

ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕНІТОРЕЗИСТЕНТНИХ МУТАНТІВ ДРІЖДЖІВ *RHAFIA RHODOZYMA*

Г. І. Нечай, М. В. Камінська, Н. І. Борецька, С. В. Гураль, О. М. Стефанишин

Інститут біології тварин НААН

Отримано колекцію селеніторезистентних штамів дріжджів *P. rhodozyma* та досліджено їх ріст і нагромадження селену у біомасі. Селекціоновані штами росли при вмісті селену у середовищі 1-10 мг/л та акумулювали його в клітинах у кількості до 170 ± 12 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 10,0 мг/л кількість нагромащеної біомаси зменшувалася. Показано, що досліджувані штами дріжджів здатні засвоювати селеніт натрію та відновлювати Se(VI) до елементарного селену з утворенням окремих позаклітинних частинок селену. Поява частинок елементарного селену залежала від концентрації селеніту натрію в ростовому середовищі. Встановлено, що при зростанні концентрації селену у середовищі синтез каротиноїдів клітинами дріжджів *P. rhodozyma* знижується.

Ключові слова: ДРІЖДЖІ *P. RHODOZYMA*, СЕЛЕН, РЕЗИСТЕНТНІСТЬ, КАРОТИНОЇДИ

Одним із життєво необхідних мікроелементів для більшості живих організмів є селен. 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 – потерпання від недостачі селену, як мікроелементу або від його надмірної кількості. У багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні, фіксується дефіцит селену, необхідного для нормальної життєдіяльності людини і тварин [2]. Дефіцит селену в продуктах харчування та кормі для тварин призводить до появи у них низки захворювань [3]. Для оптимізації рівня селену у раціоні застосовують препарати селену, зокрема, «Неоселен», до складу якого 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 гальмується недостатнім рівнем знань про метаболізм селену та відсутністю біотехнологічних розробок отримання біоселенових сполук. Отримані мутанти дріжджів, які можуть нагромаджувати органічні сполуки селену, можна було б застосувати як продуценти біоселенових препаратів.

Метою роботи було виділити селеніторезистентні штами дріжджів *P. rhodozyma* та дослідити акумуляцію селену у їх біомасі.

Матеріали і методи

У роботі використано штама «дикого» типу дріжджів *P. rhodozyma* NRRL Y-10921 з колекції мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН. Біомасу дріжджів нарощували у середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; дріжджовий екстракт — 2; біотин — 1×10^{-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 20 °С. Оптичну густину дріжджових культур вимірювали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-2МП. Із використанням калібрувальної кривої визначали їхню суху біомасу. Для одержання спонтанних 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 3-5 мМ селеніту. Чашки інкубували протягом п'яти діб при 22 °С, після чого відбирали клони, що з'явилися на чашках, як селеніторезистентні мутанти. Як мутагенний фактор у селекції дріжджів 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 4 діб при температурі 22 °С. Визначення вмісту селену у біомасі дріжджів проводили після її мінералізації за використання пергідролу в кислому середовищі на атомно-адсорбційному аналізаторі [5]. Нагромадження елементарного селену, який утворювався під час редукції селеніту клітинами, досліджували за допомогою растрового електронного мікроскопа-мікроаналізатора РЕММА-102-02 в Науково-технічному і навчальному центрі низькотемпературних досліджень Львівського національного університету ім. І. Франка. Статистичну обробку результатів, проводили, використовуючи критерій Стюдента, 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 *P. rhodozyma*, за ознакою резистентності до селеніту дуже обмежені. У зв'язку з цим нами проведено дослідження з виявлення та виділення спонтанних мутантів дріжджів *P. rhodozyma* резистентних до селену. При вмісті селену у середовищі 0, 0,5, 1,0, 2,5 мМ дріжджі на чашках з агаризованим середовищем росли суцільним газоном. Забарвлення клітин змінювалося від світло-рожевого на середовищі без селеніту натрію до інтенсивного червоного кольору на селенітному середовищі. За концентрації селеніту в середовищі 5,0 і 7,5 мМ виживання клітин становило 1 % та 0,2 % відповідно. Колонії цих клітин відбирали, як селеніторезистентні штами.

