

Marek Kieliszek^{1,2}, Stanisław Błażejczak¹, Renata Jędrzejczak³

WIĄZANIE SELENU PRZEZ DROŹDŻE PASZOWE *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950

¹ Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Katedry Biotechnologii,
Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Kierownik: dr hab. S. Błażejczak, prof. SGGW

² Zakład Mikrobiologii

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie

Kierownik: dr A. Misiewicz

³ Zakład Analizy Żywności

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie

Kierownik: dr hab. R. Jędrzejczak, prof. IBPRS

*W pracy zbadano zdolność wiązania selenu przez biomasę komórkową drożdży *Candida utilis* ATCC 9950. Hodowle drożdży prowadzono w podłożu YPD wzbogaconym w sole selenu Na_2SeO_3 . Zawartość selenu oznaczano metodą ZETAAS. Stwierdzono, że rosnące stężenia selenu w podłożach doświadczalnych, powodowały zwiększenie zawartości tego pierwiastka w biomacie komórkowej. Najwięcej selenu trwale związanego z biomasą komórkową ($2900 \mu\text{g Se}^{4+}/\text{g s.s.}$) otrzymano po 48-godzinnej hodowli z dodatkiem soli tego pierwiastka w dawce $80 \text{ mg Se}^{4+}/\text{dm}^3$. W miarę przedłużania czasu hodowli doświadczalnych liczba komórek drożdży oraz plon biomasy wykazywały tendencję spadkową.*

Hasła kluczowe: selen, *Candida utilis*, wiązanie selenu

Key words: selenium, *Candida utilis*, binding selenium ions

Badania sposobu żywienia i stanu odżywienia zwierząt jak również różnych grup ludności w Polsce i innych krajach wskazują na występowanie niedoborów makro- i mikropierwiastków, m.in. selenu. Ogromną zaletą wzbogacania biomasy komórkowej drożdży w składniki mineralne jest ich wysoka przyswajalność z przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. Selen jest podstawowym pierwiastkiem, którego śladowe ilości są niezbędne do życia, jednak różnica między ilością niezbędną a szkodliwą do prawidłowego wzrostu jest bardzo mała (1, 2). Toksyczne działanie selenu waha się w zakresie od 400 do 700 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ (3, 4). Selen należy do grona pierwiastków, które decydują o prawidłowym funkcjonowaniu organizmu; ma właściwości przeciwutleniające, chroni organizm przed działaniem wolnych rodników i czynników rakotwórczych (4, 9, 10).

Selen bierze udział w metabolizmie nadtlenku wodoru i wodoronadtlenków lipidowych. Stanowi integralną część niektórych enzymów w tym: peroksydazy glutationowej (GPx), reduktazy tioredoksyny (TR), dejodynazy jodotyrozyny, które

chronią komórki przed szkodliwym działaniem wolnych rodników powstających podczas procesów utleniania. Odgrywa on w tych procesach rolę podobną do tokoferoli (witaminy E) (5, 6, 7, 8).

Bioprzyzwajalność selenu zależy od formy występowania i składu pożywienia. Najłatwiej pobierane są seleniany (IV) i (VI), selenometionina, selenocysteina oraz aminowe związki selenu. Drożdże selenowe są skutecznym, bezpiecznym i naturalnym źródłem selenu oraz stanowią najlepiej przyswajalną formę tego pierwiastka, którego wchłanianie dodatkowo wzmagane jest witaminami obecnymi w biomase drożdży (głównie B, E). W reakcjach biosyntezy selen zastępuje siarkę i jest włączany w struktury białek drożdży w postaci selenometioniny oraz selenocysteiny (11, 13).

Dążenie do wzbogacenia drożdży w selen jest następstwem tworzenia się dużych ilości L-selenometioniny. Głównym składnikiem we frakcji białkowej zawierającej selen jest wysoko przyswajalna selenometionina (74,8 %), a następnie selenocysteina (9,9 %), seleniny (5,1 %), a 10,2 % stanowią różne bliżej nieokreślone związki selenu (12).

Narastające zjawisko niedoboru selenu u ludzi i zwierząt zwróciło uwagę na drożdże, których biomasa komórkową można wzbogacić w selen w takim stopniu, by stała się naturalnym nośnikiem tego pierwiastka.

