.2.5.4.1. Transportul și homeostazia ionului de Cd^{+2} în celulele de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
I.2.5.4.2. Cd^{+2} și apărarea antioxidantă în celulele de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
I.2.5.4.2.1. Modificări la nivelul proteinelor	43

I.2.5.4.2.	Modificări la nivelul acizilor nucleici	44
I.2.5.5.	Cupru	45
I.3.	Manipularea celulelor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> în vederea creșterii capacității de a acumula metale grele	48
Partea II. Contribuții originale		50
Capitolul II.1. Acumularea Ni⁺² și Co⁺² în linii mutante de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>		50
II.1.A.	Considerații generale	51
II.1.B.	Rezultate și discuții	52
II.1.B.1.	Determinarea concentrațiilor toxice ale ionilor de Me ²⁺ asupra liniei parentale de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
II.1.B.2.	Obținerea și selecția liniilor celulare mutante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tolerante la concentrații ridicate de ioni de Me ²⁺	53
II.1.B.3.	Caracterizarea creșterii liniilor celulare tolerante la ionii de Me ⁺²	53
II.1.B.4.	Determinarea capacității de acumulare a Me ²⁺ pentru liniile celulare mutante	55
II.1.B.5.	Determinarea distribuției intracelulare a ionilor Me ²⁺ în mutanții <i>nir4</i> , <i>nir5</i> și <i>cor5</i>	56
II.1.B.6.	Mutanții <i>nir</i> și <i>cor</i> pot scădea conținutul de Me ²⁺ din mediu	57
II.1.B.7.	Concluzii	58
II.1.C.	Partea experimentală	59
II.1.C.1.	Linii și condiții de stocare și creștere	59
II.1.C.2.	Evaluarea creșterii liniilor celulare în prezența ionilor metalici în mediu lichid	60
II.1.C.3.	Creșterea celulară în experimente de spotare	60
II.1.C.4.	Mutagenizarea și selecția celulelor mutante rezistente la Me ²⁺	60
II.1.C.5.	Disecția tetradelor	60
II.1.C.6.	Extracția diferențială a sărurilor de Me ²⁺ solubile în citosol și vacuole	61
II.1.C.7.	Determinarea concentrației de Me ²⁺ acumulată în materialul biologic	61
II.1.C.8.	Determinarea concentrației proteinelor celulare	62
Capitolul II.2. Utilizarea liniilor celulare “kamikaze” pentru îndepărtarea ionilor metalici Mn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ și Cd²⁺ din efluenți sintetici		64
II.2.A.	Considerații generale	65
II.2.B.	Rezultate și discuții	66
II.2.B.1.	Studiul comportamentului celulelor de <i>Saccharomyces cerevisiae pmr1Δ</i> în prezența ionilor metalelor grele	66
II.2.B.2.	Studiul influenței ionilor Mn ²⁺ , Cu ²⁺ și Co ²⁺ asupra fenotipului nul-mutant <i>pmr1Δ</i>	67
II.2.B.3.	Studiul influenței ionului de Cd ²⁺ asupra fenotipului nul-mutant <i>pmr1Δ</i>	69
II.2.B.4.	Studiul capacității celulelor <i>Δpmr1</i> de a separa ionii metalelor grele din efluenți sintetici	70
II.2.B.5.	Concluzii	76
II.2.C.	Partea experimentală	78
II.2.C.1.	Linii celulare, medii și condiții de creștere	78
II.2.C.2.	Acumularea metalelor de către celulele vii	78
II.2.C.3.	Determinarea concentrației ionilor metalici acumulați în celule	79
II.2.C.4.	Determinarea proteinelor celulare	79
II.2.C.5.	Bioremedierea efluenților sintetici prin utilizarea celulelor vii într-un sistem batch în serie	79
Capitolul II.3. Efectul supraexprimării genei <i>PHO84</i> asupra acumulării ionilor metalici		81
II.3.A.	Considerații generale	83
II.3.B.	Rezultate și discuții	84
II.3.B.1.	Obținerea unei linii hiperacumulatoare de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> care supraexprimă gena <i>PHO84</i>	84
II.3.B.2.	Efectul supraexprimării genei <i>PHO84</i> asupra creșterii celulare	84
II.3.B.3.	Supraexprimarea genei <i>PHO84</i> sub controlul promotorului <i>GALI</i> conduce la creșterea acumulării metalelor grele în celule de <i>Saccharomyces</i>	85

