

CZU: 579.222:577.152:547.96:582.282

PROFILUL ACTIVITĂȚII CATALAZEI ȘI PRODUCERII DE PROTEINE LA SACCHAROMYCES CEREVISIAE CNMN-Y-20 SUB INFLUENȚA NANOPARTICULELOR ZnO

Agafia USATÎI, Natalia CHISELIȚA

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie

În lucrare sunt prezentate date noi despre relațiile dintre activitatea enzimei antioxidante catalaza și parametrii de producere a biomasei și proteinelor la tulpina *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 sub influența nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de 10, 30 și <100 nm. S-a stabilit că cantitatea de proteine și activitatea enzimei antioxidante catalaza la tulpina de levuri, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO, se modifică în funcție de dimensiunile și concentrațiile utilizate. Nanoparticulele cu dimensiunile de 10 nm inițiază o micșorare relativă a cantității de proteine în biomasă, valori care s-au observat la toate concentrațiile aplicate. Nanoparticulele cu dimensiuni de 30 nm au exprimat efect pozitiv numai sub influența concentrațiilor mici – de 1-5 mg/L. Rezultatele obținute la aplicarea nanoparticulelor cu dimensiuni mai mari (<100 nm) indică tendințe de sporire a cantității de proteine la levura aflată în contact cu concentrațiile de 0,5-1 mg/L, iar concentrațiile de 5-15 mg/L micșorează aceste valori. Studiul privind relația dintre indicii cantității de proteine și cei ai activității catalazei în biomasa *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la contact cu nanoparticule ZnO, a relevat o dependență medie și slabă în funcție de dimensiunile nanoparticulelor. Astfel, finalizând această analiză, putem presupune că nanoparticulele oxidului de zinc, pătrunzând în lichidul biologic al celulei, intră în contact cu componentele celulare, determinând accelerarea sau întârzierea proceselor biosintetice.

Cuvinte-cheie: *Saccharomyces cerevisiae*, nanoparticule ZnO, biomasă celulară, proteine, catalază.

PROFILE OF THE CATALASE ACTIVITY AND PROTEIN PRODUCTION AT SACCHAROMYCES CEREVISIAE CNMN-Y-20 UNDER THE ZnO NANOPARTICLES INFLUENCE

This work offers new data regarding the relations between the antioxidant enzyme activity – catalase and the parameters of biomass production and proteins of *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 strain under the influence of 10, 30 and <100 nm ZnO nanoparticles. It was established, that the proteins amount and the antioxidant enzyme activity - catalase at the yeast strain at the cultivation in presence of ZnO nanoparticles has changed depending on dimensions and the ZnO nanoparticles concentrations. The 10 nm nanoparticles initiated a relative decrease of the protein quantity in the biomass, values observed at all applied concentrations. The 30 nm nanoparticles have given a positive effect only in the case when were used low concentrations of 1-5 mg/L. The obtained results with the application of nanoparticles with larger dimensions (<100 nm) indicated trends of increase of the protein amount in the yeast strain in contact with 0,5-1 mg/L concentrations, but the 5-15 mg/L concentrations decreased these values.

The study regarding the relation between the indices of proteins amount and the catalase activity in *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 biomass in contact with ZnO nanoparticles revealed an average and low dependence in function of the nanoparticles dimensions.

Thus, finishing this analysis we can assume that zinc oxide nanoparticles, penetrating into the cells cytoplasm, get in contact with cellular components, can determine an acceleration or a delay of biosynthetic processes.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, ZnO nanoparticles, cell biomass, proteins, catalase.

Introducere

Nanotehnologia are potențialul de a revoluționa diferite domenii, inclusiv industria alimentară, farmaceutică, cosmetică, biotehnologii de obținere a principiilor bioactive din microorganisme [1]. Datorită dimensiunilor reduse (1-100 nm) și proprietăților unice chimice și fizice, nanoparticulele ar putea aduce modificări substanțiale în diferite sisteme biologice. Studiile recente demonstrează că nanoparticulele, datorită dimensiunilor mai mici față de celulele și organitele celulare, sunt foarte mobile și pot penetra structuri biologice, astfel perturbând funcționarea normală a acestora [2-4]. O importanță majoră pentru determinarea potențialelor efecte ale nanoparticulelor asupra organismelor vii au cercetările cu aplicarea modelelor experimentale biologice.

