

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕНІТОРЕЗИСТЕНТНИХ МУТАНТІВ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ТА *PHAFFIA RHODOZYMA*

Г. В. Колісник, Г. І. Нечай, М. В. Камінська, Н. І. Борецька, С. В. Гураль, Н. І. Ценко

Інститут біології тварин НААН

Виділено колекцію селеніторезистентних мутантів штамів дріжджів *S. cerevisiae* та *P. rhodozyma*. Додавання селеніту натрію (з розрахунку 1 мг Se/л) до середовища не впливає на ріст дріжджів. При підвищенні вмісту селену в середовищі до 7,5 мг/л зменшується кількість біомаси *S. cerevisiae* у 2 рази, а у *P. rhodozyma* — на 9,2 %. Аналіз вмісту селену в біомасі засвідчив, що для отриманих мутантів характерна виражена селеноакумулявальна активність. Дріжджі *P. rhodozyma* акумулюють вищі кількості селену, ніж *S. cerevisiae*. Встановлено, що добавка селеніту натрію до поживного середовища знижує вміст каротиноїдів у клітинах *P. rhodozyma*.

Ключові слова: СЕЛЕН, ДРІЖДЖІ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, *PHAFFIA RHODOZYMA*, МУТАНТИ, РЕЗИСТЕНТНІСТЬ

Одним із життєво необхідних мікроелементів для більшості організмів є селен. До недавнього часу найбільш поширеною формою, яку використовували в годівлі тварин, був селеніт натрію. Проте, упродовж останніх років у світі простежується тенденція щодо заміни токсичних селенітів на сполуки органічного походження. Селенізовані дріжджі є більш засвоюваним, а тому кращим джерелом селену не лише для людини, а й для тварин. Показано, що біодоступність селену у формі селенізованих дріжджів порівняно з селенітом (100 %) у тканинах була на рівні 135–165 %, а за активністю глутатіонпероксидази — на рівні 105–197 %, тобто селенізовані дріжджі є кращим джерелом селену для щурів, ніж селеніт [1]. Важливо, що це стосується не тільки тварин, а й людини. Показано, наприклад, що біодоступність селену у формі селенізованих дріжджів для недоношених дітей вища, ніж інших селенових компонентів [2, 3]. Однак широке використання препаратів селенізованої біомаси дріжджів гальмується відсутністю біотехнологічних розробок отримання біоселенових сполук.

Мета роботи — порівняти властивості та дослідити акумуляцію селену у біомасі селеніторезистентних штамів дріжджів *S. cerevisiae* та *P. rhodozyma*.

Матеріали і методи

У роботі використано штами «дикого» типу дріжджів *S. cerevisiae* та *P. rhodozyma* NRRL Y-10921 з колекції мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН України. Біомасу дріжджів нарощували у середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3; дріжджовий екстракт — 2; біотин — 2×10^{-6} , сахароза (20 г/л). Штами вирощували у колбах Ерленмейера на круговому шейкері (200 об./хв.) при 20 °С. Оптичну густину дріжджових культур вимірювали турбідиметрично на фотоколориметрі КФК-3. Для одержання спонтанних селеніторезистентних мутантів дріжджі вирощували упродовж трьох діб у рідкому середовищі і висівали суспензію клітин на чашки з мінімальним середовищем (10^7 кл/чашку), що містило 3–5 мМ селеніту. Чашки інкубували протягом п'яти діб при 30 °С, після чого відбирали клони, що з'явилися на чашках, як селеніторезистентні мутанти. Кількість каротиноїдів у біомасі дріжджів визначали після обробки клітин 0,1 % розчином СТАВ (цетил-триметил-амоній-бромід) [3, 4]. Визначення на фотоколориметрі КФК-3 при $\lambda=470$ нм, використовуючи калібрувальну криву.

Визначення вмісту селену у біомасі дріжджів проводили після вологого озолення на атомно-адсорбційному аналізаторі [5]. Статистичну обробку результатів, проводили, використовуючи критерій Стьюдента, за допомогою програми Microsoft Excel [6].