	<i>cerevisiae</i>	
	II.3.B.4. Supraexprimarea genei <i>PHO84</i> declanșează calea UPR	89
	II.3.B.5. Localizarea transportorului Pho84p în celule care supraexprimă gena <i>PHO84</i>	90
	II.3.B.6. Supraexprimarea genei <i>PHO84</i> în celulele <i>ire1Δ</i> conduce la creșterea acumulării ionilor metalici	91
	II.3.B.7. Evaluarea cantitativă a acumulării ionului fosfat ca efect al supraexprimării genei <i>PHO84</i>	93
	II.3.B.8. Celulele <i>pmr1Δ</i> care supraexprimă gena <i>PHO84</i> sunt hiperacumulatoare de Mn^{2+}	94
	II.3.B.9. Concluzii	97
II.3.C.	Partea experimentală	99
	II.3.C.1. Linii celulare, medii și condiții de creștere	99
	II.3.C.2. Plasmide	100
	II.3.C.3. Izolarea ADN-ului genomic din celulele de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	101
	II.3.C.4. Amplificarea genei <i>PHO84</i> prin PCR	101
	II.3.C.5. Electroforeza produșilor obținuți prin PCR	102
	II.3.C.6. Purificarea produșilor PCR	103
	II.3.C.7. Ligarea fragmentelor PCR în vectorul de clonare pCR [®] 2.1-TOPO	103
	II.3.C.8. Transformarea celulelor de <i>Escherichia coli</i>	103
	II.3.C.9. Izolarea plasmidelor din coloniile de celule rezistente la ampicilină	103
	II.3.C.10. Purificarea fragmentelor de ADN prin excizie din gel de agaroză	104
	II.3.C.11. Transformarea celulelor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	104
	II.3.C.12. Obținerea plasmidelor pPHO84-pGREG505/506	105
	II.3.C.13. Obținerea plasmidului pPHO84-pGREG600	106
	II.3.C.14. Evaluarea creșterii celulelor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pe mediu selectiv	107
	II.3.C.15. Acumularea metalelor de către celulele vii	107
	II.3.C.16. Localizarea constructului Pho84p-GFP	108
	II.3.C.17. Determinarea β-galactozidazei	108
	II.3.C.18. Determinarea cantitativă a ionilor de fosfat	109
	II.3.C.19. Reproductibilitatea rezultatelor	110
	II.3.C.20. Analiza statistică	111
	Capitolul II.4. Mesagerul secundar Ca^{2+} mediază răspunsul la toxicitatea Cd^{2+} în celulele de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	113
	II.4.A. Considerații generale	115
	II.4.B. Rezultate și discuții	116
	II.4.B.1. Celulele de drojdie expuse la concentrații mari de Cd^{2+} răspund printr-o creștere tranzitorie a Ca^{2+} citosolic	116
	II.4.B.2. Răspunsul mediat de Ca^{2+} la ionii de Cd^{2+} din mediu depinde de Ca^{2+} exogen	117
	II.4.B.3. Eliberarea $[Ca^{2+}]_{cit}$ indusă de Cd^{2+} se produce mai repede decât absorbția Cd^{2+}	119
	II.4.B.4. Mutanții defectivi în gene implicate în homeostazia Ca^{2+} prezintă diverse grade de toleranță la Cd^{2+}	122
	II.4.B.5. $[Ca^{2+}]_{cit}$ modulează toleranța față de Cd^{2+}	124
	II.4.B.6. Toleranța/sensibilitatea la Cd^{2+} a mutanților defectivi în gene implicate în răspunsul la stres oxidativ se corelează cu $[Ca^{2+}]_{cit}$	125
	II.4.B.7. Concluzii	128
II.4.C.	Partea experimentală	129
	II.4.C.1. Linii celulare, medii și condiții de creștere, plasmide	129
	II.4.C.2. Monitorizarea <i>in vivo</i> a pulsurilor de calciu induse de stresul metalic	129
	II.4.C.3. Evaluarea creșterii celulare prin teste pe mediu solid.	130
	II.4.C.4. Acumularea Cd^{2+} de către celulele vii	130
	II.4.C.5. Reproductibilitatea rezultatelor	131
	II.4.C.6. Analiza statistică	131
	Capitolul II.5. Acțiunea protectoare a extractelor de <i>Vaccinium corymbosum</i> asupra celulelor de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expuse la Cd^{2+}	133