Celem niniejszych badań było określenie zdolności wiązania selenu przez biomasa komórkową drożdży. Oceniono również zmiany plonu biomasy oraz liczbę komórek drożdży podczas hodowli suplementowanych selenem.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem biologicznym zastosowanym w pracy był szczep drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 pochodzący z kolekcji czystych kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW. Inokulum drożdży przygotowano szczepiąc ze skosu płynne podłoże YPD. Hodowlę prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 28°C na wyrząsarce posuwisto-zwrotnej przy amplitudzie 200 cykli/min. Uzyskane inokulum stanowiło materiał wyjściowy do zaszczepienia podłoża kontrolnych oraz doświadczalnych 10% (v/v). Jako podłoża doświadczalne zastosowano płynną pożywkę YPD o składzie g/L: glukoza 20; pepton 20; ekstrakt drożdżowy 10 i pH 4.5 – 5.0, wzbogacone w sole selenu (Na_2SeO_3). Wodne roztwory soli dodawano do sterylnych podłoży w takich ilościach aby zawartość selenu wynosiła 80 i 100 mg $\text{Se}^{4+}/\text{dm}^3$. Jako podłoże kontrolne stosowano płynną pożywkę YPD. Hodowlę drożdży w podłożach doświadczalnych prowadzono w temperaturze 28°C przez 48 godzin na wyrząsarce posuwisto-zwrotnej o amplitudzie 200 cykli/min. W trakcie doświadczenia kontrolowano plon biomasy, liczbę komórek drożdży oraz zawartość selenu w biomase komórkowej. Oznaczenia przeprowadzono w czasie 0, 24 i 48 godzinie hodowli. Liczbę komórek drożdży oznaczono metodą płytkową na podłożu YPD z 2% agarem. Plon biomasy komórkowej oznaczono po odwirowaniu drożdży przy 4000 rpm przez 10 minut. Supernatant odrzucano natomiast odwirowaną biomasa suszono w temperaturze 80°C do uzyskania stałej masy. Oznaczenie selenu w biomase komórkowej drożdży

przeplukanej dwukrotnie w wodzie dejonizowanej przeprowadzono posługując się metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej z atomizacją elektrotermiczną (ZETAAS). Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statgraphics, stosując test *Tukey'a* dla poziomu istotności $\alpha=0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wprowadzone jony SeO_3^{-2} do podłoża doświadczalnych w postaci soli Na_2SeO_3 niezależnie od zastosowanej dawki, spowodowały istotny wzrost zawartości tego pierwiastka w biomase komórkowej drożdży w porównaniu z drożdżami pochodzącymi z hodowli kontrolnej. Najwięcej selenu ($2900 \mu\text{g Se}^{4+}/\text{g s.s.}$) związanego z komórkami drożdży uzyskano po 48 godzinach hodowli w podłożach zawierających $80 \text{ mg Se}^{4+}/\text{dm}^3$ (tab. I). Nieliczne publikacje (15, 16) świadczą o tym, że drożdże są w stanie akumulować wysokie stężenia selenu ($3000 \mu\text{g/g s.s.}$). *Demirci i in.* (14) wykazali, że drożdże z rodzaju *Saccharomyces* mogą gromadzić do $2846 \mu\text{g}$ selenu w 1 g suchej substancji biomasy. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dodatek selenu w podłożach doświadczalnych dawał porównywalny poziom zawartości selenu w biomase komórkowej uzyskanej przez innych badaczy.

Tab e l a 1. Zawartość selenu ($\mu\text{g Se}^{4+}/\text{g s.s.}$) w biomase komórkowej drożdży *C. utilis* podczas hodowli w podłożach kontrolnym (YPD) i doświadczalnym wzbogaconym w Na_2SeO_3

Table 1. Content of selenium ($\mu\text{g Se}^{4+}/\text{g d.w.}$) in the yeast biomass *C. utilis* cultivated in control (YPD) and experimental conditions enriched with Na_2SeO_3

Rodzaj podłoża	Czas hodowli [h]	
	24	48
	Zawartość selenu [$\mu\text{g Se}^{4+}/\text{g s.s.}$]	
YPD	0,56	0,23
YPD + 80 mg $\text{Se}^{4+}/\text{dm}^3$	1860	2900
YPD + 100 mg $\text{Se}^{4+}/\text{dm}^3$	1800	2600

W podłożach doświadczalnych oraz w kontrolnym podłożu YPD największą liczbę komórek drożdży stwierdzono po 24-godzinnej hodowli. W podłożu YPD uzyskano $6,1 \cdot 10^8 \text{ jtk}/\text{cm}^3$, natomiast w stężeniu 80 i $100 \text{ mg Se}^{4+}/\text{dm}^3$ liczba komórek drożdży wynosiła odpowiednio $6,2 \cdot 10^7$; $5,1 \cdot 10^7 \text{ jtk}/\text{cm}^3$ (tab. II). Najmniejszą liczbę komórek, wynoszącą $4,7 \cdot 10^7 \text{ jtk}/\text{cm}^3$ odnotowano w 48 godzinie hodowli w podłożu wzbogaconym jonami selenu w ilości $100 \text{ mg Se}^{4+}/\text{dm}^3$. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej nie stwierdzono istotnej różnicy w liczbie komórek drożdży z podłoży doświadczalnych zawierających 80 i $100 \text{ mg Se}^{4+}/\text{dm}^3$. Wyniki liczby komórek drożdży w podłożach kontrolnych oraz doświadczalnych sugerują, że dodatek Se^{4+} wykazywał hamujące działanie na wzrost badanego szczepu drożdży.