Результати й обговорення

Відомо, що природна мінливість, властива будь-якому виду мікроорганізмів, за окремими ознаками може бути значною, а за іншими незначною, або відсутньою. Дані літератури про природну мінливість дріжджів за ознакою резистентності до селену дуже обмежені. У зв'язку з цим нами проведено дослідження з виявлення та виділення спонтанних мутантів дріжджів *S. cerevisiae* та *P. rhodozyma* резистентних до селену. Культивуємо культуру дріжджів на селеновмісному середовищі, виявлено, що за концентрації селеніту в середовищі 5,0 і 7,5 мМ виживання клітин становило 1 % та 0,2 % відповідно. Колонії цих клітин відбирали, як селенорезистентні штами. Виділено 3 клони селенорезистентних штамів дріжджів *S. cerevisiae* та 6 клонів *P. rhodozyma*. На рис. 1 зображено результати тестування резистентності до селеніту вихідного та відібраних мутантів *P. rhodozyma*. Встановлено, що виділені мутантні штами дріжджів демонструють різну ступінь стійкості до даного

токсичного фактора. Штам дикого типу дріжджів *P. rhodozyma* NRRL Y-10921 уже не ріс при 6 мМ Na_2SeO_3 , тоді, як 5 штамів (sit 4, sit 8, sit 9, sit 11, sit 15) росли при 10 мМ Na_2SeO_3 .

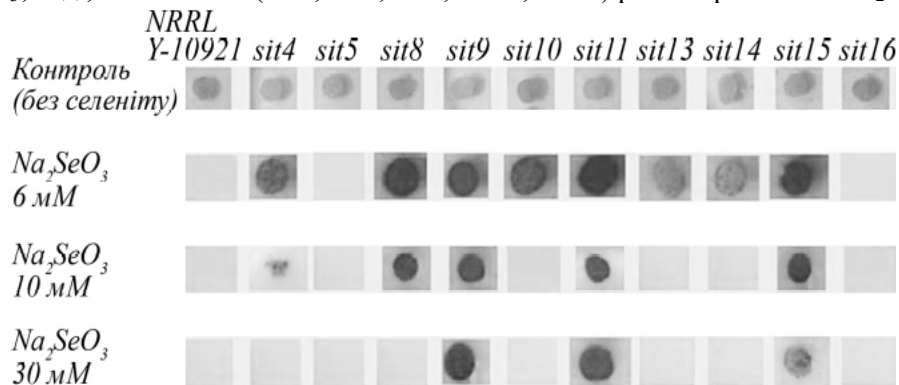


Рис. 1. Тест на резистентність до селеніту натрію клітин дикого та мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma*.

Одержані результати показують (рис. 2), що додавання селеніту натрію (з розрахунку 1 мг Se/мл) до поживного середовища суттєво не впливає на нагромадження біомаси дріжджів, проте у концентрації 7,5 мг/л цей елемент пригнічує ріст клітин дріжджів *S. cerevisiae* sit 4 та sit 5 на 47 % та 15 % відповідно, а *P. rhodozyma* sit 8 та sit 9 на 10 % та 5 % відповідно. За наявності у поживному середовищі селеніту натрію з розрахунку 10 мг Se/мл нагромадження біомаси дріжджів *S. cerevisiae* sit 4 та sit 5 зменшується на 50 % та 23 % відповідно, а *P. rhodozyma* sit 8 та sit 9 на 16 % та 7 % відповідно (рис. 2). Отже, що каротиновмісні дріжджі *P. rhodozyma* проявляють більшу стійкість до токсичної дії селеніту натрію, ніж виділені штами дріжджів *S. cerevisiae*

У наступній серії досліджень вивчено нагромадження селену у біомасі дріжджів *P. rhodozyma* та *S. cerevisiae* за умов культивування у середовищі з різною концентрацією селеніту натрію. Виявлено, що біомаса дріжджів *P. rhodozyma* нагромаджує значно вищі кількості селену, ніж *S. cerevisiae*. За концентрації селену в середовищі для культивування 5 мг/л вміст селену у клітинах *P. rhodozyma* вищий на 12,8 мкг/г, ніж у біомасі *S. cerevisiae*, а при 7,5 мг/л — на 62,3 мкг/г (табл. 1). Акумуляція селену з ростового середовища також є вищою у каротиносинтезувальних клітин. Поглинання селену з середовища при його концентрації 5 мг/л і 7,5 мг/л у *P. rhodozyma* становить 7,6 % і 12,4 %, а у *S. cerevisiae* — 1,7 % і 1,0 % відповідно. Внесення селеніту натрію у середовище пригнічує каротиногенез у клітинах *P. rhodozyma*. За концентрації селену у середовищі 1,0 мг/л вміст каротиноїдів у біомасі досліджуваних штамів дріжджів знижується на 16–20 % порівняно до контролю, а при 3,0 мг/л — на 29–31 % (табл. 2). Отже, дріжджі *P. rhodozyma* є менш чутливими до токсичної дії селеніту натрію, ніж *S. cerevisiae*. Також клітини *P. rhodozyma* акумулюють вищі кількості селену з середовища порівняно з *S. cerevisiae*, проте підвищення концентрації селеніту натрію у середовищі приводить до зниження синтезу каротиноїдів.