Встановлено, що виділені мутантні штами дріжджів *P. rhodozyma* 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 (*sit4*, *sit8*, *sit9*, *sit11*, *sit15*) росли при 10 мМ Na_2SeO_3 . Навіть при п'ятиразовому підвищенні концентрації Na_2SeO_3 (30 мМ) в агаризованому середовищі залишались штами *sit9*, *sit11*, *sit15*, ріст яких зберігався, причому перші два з них виявилися найрезистентнішими до селеніту.

Аналіз нагромадження біомаси дріжджів *P. rhodozyma* на середовищах з різною концентрацією селеніту натрію засвідчує (табл. 1), що додавання селеніту натрію (з розрахунку до 5 мг Se/л) до поживного середовища суттєво не впливає на ріст досліджуваних штамів дріжджів. При підвищенні вмісту селену в середовищі до 10 мг/л знижується інтенсивність росту клітин дріжджів та зменшується кількість нагромадженої біомаси штаму *P. rhodozyma sit8* на 16 %, а *P. rhodozyma sit9* — на 6 %.

Отже, отримані мутантні штами дріжджів демонструють різну ступінь стійкості до даного токсичного фактора. Внесення селеніту натрію у середовище пригнічує каротиногенез у клітинах *P. rhodozyma*. При концентрації селену у середовищі 1,0 мг/л вміст каротиноїдів у біомасі досліджуваних штамів дріжджів знижується на 16–20 % порівняно з контролем, а при 3,0 мг/л — на 29–31 %.

Вплив селеніту натрію на ріст та синтез каротиноїдів клітинами дріжджів *P. Rhodozyma*

Концентрація селену в середовищі, мг/л	<i>P. rhodozyma sit 8</i>		<i>P. rhodozyma sit 9</i>	
	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

Відомо, що селенізовані дріжджі є більш засвоюваним, а тому кращим джерелом селену, ніж мінеральні сполуки цього елемента 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]. Результати досліджень нагромадження селену у біомасі селеніторезистентного штаму дріжджів *P. rhodozyma sit8* за різних концентрацій селеніту натрію у середовищі представлено у таблиці 2.

Таблиця 2.

Акумуляція селену у біомасі дріжджів *P. rhodozyma sit 8*

Концентрація селену в середовищі, мг/л	Біомаса дріжджів, г/л	Концентрація селену в біомасі, мкг/г	Кількість селену, поглинутого клітинами, %
<i>P. rhodozyma sit 8</i>			
0	8,7 ± 0,07	0	0
1,0	9,1 ± 0,13	2,05 ± 0,16	1,9
5,0	8,1 ± 0,11	47,14 ± 4,62	7,6
7,5	7,9 ± 0,64	117,75 ± 5,89	12,5
10,0	7,35 ± 0,03	170,10 ± 11,91	12,5

Виявлено, що нагромадження селену у біомасі дріжджів *P. rhodozyma sit8* зростає при збільшенні концентрації селену у середовищі. Акумуляція селену в клітинах дріжджів досягає максимуму при 7,5 мг/л селену у поживному середовищі і при подальшому підвищенні концентрації цього елемента до 10 мг/л уже не змінюється. При підвищенні концентрації селену у середовищі біомаса дріжджів набуває червоного забарвлення, що може свідчити про утворення елементарного селену (Se⁰). Для з'ясування цього припущення нами було досліджено засвоєння селеніту натрію трьома штамами дріжджів *P. rhodozyma* — штамом «дикого» типу NRRL Y-10921 та двома штамами із підвищеною резистентністю до селеніту натрію — *sit8* та *sit11* за допомогою скануючого електронного мікроскопу та рентгенівського мікроаналізатора. Встановлено, що усі штами здатні засвоювати селеніт натрію та відновлювати Se(VI) до елементарного селену з утворенням окремих позаклітинних частинок селену. Поява частинок селену залежала від концентрації солі в ростовому середовищі, так за концентрації 10 мг/л їх появи не спостерігалось, за концентрації 100 мг/л з'явилися частинки асоційовані з поверхнями клітин лише у штаму

sit11, а за концентрації селеніту натрію 200 мг/л в усіх трьох штаммах спостерігалось утворення селенових гранул.

