

УДК 546.23:579.253

**ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА
СЕЛЕНІТОРЕЗИСТЕНТНИХ МУТАНТІВ ДРІЖДЖІВ
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Г. В. Колісник, Г. І. Нечай, М. В. Камінська, Н. І. Борецька, С. В. Гураль, Н. І. Ценко
Інститут біології тварин НААН

*Отримано колекцію селеніторезистентних мутантів дріжджів *S. cerevisiae* та досліджено їх ріст і нагромадження селену у біомасі. Селекціоновані штами росли при вмісті селену у середовищі 1–10 мг/л та акумулювали його у клітинах у концентрації 10–99 мкг/г сухої біомаси. Додавання селеніту натрію (з розрахунку 1–5 мг Se/л) до поживного середовища не впливало на ріст дріжджів, а при підвищенні вмісту селену в середовищі до 7,5 мг/л кількість нагромадженої біомаси зменшувалася. У селеніторезистентних штамів дріжджів під час росту за наявності селеніту у середовищі змінювався колір колоній — від білого до червоного різної інтенсивності. Аналіз вмісту селену в біомасі засвідчив, що для отриманих мутантів характерна виражена селеноакумулювальна активність.*

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

Селен є життєво необхідним мікроелементом для більшості живих організмів. Головним джерелом селену для людини і тварин є рослини, які засвоюють цей елемент з ґрунту відповідно до його концентрації, доступності та виду рослин. Загальний вміст селену у ґрунтах коливається надзвичайно широко — від 0,000005 до 1,2 г/кг [1]. Такий широкий діапазон веде до негативних наслідків для організмів, які перебувають у районах крайніх концентрацій. У багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні фіксується дефіцит селену, необхідного для нормальної життєдіяльності людини і тварин [2, 3]. Для оптимізації рівня селену у раціоні застосовують препарати селену, до складу яких входить селеніт натрію. Селенізовані дріжджі є більш засвоюваним, а тому кращим джерелом селену ніж неорганічні сполуки селену не лише для людини, а й для тварин [4]. Однак, широке використання препаратів селенізованої біомаси дріжджів гальмуване відсутністю біотехнологічних розробок отримання біоселенових сполук. Дріжджі, які можуть нагромаджувати органічні сполуки селену, можна було б застосовувати як продуценти біоселенових препаратів.

Метою роботи було виділити селеніторезистентні штами дріжджів *S. cerevisiae* та дослідити акумуляцію селену в їх біомасі.

Матеріали і методи

У роботі використали штам «дикого» типу дріжджів *S. cerevisiae* з колекції мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН України. Біомасу дріжджів вирощували 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} . Як джерело вуглецю вносили сахарозу (20 г/л). Тверде середовище одержували шляхом додавання агару (20 г/л) до синтетичного середовища. Штами вирощували у колбах Ерленмейера на круговому шейкері (200 об./хв) при 30 °С. Оптичну густину дріжджових культур вимірювали на фотоелектроколориметрі КФК-2МП. Із використанням калібрувальної кривої визначали їхню суху біомасу. Для одержання селеніторезистентних мутантів культуру дріжджів вирощували упродовж трьох діб у рідкому середовищі і висівали суспензію клітин на чашки з мінімальним середовищем (10^7 кл/чашку), що містило 5 мМ селеніту. Чашки інкубували протягом

п'яти діб при 30 °С, після чого вибирали клони, що з'явилися на чашках, як селеніторезистентні мутанти. Як мутагенний фактор використовували ультрафіолетове проміння (УФП). Культуру дріжджів з експоненційної фази росту опромінювали бактерицидною лампою БУФ-30П на відстані 20 см протягом 5, 10, 15 і 20 хв, перемішуючи суспензію за допомогою магнітної мішалки. Після опромінення клітини висівали на чашки Петрі з агаризованим середовищем і культивували протягом чотирьох діб при температурі 30 °С. Визначення вмісту селену у біомасі дріжджів проводили після вологого озолення на атомно-адсорбційному аналізаторі [5]. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel [6].