II.5.A. Considerații generale	135
II.5.B. Rezultate și discuții	136
II.5.B.1. Extractul de <i>Vaccinium corymbosum</i> protejează celulele de drojdie de toxicitatea Cd²⁺	136
II.5.B.2. Hipersensibilitatea la Cd²⁺ a celulelor <i>yap1Δ</i> este ameliorată extractul VB într-o manieră dependentă de doză	138
II.5.B.3. Efectul cianidinei asupra toxicității Cd²⁺ în celule de drojdie	140
II.5.B.4. Extractul de VBE și cianidina protejează celulele de drojdie împotriva toxicității Cd²⁺, însă nu interferează cu acumularea Cd²⁺ în celule de drojdie	142
II.5.B.5. Concluzii	144
II.5.C. Partea experimentală	144
II.5.C.1. Prepararea extractelor de afine	144
II.5.C.2. Determinarea conținutului total de fenoli	140
II.5.C.3. Determinarea conținutului total de antocianidine	145
II.5.C.4. Linii celulare și condiții de creștere	145
II.5.C.5. Studii de creștere	145
II.5.C.5.1. Studiul creșterii celulare în mediu lichid	146
II.5.C.5.2. Studiul creșterii celulare în mediu lichid	146
II.5.C.6. Testul haloului	146
II.5.C.7. Viabilitatea celulară	146
II.5.C.8. Acumularea metalelor de către celulele vii	146
II.5.C.9. Determinarea preluării extractului de VB de către celulele de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	147
II.5.C.10. Reproducibilitatea rezultatelor	147
Anexa 1	151
A.1. Obținerea unei linii hiperacumulatoare de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> care supraexprimă gena <i>PHO84</i>	151
A.2. Harta plasmiului pGREG505	160
A.3. Harta plasmiului pGREG506	161
A.4. Harta plasmiului pGREG600	162
A.5. Obținerea dublului mutantului <i>pmc1 Δ vcx1Δ</i>	
Anexa 2	163
Soluții și medii de cultură	163
Anexa 3	168
Linii celulare	168
Bibliografie	171
Concluzii generale	180

(Numerotarea tabelor, figurilor și a trimiterilor bibliografice este cea din teza de doctorat)

Teza este structurată în două părți principale: **Considerații teoretice și date din literatură**, în care sunt descrise datele din literatura de specialitate cu privire la tematicile de cercetare abordate, și **Contribuții originale** care prezintă partea experimentală abordată în manieră proprie.

În primul capitol sunt prezentate aspecte generale referitoare la *Saccharomyces cerevisiae* un eucariot model utilizat ca potențial biosorbent. Sunt prezentați factorii externi și interni care influențează capacitatea *Saccharomyces cerevisiae* de preluare a metalelor din mediile poluate, în special din mediul aquatic. În al doilea capitol sunt discutate noțiuni și date despre metalele grele, evidențiindu-se sursele de metale grele în mediu înconjurător, impactul metalelor grele asupra mediului înconjurător, îndepărtarea metalelor din mediu înconjurător, toxicitatea metalelor grele și efectul lor asupra celulelor de *Saccharomyces cerevisiae*. În al treilea capitol sunt prezentate modalitățile de manipulare a celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* în vederea creșterii capacității de a acumula metale grele.

Obiectivul principal al acestei teze l-a reprezentat obținerea unor linii de *Saccharomyces cerevisiae* capabile să acumuleze cantități semnificative de ioni metalici cu potențial poluant, precum și crearea unor sisteme celulare cu rol în bioremedierea apelor poluate cu metale grele. Acest obiectiv a fost atins prin studiul mecanismelor moleculare implicate în bioacumularea ionilor metalici.

Activitatea prezentată în teză a urmărit **cinci direcții de cercetare**.

Bioremedierea apelor contaminate cu metale grele prin tehnici clasice fizico-chimice este scumpă și nepotrivită în cazul efluenților voluminoși care conțin materii organice complexe și concentrații mici de metale contaminante. Abordările biotehnologice alternative au beneficiat de o atenție sporită în ultimii ani. Liniile de celule modificate prin inginerie genetică, care ar putea hiperacumula metale grele poate fi un instrument valoros în îndepărtarea unor astfel de ioni din medii apoase.