Висновки

Отже, для збагачення дріжджової біомаси органічним селеном, важливе значення має концентрація селеніту натрію у живильному середовищі, яка впливає на включення неорганічного селену в дріжджові білки. Отримані результати засвідчують, що для культивування досліджуваних штамів дріжджів з метою отримання біомаси збагаченої селеном, можна використовувати селеніт натрію в концентрації до 100 мг/л. Оскільки наявність селеніту в середовищі у кількості 5 мг/л знижує синтез каротиноїдів, то для отримання селеновмісної біомаси дріжджів з високим вмістом каротиноїдів слід використовувати поживне середовище з низьким вмістом селеніту натрію.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати будуть використані для отримання селенізованої біомаси дріжджів з високим вмістом каротиноїдів, як продуценти біоселенових препаратів.

H. I. Nechay, M. V. Kaminska, N. I. Boretska, S. V. Hural, O. M. Stefanyshyn

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SELENITE-RESISTANT MUTANTS OF THE YEAST *PHAFFIA RHODOZYMA*

S u m m a r y

The collection of selenite-resistant mutants of yeast *P. rhodozyma* was obtained and their growth and selenium accumulation at the biomass were established. The selected mutants grew in a medium supplemented with 1-10 mg/l of selenium and accumulated it into the cells in the quantity $170 \pm 12 \mu\text{g/g}$ of dry weight. The addition of sodium selenite (1–5 mg Se/l) into cultural medium didn't effect on the yeast growth, but when its concentration in the medium increased to 10 mg/l the amount of biomass decreased. It was shown that all of the strains are able to assimilate sodium selenite and reduce Se(VI) to elemental selenium with formation of individual extracellular selenium particles. The appearance of elemental selenium particles depended on concentration of sodium selenite in growth medium. It was discovered that increasing of concentration of selenium in medium the carotenoids synthesis by cells of the *P. rhodozyma* yeast decreased.

Г. И. Нечай, М. В. Каминская, Н. И. Борецкая, С. В. Гураль, О. М. Стефаньшин

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СЕЛЕНИТОРЕЗИСТЕНТНЫХ МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ *PHAFFIA RHODOZYMA*

А н н о т а ц и я

Получено коллекцию селениторезистентных мутантов дрожжей *P. rhodozyma* и 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 количестве до $170 \pm 12 \text{ мкг/г}$ 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 10,0 мг/л количество накопления биомассы уменьшалось. Показано, что исследуемые штаммы дрожжей способны усваивать селенит натрия и восстанавливать Se(VI) к элементарному селену с образованием отдельных внеклеточных частиц селена. Появление

частиц элементарного селена зависела от концентрации селенита натрия в питательной среде. Установлено, что при возрастании концентрации селенита натрия в среде синтез каротиноидов клетками дрожжей *P. rhodozyma* снижается.

1. *Воробець Н. М.* Селен в рослинах та ґрунті, його вплив на метаболізм рослин / Н. М. Воробець // Наук. Вісник Ужгород. ун-ту. — 2008. — Вип. 24. — С. 144–148.
2. *Снітинський В. В.* Біохімічна роль селену / В. В. Снітинський, Г. Л. Антоняк // 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, A. Böck, R. Gärtner, O. Mejer, L. Flohe // Biol. Chem. — 2000. — Vol. 381, № 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, № 6. — P. 373–380.
5. *Renard N. E.* Evaluation of methods for total selenium determination in yeast / N. E. Renard // Biol. Trace Element Research — 2002. — Vol. 88, № 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, № 12. — P. 3365–3370.

Рецензент: старший науковий співробітник лабораторії біохімії адаптації та онтогенезу тварин, кандидат біологічних наук, Бучко О. М.