Результати й обговорення

Відомо, що природна мінливість властива будь-якому виду мікроорганізмів і за окремими ознаками може бути значною, а за іншими незначною, або відсутньою. Дані літератури про природну мінливість дріжджів *S. cerevisiae* за ознакою резистентності до селеніту дуже обмежені. У зв'язку з цим проведено дослідження з виявлення та виділення спонтанних мутантів дріжджів *S. cerevisiae* резистентних до селену. При вмісті селеніту у середовищі 1–5 мг/л дріжджі на чашках з агаризованим середовищем росли суцільним газоном. 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. Культивуючи культуру дріжджів на селенітовмісному середовищі, було виділено три клони селеніторезистентних штамів дріжджів *S. cerevisiae*.

Одним з ефективних і поширених методів отримання високопродуктивних штамів мікроорганізмів з корисними для виробництва якостями є селекція мутантних штамів при дії різних мутагенних факторів фізичної та хімічної природи на вихідні форми. У наступній серії досліджень вивчали вплив ультрафіолетового проміння (УФП), як мутагенного фактора фізичної природи, на життєздатність клітин дріжджів та їх мінливість за досліджуваною ознакою. Показано, що при опроміненні УФП культури дріжджів протягом двох хв виживає 15 % клітин. Збільшення часу опромінення до 5 хв приводить до зменшення кількості життєздатних клітин (табл. 1). При проведенні селекційних робіт за дії УФП проглянуто 265 колоній і виділено 7 клонів селенорезистентних штамів дріжджів. У селеніторезистентних мутантів під час росту за наявності селеніту змінювався колір колоній — від білого до червоного різної інтенсивності, що, можливо, пов'язане з індукцією у клітин специфічної системи захисту від дії токсичного селеніту та утворення в результаті відновної детоксикації селеніту у клітинах цих дріжджів червоної форми Se⁰.

Таблиця 1

Дія ультрафіолетових променів на клітини дріжджів *S. cerevisiae*

Доза УФП (хв)	Виживання клітин, %	Кількість відібраних мутантів
2	15	1
5	2	4
10	2	2

Аналіз нагромадження біомаси *S. cerevisiae* на середовищах з різною концентрацією селеніту натрію засвідчує (рис. 1), що додавання селеніту натрію (з розрахунку 1 мг Se/мл) до поживного середовища суттєво не впливає на ріст досліджуваних штамів дріжджів. При підвищенні вмісту селену в середовищі до 5 мг/л знижується інтенсивність росту клітин дріжджів та зменшується кількість нагромадженої біомаси штаму *S. cerevisiae* sit 4 на 41 %, а *S. cerevisiae* sit 5- на 15 %. Отже, отримані мутантні штами дріжджів демонструють різну ступінь стійкості до

даного токсичного фактора і за концентрації селену 10 мг/л середовища біомаса *S. cerevisiae* sit 4 зменшується на 50 %, а у *S. cerevisiae* sit 5 — лише на 23 %.

Відомо, що селенізовані дріжджі є більш засвоюваним, а тому кращим джерелом селену, ніж мінеральні сполуки цього елементу як для тварин, так і для людини. 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, ніж селеніт [7].

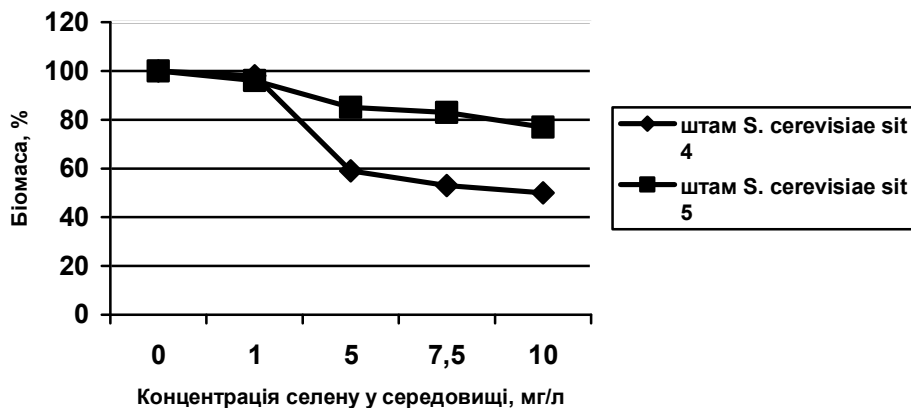


Рис. 1. Вплив селеніту натрію на ріст дріжджів *S. cerevisiae*

Результати досліджень нагромадження селену у біомасі селеніторезистентного штаму дріжджів *S. cerevisiae* sit 5 за різних концентрацій селеніту натрію у середовищі представлено у таблиці 2.