Table II. Zmiany liczby komórek drożdży *C. utilis* podczas 48-godzinnej hodowli w podłożach kontrolnym (YPD) i doświadczalnym wzbogaconym w Na_2SeO_3

Table II. Changes number of cells of *C. utilis* strain during 48 h cultivation from the control (YPD) and experimental media enriched with Na_2SeO_3

Rodzaj podłoża	Czas hodowli [h]		
	0	24	48
	Liczba komórek [jtk/cm ³] wartość średnia ± SD		
YPD	$5,0 \cdot 10^7 \pm 5,6 \cdot 10^6 \text{a}^*$	$6,1 \cdot 10^8 \pm 6,5 \cdot 10^7 \text{c}$	$5,6 \cdot 10^8 \pm 6,8 \cdot 10^7 \text{b}$
YPD + 80 mg $\text{Se}^{4+}/\text{dm}^3$	$4,2 \cdot 10^7 \pm 5,2 \cdot 10^6 \text{a}$	$6,2 \cdot 10^7 \pm 5,9 \cdot 10^6 \text{a}$	$6,1 \cdot 10^7 \pm 5,4 \cdot 10^6 \text{a}$
YPD + 100 mg $\text{Se}^{4+}/\text{dm}^3$	$4,0 \cdot 10^7 \pm 7,2 \cdot 10^6 \text{a}$	$5,1 \cdot 10^7 \pm 3,8 \cdot 10^6 \text{a}$	$4,7 \cdot 10^7 \pm 5,9 \cdot 10^6 \text{a}$

SD – odchylenie standardowe

* Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy

W tabeli III przedstawiono porównanie plonów biomasy komórkowej drożdży *C. utilis* ATCC 9950 uzyskanych podczas hodowli w podłożu kontrolnym YPD oraz doświadczalnych wzbogaconych selenem. Dodatek selenu do podłoża YPD istotnie różnicował plon biomasy w stosunku do podłoża kontrolnego.

Table III. Plon biomasy komórkowej drożdży *C. utilis* (g s.s./dm³) podczas hodowli w podłożach kontrolnym (YPD) i doświadczalnym wzbogaconym w Na_2SeO_3

Table III. Yield of *C. utilis* (g d.w./dm³) biomass during cultivation in the control (YPD) and experimental media enriched with Na_2SeO_3

Rodzaj podłoża	Czas hodowli [h]		
	0	24	48
	Plon biomasy [g s.s./dm ³] wartość średnia ± SD		
YPD	$1,87 \pm 0,18 \text{a}^*$	$16,79 \pm 0,41 \text{f}$	$16,05 \pm 0,5 \text{e}$
YPD + 80 mg $\text{Se}^{4+}/\text{dm}^3$	$1,78 \pm 0,12 \text{a}$	$3,72 \pm 0,47 \text{d}$	$3,39 \pm 0,50 \text{d}$
YPD + 100 mg $\text{Se}^{4+}/\text{dm}^3$	$1,76 \pm 0,11 \text{a}$	$2,77 \pm 0,33 \text{c}$	$2,41 \pm 0,19 \text{b}$

SD – odchylenie standardowe

* Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy

W podłożu kontrolnym YPD, po wprowadzeniu inokulum, plon biomasy komórkowej wynosił $1,87 \text{ g s.s./dm}^3$, natomiast w 24 godzinie hodowli osiągnął wartość $16,79 \text{ g s.s./dm}^3$. W podłożu doświadczalnym wzbogaconym selenem

(80 mg Se⁴⁺/dm³) wartość ta wzrosła w czasie 24 godzin z 1,78 do 3,72 g s.s./dm³. Mniejszy plon biomasy po 24 i 48-godzinnej hodowli uzyskano w podłożu z dodatkiem 100 mg/dm³, odpowiednio 2,77 i 2,41 g s.s./dm³. Stwierdzono, że rosnące stężenie selenu w podłożach doświadczalnych w stosunku do podłoża kontrolnego YPD spowodowały znaczące zmniejszenie plonu biomasy drożdży o około 80%, co świadczyło o hamującym wpływie zastosowanych stężeń selenu na wzrost badanego szczepu drożdży.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Najwięcej selenu (2900 µg Se⁴⁺/g s.s.) związanego z komórkami drożdży uzyskano po 48-godzinnej hodowli w podłożu wzbogaconym selenem w dawce 80 mg Se⁴⁺/dm³.
2. Najwyższy plon biomasy, tj. 16,79 g s.s./dm³ oraz liczby komórek $6,1 \cdot 10^8$ jtk/cm³ osiągnięto po 24-godzinnej hodowli w podłożu kontrolnym YPD.
3. Wzbogacenie podłoża doświadczalnego w selen o stężeniu 80 i 100 mg Se⁴⁺/dm³ wpływały na zahamowanie wzrostu szczepu *C. utilis* ATCC 9950, o czym świadczył niski plon i liczba komórek drożdży w porównaniu z hodowlą w podłożu YPD.