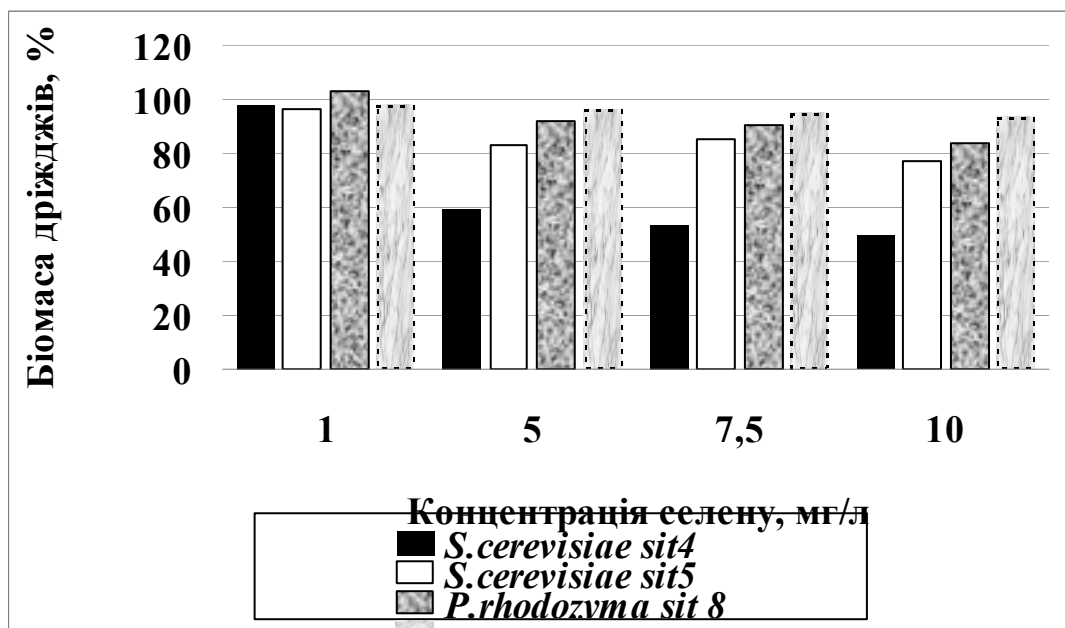


Рис. 2. Вплив селеніту натрію на ріст дріжджів *S. cerevisiae* та *P. rhodozyma*

Таблиця 1

Нагромадження селену у біомасі дріжджів *S. cerevisiae* та *P. rhodozyma*

Селен, мг/л	<i>S. cerevisiae</i> sit 5		<i>P. rhodozyma</i> sit 8	
	Концентрація селену в біомасі, мкг/г	Кількість селену, поглинутого клітинами, %	Концентрація селену в біомасі, мкг/г	Кількість селену, поглинутого клітинами, %
0	0	0	0	0
1	10,23 ± 0,51	2,7	2,05 ± 0,16	1,9
5	34,35 ± 1,72	1,7	47,14 ± 4,62	7,6
7,5	55,47 ± 2,77	1,0	117,75 ± 5,89	12,4
10	93,78 ± 4,69	1,0	170,10 ± 11,91	12,5

Вплив селеніту натрію на синтез каротиноїдів клітинами дріжджів *P. rhodozyma*

Концентрація селену в середовищі, мг/л	<i>P. rhodozyma</i> sit 8		<i>P. rhodozyma</i> sit 9	
	Біомаса, г/л	Каротиноїди, мкг/г	Біомаса, г/л	Каротиноїди, мкг/г
0	8,79	218	8,48	160
1	9,12	175	8,33	134
3	8,36	150	8,15	113
5	8,07	149	8,22	124
7,5	7,89	149	9,02	117
10	7,35	147	7,93	85