Indicatori importanți ai reacției celulei la acțiunea nanoparticulelor sunt enzimele antioxidante și proteinele. Catalaza, una dintre enzimele antioxidante, participă în conversia peroxidului de hidrogen ($2\text{H}_2\text{O}_2=2\text{H}_2\text{O}+\text{O}_2$), care este un agent oxidant puternic, cu caracter toxic pentru celule; astfel, enzima permite desfășurarea în

bune condiții a unor procese celulare. Proteinele, fiind formate exclusiv din aminoacizi, se întâlnesc în celule alături de alte componente importante, cum ar fi polizaharidele, lipidele, acizii nucleici. Proteinele pot fi enzime care catalizează diferite reacții biochimice în organism, altele pot juca un rol important în menținerea integrității celulare (proteinele din peretele celular), în răspunsul imun și autoimun al organismului.

Nanoparticulele ZnO deseori sunt utilizate ca bioprodus antimicrobian. Nanoparticulele oxidului de zinc cu dimensiuni medii de $\sim 50 \pm 10$ nm, testate pe ciuperci patogene în concentrație de 100 mg/L, au demonstrat efect antimicrobic evident [5]. Nanoparticulele ZnO, datorită proprietăților antimicrobiene, sunt încorporate într-o varietate de produse farmaceutice cu aplicații dermatologice, în creme, loțiuni și unguente [6]. Totodată, numeroase cercetări realizate pe parcursul ultimilor ani la cultivarea unor tulpini de levuri, în scopul reglării proceselor de biosinteză cu utilizarea nanoparticulelor metalice, confirmă eficiența aplicării lor pentru medierea dezvoltării și obținerii diferitelor principii bioactive valoroase cu aplicații în diferite domenii [7]. O analiză amplă a efectelor nanoparticulelor asupra stabilității formării proteinelor și activității enzimelor antioxidante ar permite să înțelegem mecanismele care stau la bază, iar aceste rezultate ar oferi un model prin care pot fi distinse stările celulare.

Oportune în acest context apar investigațiile menite să elucideze modificările provocate de nanoparticulele ZnO asupra producției de biomasă și a conținutului de proteine în corelare cu modificările activității catalazei, cunoștințe ce pot promova idei de valorificare eficientă a potențialului biosintetic al levurilor, rezultate necesare pentru a completa informațiile disponibile în prezent.

Material și metode

Obiect de studiu, medii de cultură, condiții de cultivare. În cadrul cercetărilor a fost utilizată tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 selectată ca producător de β -glucani [8]. Pentru inoculare și cultivarea submersă a levurii s-a utilizat mediul de fermentație specific tulpinilor de levuri YPD [9]. Cultivarea submersă s-a efectuat în baloane Erlenmeyer cu capacitatea de 1L, la agitator cu viteza de rotație 200 r.p.m., temperatura de 25°C, durata de contact cu nanoparticule 120 de ore. Mediul lichid de fermentare s-a însământat în volum de 5% cu inocul 2×10^6 celule/ml.

În experimente au fost utilizate nanoparticule ZnO cu dimensiuni de 10 nm și de 30 nm, obținute și caracterizate de către cercetătorii de la Institutul de Inginerie Electronică și Nanotehnologii [10] și cu dimensiuni < 100 nm (produs SIGMA). Nanoparticulele au fost stabilizate în polivinilpirolidon (PVP). Concentrațiile nanoparticulelor utilizate la cultivarea levurilor au variat de la 0,5 la 15 mg/L. În calitate de martor s-a cercetat varianta fără aplicarea nanoparticulelor.

Metode de cercetare. Producția de biomasă levuriană a fost determinată gravimetric [11]. Proteinele au fost măsurate spectrofotometric conform metodei Lowry [12], utilizând în calitate de standard albumina cristalină din serul bovinelor. Activitatea catalazei a fost determinată conform metodelor descrise în [13,14]. Prelucrarea statistică a rezultatelor s-a realizat cu ajutorul setului de programe Statistica 7.