Prima direcție de cercetare a tezei se referă la obținerea prin mutagenză chimică a unor linii de *Saccharomyces cerevisiae* care să fie rezistente la concentrații mari de metale grele și, de asemenea, să fie capabile să acumuleze aceste metale într-o formă non-toxică, cu scopul de a le folosi pentru bioremedierea apelor uzate sau contaminate. În urma studiilor efectuate, s-au obținut două linii de *Saccharomyces cerevisiae* tolerante la concentrații mari de Ni^{2+} și o linie tolerantă la concentrații ridicate de Co^{2+} ; aceste linii au prezentat capacitatea de a acumula metalele respective în vacuole. Un aspect important îl constituie faptul că liniile mutante obținute au avut

capacitatea de a scădea concentrația de ioni metalici din mediu într-un singur ciclu de creștere, ceea ce le face buni candidați în vederea utilizării lor în procesele de bioremediere.

În a doua direcție de cercetare s-a studiat posibilitatea utilizării unor linii – “kamikaze” cu potențial crescut de bioacumulare a metalelor grele, dar care sunt ucise în procesul de bioremediere. Cea mai interesantă a fost linia celulară defectivă în pompa ATP-azică *Pmr1p*, responsabilă de detoxifierea celulară prin excluderea metalelor prin calea secretorie. S-a demonstrat că linia nul-mutantă *pmr1Δ* a avut o capacitate crescută de a îndepărta Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} sau Cd^{2+} din efluenți sintetici, datorită abilității de a hiperacumula acești cationi.

Datorită acumulării crescute a metalelor, liniile celulare mutante a fost mai eficiente decât cele de tip sălbatic în îndepărtarea metalelor grele din efluenți sintetici care conțineau cationi în concentrație de 1-2 mM, cu o selectivitate ce a scăzut în ordinea $Mn^{2+} > Co^{2+} > Cu^{2+}$ și, de asemenea, au fost mai eficiente în îndepărtarea Mn^{2+} și Cd^{2+} din efluenții sintetici ce conțineau cationi în concentrație de 20-50 μM , selectivitatea fiind $Mn^{2+} > Cd^{2+}$.

Totodată, s-a dovedit că celulele *pmr1Δ* au avut o tendință generală de a acumula cantități mari de ioni metalici, în comparație cu celulele care exprimă gena *PMR1* în mod normal.

A treia direcție de cercetare a urmărit obținerea unor linii hiperacumulatoare de metale grele, nu prin eliminarea unor gene implicate în detoxifierea celulară, ci, dimpotrivă, prin supraexprimarea unor gene care codifică transportori pentru ionii metalici. De asemenea, s-au studiat efectele supraexprimării genei asupra capacității celulelor de a bioacumula ioni metalici.

Pho84p, este o proteină responsabilă de absorbția de înaltă afinitate și transportul fosfatului anorganic prin membrana plasmatică, fiind de asemenea implicată în absorbția de mică afinitate a metalelor grele din celulele de *Saccharomyces cerevisiae*. În această parte a tezei s-a demonstrat că, în condițiile unui excedent de ioni metalici, celulele de drojdie care supraexprimă gena *PHO84* dobândesc o capacitate crescută de a bioacumula Mn^{2+} , Cu^{2+} sau Co^{2+} , iar în unele fenotipuri genetice, celulele devin hiperacumulatoare.

Supraexprimarea genei *PHO84* în celulele de *Saccharomyces cerevisiae* a declanșat răspunsul la proteinele incorect pliate (UPR), mediat de *Ire1p*, proteina

Pho84p putând fi găsită din abundență doar în celulele *ire1Δ* (lipsite de gena care codifică o kinază transmembranară ce transmite semnalul despre existența proteinelor incorect pliate către RE). În condițiile existenței unui exces de metale grele în mediu, supraexprimarea genei *PHO84* a condus la creșterea acumulării ionilor metalici în celulele de tip sălbatic, acumularea fiind exacerbată prin deleția genei *IRE1*. Celulele *pmr1Δ* (lipsite de gena care codifică o pompă ATP-azică de tip P, care transportă Ca^{2+} și Mn^{2+} în aparatul Golgi), hiperacumulează Mn^{2+} chiar din mediu de creștere normal, atunci când supraexprimă gena *PHO84*, un fenotip care este destul de limitat la plantele hiperacumulatoare de metale.