Таблиця 2

Акумуляція селену у біомасі дріжджів *S. cerevisiae* sit 5

Концентрація селену в середовищі, мг/л	Концентрація селену в біомасі, мкг/г	Кількість селену, поглинутого клітинами, %
0	0	0
1,0	10,23 ± 0,51	2,7
5,0	34,35 ± 1,72	1,7
7,5	55,47 ± 2,77	1,0
10,0	93,78 ± 4,69	1,0

Виявлено, що нагромадження селену у біомасі дріжджів *S. cerevisiae* sit 5 зростає при збільшенні концентрації селену у середовищі, проте акумуляція селену є найвищою (2,7 %) при 1 мг/л. При підвищенні концентрації селену у середовищі кількість цього елемента, поглинутого клітинами, зменшується, також знижується приріст біомаси (рис. 1), яка набуває червоного забарвлення, що може свідчити про утворення елементарного селену (Se^0). Отже, для згодовування тваринам слід використовувати біомасу дріжджів *S. cerevisiae* sit 5, вирощену у середовищі з 1 мг селену/л.

Висновки

1. Виділено колекцію штамів дріжджів *S. cerevisiae* з вираженою селеноаккумуляційною активністю. При вирощуванні дріжджів *S. cerevisiae* sit 5

у середовищі з селеном у концентрації 1,0 мг/л або 7,5 мг/л вміст цього елемента у клітинах досягає відповідно $10,23 \pm 0,51$ мкг/г і $55,47 \pm 2,77$ мкг/г.

2. Додавання селеніту натрію (з розрахунку 1–5 мг Se/л) до поживного середовища не впливає на ріст досліджуваних штамів дріжджів. При підвищенні вмісту селену в середовищі до 10 мг/л кількість нагромадженої біомаси зменшується у *S. cerevisiae* sit 5 на 23 %, а у *S. cerevisiae* sit 4 — на 50 %.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно продовжити дослідження з впливу згодовування селенізованої біомаси селекціонованого штаму дріжджів тваринам на активність системи антиоксидантного захисту за умов розвитку оксидативного стресу.

H. V. Kolisnyk, H. I. Nechay, M. V. Kaminska, N. I. Boretska, S. V. Hural, N. I. Tsepko

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF SELENITE- RESISTANT MUTANTS OF THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

S u m m a r y

The collection of selenite resistant mutants of yeast *Saccharomyces cerevisiae* was obtained and their growth and selenium accumulation at the biomass was established. The selectioned strains grew at the mediums selenium concentration 1–10 mg/l and accumulated of selenium into cells 10–99 μ g/g dry mass. The addition of sodium selenite (1–5 mg Se/l) to cultural medium didn't effect on the yeast growth. The biomass amount decreased at the increase of mediums selenium concentration to 7,5 mg/l. The selenite-resistans yeasts strains colonies were colouring from white to red at the growth in the selenite containing medium. The mutants' selenium accumulating activity was shown by the analysis of selenium contain in biomass.

Г. В Колиснык, Г. И. Нечай, М. В. Каминская, Н. И. Борецкая, С. В. Гураль, Н. И. Цепко

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕНИТОРЕЗИСТЕНТНЫХ МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

А н н о т а ц и я

Получено коллекцию селениторезистентных мутантов дрожжей *S. cerevisiae*, исследовано их рост и накопление селена в биомассе. Селекционированные штаммы росли на среде с содержанием селена 1–10 мг/л и аккумулировали его в клетках в концентрациях 10–99 мкг/г сухой биомассы. Добавление селенита натрия (с расчета 1–5 мг Se/л) к питательной среде не влияло на рост дрожжей, однако, при повышении содержания селена в среде до 7,5 мг/л количество накопления биомассы уменьшалось. В селениторезистентных штаммов дрожжей во время роста при наличии селенита в среде менялся цвет колоний — от белого к красному разной интенсивности. Анализ содержания селена в биомассе свидетельствует о том, что полученные мутанты характеризуются селеноаккумулирующей активностью.