Rezultate și discuții

Analiza rezultatelor cultivării levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 pe mediul YPD a demonstrat că, la contactul cu nanoparticulele ZnO de diferite dimensiuni, în concentrații de la 0,5 la 15 mg/L, cantitatea de biomasă produsă practic nu se modifică (Fig.1). De aici reiese că tulpina ușor se adaptează la condițiile acțiunii nanoparticulelor timp de 120 de ore, astfel că procesele de multiplicare a levurii se desfășoară în mod obișnuit.

Sub acțiunea diferiților factori fizici (ultrasunete, radiații cu diferite lungimi de undă, căldură), factori chimici (acizi, baze, diferiți solvenți organici) sau mecanici (agitare) poate avea loc fenomenul de modificare a structurii proteinelor, care poate fi reversibilă sau ireversibilă [15]. Din aceste considerente, cercetările ulterioare au fost axate pe identificarea acțiunii nanoparticulelor ZnO asupra conținutului de proteine în biomasa celulară a levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20.

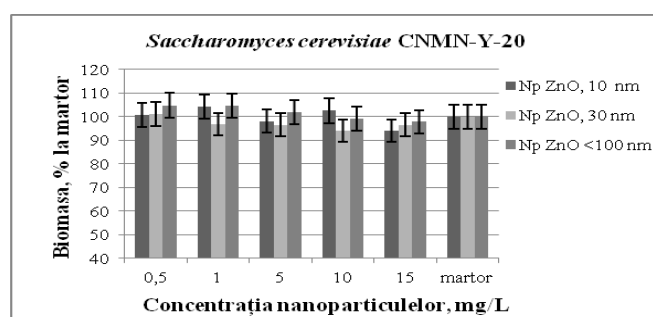


Fig.1. Valorile procentuale față de martor ale acumulării biomasei celulare *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni.

Cercetările efectuate au scos în evidență că nivelul conținutului de proteine în biomasa celulară se modifică în funcție de dimensiunile și concentrația nanoparticulelor utilizate. Pentru nanoparticulele cu dimensiuni mici (10 nm) este specifică o micșorare relativă (cu 10-15%) a cantității de proteine, valori care s-au observat la toate concentrațiile aplicate (Fig.2). Nanoparticulele ZnO cu dimensiuni mai mari (30 nm), aplicate în concentrații de 1-5 mg/L, au exprimat un efect pozitiv evident, astfel că cantitatea de proteine obținută în aceste variante experimentale atinge valori cu 17-18% mai înalte față de cantitatea de proteine prezentată în proba martor. Nanoparticulele ZnO cu dimensiuni și mai mari (<100 nm), aplicate în concentrații de 0,5-1 mg/L, sporesc cantitatea de proteine cu 12-14% față de probele martor. Dar, concomitent cu creșterea concentrației de nanoparticule, cantitatea de proteine este în scădere cu până la 13 unități procentuale.

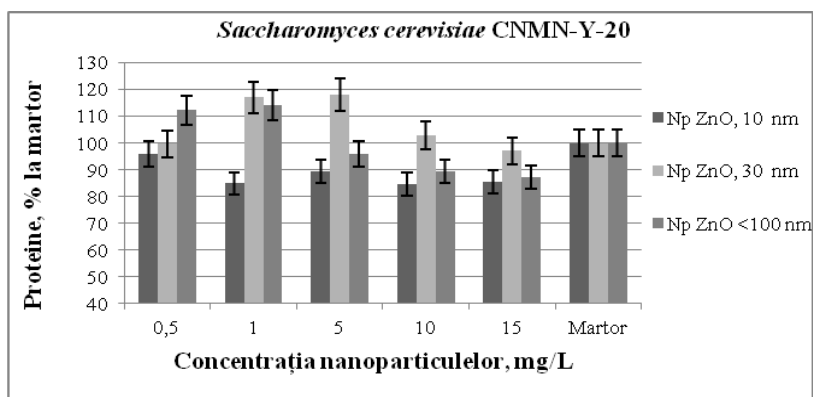


Fig.2. Valorile procentuale față de martor ale cantității de proteine în biomasa *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni.

