

**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. Цепко
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 селеноаккумулявальна 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. Культивуючи 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 стійкість 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 .

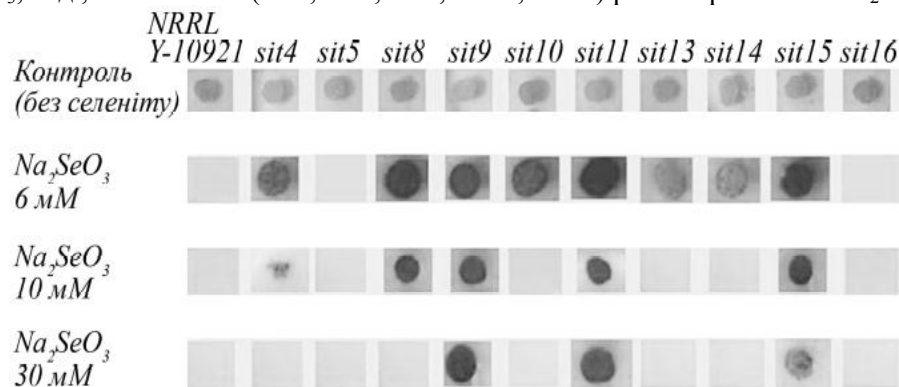


Рис. 1. Тест на резистентність до селеніту натрію клітин дикого та мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma*.

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.

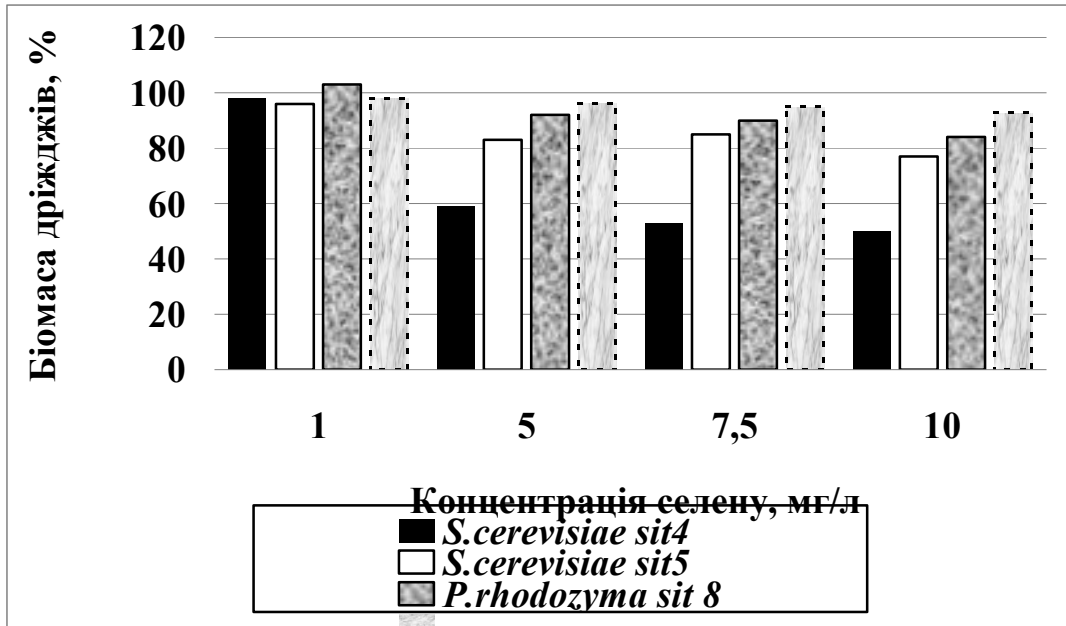


Рис. 2. Вплив селеніту натрію на ріст дріжджів *S. cerevisiae* та *P. rhodozyma*

Таблиця 1

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

Селен, мг/л	<i>S. cerevisiae sit 5</i>		<i>P. rhodozyma sit 8</i>	
	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 CEREVISIAE* AND *PHAFFIA RHODOZYMA*
 Summary

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*.

G. V. 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*
 Аннотация

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 вовнуотворення, кандидат сільськогосподарських наук, с. н. с. Гавриляк В. В.

УДК 575.1:57.088.7

ГЕТЕРОЛОГІЧНА ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА *SNORA STREPTOMYCES NOGALATER* В КЛІТИНАХ АКТИНОМІЦЕТІВ — ПРОДУЦЕНТАХ АНТРАЦИКЛІНОВИХ АНТИБІОТИКІВ

Д. О. Климишин

Інститут біології тварин НААН

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Досліджено вплив введення додаткових копій гена транскрипційного активатора структурних генів біосинтезу ногаламіцину на характер біосинтезу доксорубіцину та араціаміцину в клітинах *S. peucetius subsp. caecius* та *S. echinatus DSM40730* відповідно. Введення додаткових копій цього гена у складі кон'югаційного вектора *pKCEA* приводить до зростання рівня синтезу доксорубіцину, в той час як його експресія не впливає на синтез араціаміцину в *S. echinatus DSM40730*.

Ключові слова: *STREPTOMYCES NOGALATER*, НОГАЛАМІЦИН, ПРОТИПУХЛИННІ АНТИБІОТИКИ

Одним із найважливіших напрямів досліджень вторинного метаболізму стрептоміцетів є вивчення генетичного контролю біосинтезу ними антибіотиків [1–4]. Ці експерименти відкривають широкі можливості спрямованого пошуку та створення штамів-надпродуцентів цих сполук [4, 7]. Без знання регуляторних процесів неможливі дослідження гетерологічної експресії генів біосинтезу антибіотиків, оскільки для їхньої ефективної транскрипції та трансляції необхідними є як певні умови в клітинах штама-господаря, так і наявність регуляторів, що активують транскрипцію досліджуваних генів [1, 3, 4]. Розуміння цих процесів дозволить розробити підходи щодо конструювання штамів із високим рівнем біосинтезу антибіотиків за рахунок маніпуляцій з окремими регуляторними генами.

Streptomyces nogalater IMET43360 є продуцентом протипухлинного антибіотика ногаламіцину, що належить до групи антрациклінових полікетидів. Він складається з полікетидного аглікону, глікозильованого цукровими залишками ногалози та ногаламіну. Ногаламіцин є активним щодо грам-позитивних бактерій, а також низки пухлинних ліній [5]. Окремі гени біосинтезу цього антибіотика ефективно використовуються у комбінаторному біосинтезі полікетидів [6, 7]. У хромосомі *S. nogalater* ідентифіковано ген *snorA* [7, 8]. Функція цього гена попередньо встановлена нами на основі результатів аналізу амінокислотної послідовності його продукту та спрямованої інактивації у хромосомі