1. Воробець Н. М. Селен в рослинах та ґрунті, його вплив на метаболізм рослин / Н. М. Воробець // Наук. Вісник Ужгород. ун-ту — 2008. — Випуск 24. — С. 144–148.
2. Снітинський В. В. Біохімічна роль селену / В. В. Снітинський, Г. Л. Антонюк // Укр.біохім.журн. — 1994. — Т. 66, № 5. — С.3–16.
3. Köhrl J. Selenium in biology: facts and medical perspectives / J. Köhrl, R. Brigelius-Flohe, et al // Biol. Chem. — 2000. — Vol. 381, No. 9–10. — P. 849–864.
4. Ortman K. Selenite and selenium yeast as feed supplements for dairy cows / K. Ortman, B. Pehrson // J. Vet. Med. A. — 1997. — Vol. 44, No.6. — P. 373–380.

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.
7. Ortman K. Effect of selenate as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast / K. Ortman, B. Pehrson // J. Anim. Sci. — 1999. — Vol.77, No. 12. — P. 3365–3370.

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

УДК: 665.336.3:616-006.441

ОЧИСТКА САПОГЕНИНУ ІЗ ОЛІЇ НАСІННЯ ВОВЧНИКА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЙОГО ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ЛІМФОМІ NK/LY

М. М. Луцик¹, А. М. Яценко¹, І. В. Кичун², М. Д. Луцик³, Р. С. Стойка³

¹Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького,

²Інститут біології тварин НААН,

³Інститут біології клітини НАН України

Описано метод очистки сапогеніну із насінневої олії вовчника (*Daphne mezereum* L.). Отримано чотири фракції, з найбільшим виходом фракції F4. Речовина представляє собою в'язку олію, розчинну в етанолі, оцтовій кислоті, пропіленгліколі, дає позитивну реакцію Лібермана-Бурхарда на стероїди, володіє гемолітичною активністю. Вуглеводів і фосфору у складі препарату не виявлено. У мас-спектрі наявний один основний пік, молекулярна маса якого 483,1 Da. Речовина високо токсична, при внутрішньочеревному введенні мишам LD₁₀₀ становить 6 мг/кг. При внутрішньочеревному введенні субтоксичних доз сапогеніну мишам з привитою асцитною лімфою NK/LY виявлено цитотоксичний вплив препарату на пухлинні клітини і пригнічення їх проліферації. Терапевтичний ефект сапогеніну в умовах *in vivo*, однак, не спостерігався, що зумовлено його побічною токсичною дією з переважним ураженням органів шлунково-кишкового тракту.

Ключові слова: САПОГЕНІН, ВОВЧНИК (*Daphne mezereum* L.), ЛІМФОМА NK/LY.

Рослина вовче лико або вовчник, ботанічна назва *Daphne mezereum* L. (родина Thymelaeaceae) [1], застосовується у народній медицині при різних захворюваннях, у тому числі при онкологічних [2, 3]. У традиційній медицині Сходу (Китай, Корея, Японія) при онкологічних захворюваннях, зокрема при раку молочної залози, застосовують препарат генкванін (genkwanin), отримуваний із рослин виду *Daphne genkwa* (Sieb. et Zucc.) [4, 5], однак цей вид вовчника в Україні не зустрічається.

Фітохімічне дослідження вовчника описано в роботі [6], авторами було виявлено біля 15 речовин фенольної природи: оксикумаринів, флавоноїдів, катехинів. Отримано та ідентифіковано дафнін, дафнозид, дафнетин, дафноретин, умбелліферон, мезереїнова смола із вираженою подразнюючою дією. Всі частини рослини містять високо токсичні речовини, тому у народній медицині препарати з різних частин цієї рослини застосовуються переважно зовнішньо і місцево, а при внутрішньому вживанні настоїв приймають їх дуже обережно і під контролем лікаря [3].

Ґрунтовне дослідження протипухлинної активності речовин із насіння вовчника проведено Kurchan M. S., Baxter R. L. [7]. В якості активної речовини автори