În dependență de factorii care induc stresul oxidativ are loc sinteza unor sau altor componente antioxidante în scopul diminuării efectelor adverse, fapt ce poate fi urmărit prin determinarea activității enzimelor antioxidante în biomasa microbială. După structură, catalaza este asemănătoare cu peroxidazele, este o enzimă feroporfirinică în a cărei structură intră 4 nuclee pirolice și 1 ion de Fe^{3+} . Luând în vedere modificările produse de nanoparticule în procesele de biosinteză a proteinelor, în continuare, în biomasa levuriană s-a determinat activitatea catalazei. Catalaza, folosind peroxidul de hidrogen, oxidează toxine ca fenoli, acid formic etc., ajută la prevenirea modificărilor destructive la nivel celular [16]. Rezultatele obținute în cazul cercetării efectelor nanoparticulelor ZnO asupra levurii *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 sunt reflectate în Figura 3. Analizând datele experimentale, putem remarca că activitatea catalazei este în scădere direct proporțională cu concentrațiile nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de 10 nm. De exemplu, în probele martor activitatea catalazei constituie 32,2 U/mg proteină, iar în variantele în care concentrația nanoparticulelor este de 15 mg/L, activitatea catalazei este de 19,84 U/mg proteine, ceea ce constituie 61,4% față de martor. În cazul utilizării nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni de 30 nm, răspunsul celulei practic lipsește, astfel că nivelul activității catalazei rămâne neschimbat în toate probele experimentale. În cercetările privind aprecierea cantitativă a valorilor activității catalazei în biomasa levurii cultivată în prezența nanoparticulelor ZnO cu dimensiuni <100 nm s-a observat o sporire semnificativă a catalazei comparativ cu probele martor (Fig.3). Din concentrațiile nanoparticulelor, mai agresivă este concentrația de 10 mg/L, care activează catalaza cu 90,8% comparativ cu variantele martor. Aceste date denotă că toxinele formate în celulă sub influența nanoparticulelor contribuie la sporirea activității enzimei antioxidante în vederea anihilării efectelor toxice.

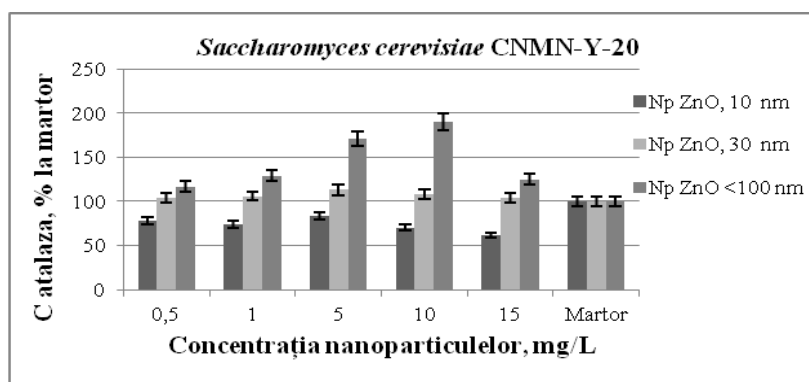


Fig.3. Valorile procentuale față de martor ale activității catalazei în biomasa *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO cu diferite dimensiuni.

Studiul privind relația dintre valorile privind cantitatea de proteine și activitatea catalazei în biomasa *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la contact cu nanoparticule ZnO cu diferite dimensiuni, a relevat o dependență de la $R^2=0,5979$ (specifică nanoparticulelor cu dimensiuni de 10 nm) la $R^2=0,2833$ (specifică nanoparticulelor cu dimensiuni <100 nm) (Fig.4). Corelația nesemnificativă dintre conținutul de proteine și activitatea catalazei poate fi o dovadă a efectelor adverse ale nanoparticulelor ZnO asupra altor componente celulare, inclusiv lipidele sau diferite macromolecule.