Висновки

1. Отримано групу мутантів селенорезистентних штамів дріжджів *S. cerevisiae* та *P. rhodozyma*.
2. Додавання селеніту натрію (з розрахунку 1 мг Se/л) до середовища не впливає на ріст дріжджів. При підвищенні вмісту селену в середовищі до 7,5 мг/л зменшується кількість нагромадженої біомаси *S. cerevisiae* у 2 рази, а у *P. rhodozyma* — на 9,2 %.
3. Клітини дріжджів *P. rhodozyma* акумулюють значно вищі кількості селену, ніж *S. cerevisiae*: при концентрації селену в середовищі для культивування 7,5 мг/л вміст селену у клітинах досягає відповідно 118 мкг/г і 55 мкг/г.

H. V. Kolysnyk, G. I. Nechay, M. V. Kaminska, N. I. Boretska, S. V. Gural, N.I. Tsepko
COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE SELENITORESISTANT YEAST MUTANTS
SACCHAROMYCES SEREVISIAE* AND *PHAFFIA RHODOZYMA

S u m m a r y

A new collection of selenoresistant mutants from the yeast *S. cerevisiae* and *P. rhodozyma* has been isolated. Adding sodium selenite (at the rate of 1 mg Se / L) to the nutrient medium had not affect on the growth of selected yeast strains. When the content of selenium in the medium was to 7.5 mg / L the quantities of accumulated biomass *S. cerevisiae* are reduced in 2 times, and for *P. rhodozyma* — by 9,2 %. Analysis of selenium content in the biomass showed that the obtained mutants are characterized by pronounced selenoaccumulating activity. Cells of yeast *P. rhodozyma* accumulate significantly higher amount of selenium than *S. cerevisiae*.

Г. В Колиснык, Г. И. Нечай, М. В. Каминская, Н. И. Борецкая, С. В. Гураль, Н. И. Цепко
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕНИТОРЕЗИСТЕНТНЫХ МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE* И *PHAFFIA RHODOZYMA

А н н о т а ц и я

Получено коллекцию селениторезистентных мутантов дрожжей *S. cerevisiae* и *P. rhodozyma*. Добавление селенита натрия (с расчета 1 мг Se/л) к среде не влияло на рост дрожжей. При повышении содержания селена до 7,5 мг/л накопления биомассы уменьшалось у *S. cerevisiae* в 2 раза, а у *P. rhodozyma* — на 9,2 %. Анализ содержания селена в биомассе свидетельствует о том, что полученные мутанты характеризуются селеноаккумулирующей активностью.

1. Knowles S. O. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk and casein selenium concentration in grazing cows / S. O. Knowles, N. D. Grace, K. Wurms, J. Lee // J. Dairy Sci. — 1999. — Vol. 82, No. 2. — P. 429–437.
2. Bogye G. Bioavailability of enteral yeast-selenium in preterm infants / G. Bogye, G. Alfthan, T. Machay // Biol. Trace Elem. Res. — 1998. — Vol. 65, No. 2. — P. 143–151.
3. Alamae T. Permeabilization of the methylotrophic yeast *Pichia pinus* for intracellular enzyme analysis: a quantitative study / T. Alamae, A. Jarviste // J. of Microbiological Methods. — 1995. — Vol.22. — P.193–205.
4. Крицкий М. С. Никотинамидные коферменты на ранних этапах световой индукции каротиногенеза в мицелии *Neurospora crassa* / М. С. Крицкий, Е. К. Чернишева, И. С. Соболева // Прикладная биохимия и микробиология. — 1977. — Т.13, Вып.6. — С.901–906.
5. Renard N. E. Evaluation of methods for total selenium determination in yeast / N. E. Renard // Biological Trace Element Research — 2002. — Vol. 88, No. 2. — P. 185–191.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин — М : Высшая школа, 1990. — 352 с.

Рецензент: провідний науковий співробітник лабораторії живлення овець та вовноутворення, кандидат сільськогосподарських наук, с. н. с. Гавриляк В. В.