Pentru o mai bună înțelegere a mecanismelor implicate în adaptarea și supraviețuirea celulelor la stresul produs de metalele grele, în a patra direcție de cercetare s-au studiat efectele expunerii la concentrații ridicate de metale transmise în interiorul celulei, prin intermediul mesagerului secundar Ca^{2+} . Folosind celule de *Saccharomyces cerevisiae* care exprimă o fotoproteină transgenică sensibilă la Ca^{2+} , s-a constatat că printre metalele testate, doar excesul de Cd^{2+} a fost transmis rapid prin creșterea $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$.

Celulele de drojdie răspund printr-o creștere bruscă a Ca^{2+} citosolic atunci când sunt expuse la Cd^{2+} , și în mai mică măsură la Cu^{2+} , dar nu și când sunt expuse la Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} sau Hg^{2+} . Răspunsul la concentrații ridicate de Cd^{2+} depinde în principal de Ca^{2+} extern (transportat prin canalul Cch1p/Mid1p), dar și de Ca^{2+} vacuolar (eliberat în citoplasmă prin canalul Yvc1p). Adaptarea la concentrații mari de Cd^{2+} a fost influențată de variațiile apărute în homeostazia Ca^{2+} . Datele obținute în această parte a tezei indică faptul că prezența unor concentrații mari de Cd^{2+} în mediul este semnalizată prin descărcări imediate și bruște de Ca^{2+} citosolic. Aparent, aceste descărcări bruște de Ca^{2+} manifestate prin picuri ascuțite în spectrele de luminiscentă, permit adaptarea la concentrații mari de Cd^{2+} , în timp ce absența semnalizării prin $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ sau descărcări mari și persistente de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ sunt responsabile pentru hipersensibilitatea la Cd^{2+} .

Având în vedere că unele linii celulare care s-au dovedit a fi hiperacumulatoare de metale grele mor din cauza toxicității metalelor respective, în a cincea direcție a studiului s-a încercat utilizarea unor antioxidanți din plante pentru a proteja celulele de stresul indus de prezența metalelor în celule.

Fructele de *Vaccinium corymbosum* L. sunt o sursă bogată de antioxidanți și se consideră că consumul lor poate contribui la protecția împotriva stresului oxidativ.

Patru specii de afine au fost utilizate în studiu, și s-a constatat că extractele cu conținut total ridicat de antocianidine au prezentat un efect protector semnificativ față de toxicitatea cadmiului și a H_2O_2 . Atât extractele de afine, cât și cianidina pură prezintă efecte protectoare față de expunerea la cadmiu a celulelor, într-un mod dependent de doză, dar fără a interfera în mod semnificativ cu acumularea cadmiului în celulele de drojdie.

S-a demonstrat astfel că extractul de *Vaccinium corymbosum* are un efect protector față de celulele de *Saccharomyces cerevisiae* expuse la ionii de Cd^{2+} , unul dintre cele mai toxice metale studiate.

În lumina datelor prezentate, dintre substanțele testate, extractele de afine pot fi considerate drept candidați interesanți pentru protejarea celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* potențial utilizabile ca bioremediatori ai apelor contaminate cu ioni metalici, având efecte benefice împotriva expunerii la Cd^{2+} .

Lista de lucrări publicate:

1. **Ruță L.L.**, Popa V.C., Nicolau I., Daneț A.F., Iordache V., Neagoe A.D., Fărcășanu I.C., FEBS Letters, 2014; 588, 3202–3212
2. Oprea E., **Ruță L.L.**, Nicolau I., Popa C.V., Neagoe A.D., Fărcășanu I.C., Food Chem. 2014;152:516-21
3. Ofițeru A.M., **Ruță L.L.**, Rotaru C., Dumitru I., Ene C.D., Neagoe A., Fărcășanu I.C., Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 94 (2):425-35
4. **Ruță L.**, Paraschivescu C, Matache M, Avramescu S, Fărcășanu IC, Appl. Microbiol. Biotechnol, 2010:85 (3), 763-771
5. M.Simion, **L. Ruță**, C. Mihăilescu, I.Kleps, A. Bragaru, M. Miu, T.Ignat, I. Baci, Superlattice and Microstructures, 2009;45, 69-76.
6. Fărcășanu I.C, Paraschivescu C., **Ruță L.L.**, Oprea E., Avramescu S., Revue Roumaine de Chimie, 2008; 53(8): 647–651
7. Fărcășanu I.C., Oprea E., Paraschivescu C., **Ruță L.L.**, Avramescu S., Revista De Chimie, 2008; 59 (9):1041-1044