M. Kieliszek, S. Błażej, R. Jędrzejczak

THE CAPACITY FOR BINDING SELENIUM BY FODDER YEAST STRAIN *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950

Summary

The study investigated the binding ability of selenium by the *Candida utilis* ATCC 9950 fodder yeast. Yeast cultures were performed in YPD medium supplemented by selenium salts Na₂SeO₃. Selenium content was determined by ZETAAS. It was found that increasing the concentration of selenium in the experimental media, caused the increase in the content of this element in the cell biomass. Most selenium permanently associated with the cell biomass (2900 µg Se⁴⁺/g d.w.) was obtained after 48-hour cultivation with the addition of salts of this element in a dose of 80 mg Se⁴⁺/dm³. After a prolonged experimental cultures of yeast cells, and biomass yield showed a downward trend.

PIŚMIENNICTWO

1. Encinar J. R., Śliwka-Kaszyńska M., Polatajko A., Vacchina V., Szpunar J. (2003): Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast. Anal. Chim. Acta, 2003; 500: 171-183.– 2. Pankiewicz U., Jamroz J.: Accumulation of selenium and catalase activity changes in the cells of *Saccharomyces cerevisiae* on pulsed electric field (PEF) treatment. Ann. Microbiol., 2008; 58: 239-243.– 3. Bitterli C., Bañuelos G.S., Schulin R.: Use of transfer factors to characterize uptake of selenium by plants. J. Geochem. Explor., 2010; 107: 206-216.– 4. Rayman M.P.: The argument for increasing selenium intake. Proc. Nutr. Soc., 2002; 61: 203-215.– 5. Yin H., Fan G., Gu Z.: Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM), LWT Food Sci.

Technol., 2010; 43: 666-669.– 6. Wasowicz W., Gromadzinska J., Rydzynski K., Tomczak J.: Selenium status of low-selenium area residents: Polish experience. *Toxicol. Lett.* 2003;31:95-101.– 7. Combs G.F., Clark L.C., Turnbull B.W.: An analysis of cancer prevention by selenium, *Biofactors*, 2001; 14: 153-159.– 8. Yu S.Y., Zhu Y.J., Li W.G.: Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Oidong, *Biol. Trace Element Res.*, 1997; 56: 117-124.– 9. Berry M., Banu L., Larsen P.: Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme, *Nature*, 1991; 349: 438-440.– 10. Suhajda A., Hegoczki J., Janzso B., Pais I., Vereczkey G.: Preparation of selenium yeast I. Preparation of selenium enriched *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Trace Elements Medic. Biol.*, 2000; 14:43-47.– 10. Kim Y.Y., Mahan D.C.: Biological aspects of selenium in farm animals. *Asian Aust. J. Anim. Sci.*, 2003; 16: 435-444. 11. McSheehy S., Yang L., Mester Z.: Selenomethionine extraction from selenized yeast: an LC-MS. Study of the acid hydrolysis of a synthetic selenopeptide. *Microchim. Acta*, 2006; 155: 373-377.– 12. Gharieb M.M., Gadd G.M.: The kinetics of $^{75}\text{[Se]}$ -selenite uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and the vacuolization response to high concentration, *Mycol. Res.*, 2004; 108: 1415-1422.– 13. Bitterli C., Bañuelos G.S., Schulin R.: Use of transfer factors to characterize uptake of selenium by plants. *J. Geochem. Explor.*, 2010; 107(2): 206-216. –14. Demirci A., Pometto A.L., Cox D.J.: Enhanced organically bound selenium yeast production by fed-batch fermentation. *J. Agri. Food. Chem.*, 1999; 47(6): 2496–2500. – 15. Pérez-Corona M.T., Sánchez-Martínez M., Valderrama M.J., Rodríguez M.E., Cámara C., Madrid Y.: Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments. *Food Chem.*, 2011; 124: 1050-1055. – 16. Schrauzer G. N.: Selenium yeast: Composition, quality, analysis and safety. *Pure Appl. Chem.*, 2006; 78(1): 105–109.

Adres: 02-776 Warszawa, Nowoursynowska 159c.