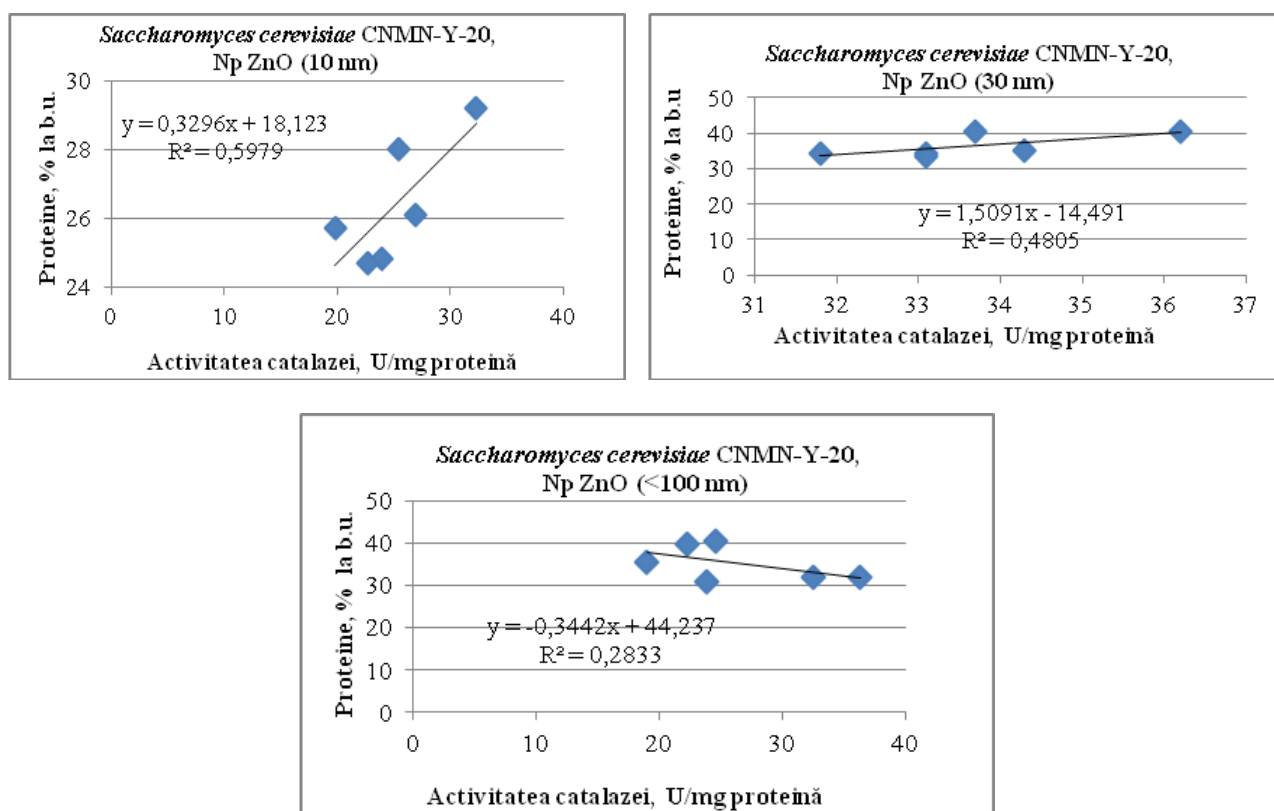


Fig.4. Relația dintre valorile privind cantitatea de proteine și activitatea catalazei în biomasa *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 la contact cu nanoparticule ZnO cu diferite dimensiuni.

Astfel, finalizând această analiză, putem presupune că nanoparticulele oxidului de zinc, pătrunzând în citoplasma celulei, intră în contact cu componentele celulare, determinând accelerarea sau întârzierea proceselor biosintetice. Rezultatele demonstrează acțiunea neunivocă a nanoparticulelor în desfășurarea proceselor de biosinteză a proteinelor în celule.

Concluzii

1. Cantitatea de proteine și activitatea enzimei antioxidante catalazei la tulpina de levuri *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la cultivare în prezența nanoparticulelor ZnO, se modifică în funcție de dimensiunile și concentrațiile utilizate.

2. Nanoparticulele cu dimensiunile de 10 nm inițiază o micșorare relativă a cantității de proteine în biomasă, valori care s-au observat la toate concentrațiile aplicate. Nanoparticulele cu dimensiuni de 30 nm au exprimat efect pozitiv numai sub influența concentrațiilor mici – de 1-5 mg/L. Rezultatele obținute la aplicarea nanoparticulelor cu dimensiuni mai mari (<100 nm) indică tendințe de sporire a cantității de proteine la levura aflată în contact cu concentrațiile de 0,5-1 mg/L, iar concentrațiile de 5-15 mg/L micșorează aceste valori.

3. Studiul privind relația dintre valorile privind cantitatea de proteine și activitatea catalazei în biomasa *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20, la contact cu nanoparticule ZnO, a relevat o dependență medie și slabă în funcție de dimensiunile nanoparticulelor.

Referințe:

1. WEISS, J., TAKHISTOV, P., Mc CLEMENTS, D.J. Functional Materials in Food Nanotechnology. In: *Journal of Food Science*, 2006, vol.71, no9, p.R107-R116. doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x Further reproduction without permission is prohibited.
2. BUZEA, C., BLANDINO, I.I., ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. In: *Biointerphases*, 2007, vol.2, issue 4, p.MR17-MR172.
3. SABELLA, S., CARNEY, R.P., BRUNETTI, V., MALVINDI, M.A., AL-JUFFALI, N., et. al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. In: *Nanoscale*, 2014, no6, p.7052-7061.
4. YA-NAN CHANG, MINGYI ZHANG, LIN XIA, JUN ZHANG AND GENGMEI XING. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. In: *Materials*, 2012, no5, p.2850-2871. doi:10.3390/ma5122850.
5. EL-DIASTY, E.M., AHMED, M.A, OKASHA, N., MANSOUR, S.F., EL-DEK, S., EL-KHALEK, H.M., YOUSSEF, M.H. Antifungal activity of Zinc Oxide Nanoparticles against dermatophytic lesions of cattle. In: *Romanian J. Biophys.*, 2013, vol.23, no3, p.191-202.
6. MARTINEZ, F.E., NEGRETE, J., TORRES, V.G. Structure and properties of Zn-Al-Cu alloy reinforced with alumina particles, In: *Mater Des.*, 2003, no24, p.281-286.
7. USATII, A., KIRITSA, E., BESHLIU, A. The effect of Fe₃O₄ nanoparticles on bioproduction parameters of *Rhodotorula gracilis* CNMN-Y-30 yeast strain with high biotechnological potential. In: *Analele Universității din Oradea*, 2016, vol.XXIII (2), p.67-71. ISSN 1224-5119
8. CHISELIȚA, O., USATÎI, A., TARAN, N., RUDIC, V., CHISELIȚA, N., ADAJUC, V. *Tulpina de drojdie Saccharomyces cerevisiae – sursă de β-glucani*. Brevet de invenție MD 4048, BOPI, 6/2010.
9. AGUILAR-USCANGA, B., FRANCOIS, J.M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. In: *Letters in Applied Microbiology*, 2003, no37, p.268-274.
10. GUTUL, T., RUSU, E., CONDUR, N., URSAKI, V., GONCEARENCO, E., VLAZAN, P. Preparation of poly(N-vinylpyrrolidone)-stabilized ZnO colloid nanoparticles. In: *Beilstein J. Nanotechnol.*, 2014, no5, p.402-406. doi:10.3762/bjnano.5.47.
11. LIU, H.-Z., WANG, Q., LIU, H.-Y., FANG, F. Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *S. cerevisiae*. In: *Biotech. and Bioprocess Engineering*, 2009, vol.14(5), p.577-583.
12. LOWRY, O., ROSEBOUGH, N., FARR, A. et. al. Protein measurement with the folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.*, 1951, vol.193, p.265-275.
13. EFREMOVA, N., USATÎI, A., MOLODOI, E. *Metodă de determinare a activității catalazei*. Brevet de invenție 4205 MD, BOPI, 2/2013, p.26.
14. ШИМАНОВ, В.Г., МУКИНОВ, Т.Х., КУЧИНСКИЙ, С.Ю., АСЛИДИНОВ, С.Д., ХАЛИКОВ, Р.Ф. *Способ определения активности каталазы в биологических объектах*. Патент 2027171, пуб. 20.01.1995.
15. ZAMAN, M., AHMAD, E., QADEER, A., RABBANI, G., KHAN, R.H. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. In: *International Journal of Nanomedicine*, 2014, no9, p.89-91.
16. HADWAN, M.H., ALMASHHEDY, L.A., ALSALMAN, A.R.S. Precise method for the assessment of catalase-like activity in seminal fluids. In: *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2013, Jan., no4(1), p.949-954. ISSN 0975-6299.

Date despre autori:

Agafia USATÎI, doctor habilitat, profesor cercetător; șef LCȘ *Biotehnologia levurilor*, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie. **E-mail:** usaty.agafia@gmail.com

Natalia CHISELIȚA, cercetător științific în LCȘ *Biotehnologia levurilor*, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie. **E-mail:** chiselita.natalia@gmail.com

Prezentat la 05.07.2018