

Jerzy Jamroz, Urszula Pankiewicz

Wpływ pulsacyjnego pola elektrycznego na akumulację selenu  
w drożdżach *Rodothorula rubra*

---

The effect of pulsed electric field on selenium incorporation in the yeast *Rodothorula rubra*

ABSTRACT. The shaker culture of *Rodothorula rubra* yeast was exposed to a pulsed electric field. The highest incorporation of selenium into the cells was observed at an electric field strength of 1.5 kV/cm, a 1Hz frequency, a pulse width of 1ms and for 15 min. After 16 hours PEF exposure of culture on 15 µg/ml, the highest concentration selenium in the cells was observed. Selenium was determined by means of AAS technique.

KEY WORDS: selenium, yeast, *Rodothorula rubra* , PEF

W układach biologicznych zastosowanie pulsacyjnego pola elektrycznego (PEF) obejmuje indukcję biochemicznych i fizjologicznych reakcji w komórkach, tkankach i w całym organizmie [Fiedurek i in. 2000]. Elektroporacja jest zastosowaniem transmembranowych pulsów elektrycznych do indukowania mikroskopowych porów w biomembranach. Takie pory są powszechnie nazywane elektroporami. Ich obecność ułatwia wprowadzenie molekuł, jonów i wody przez membranę do innych struktur komórkowych. Elektropory są lokalizowane przeważnie na powierzchni komórek, które są najbliżej elektrod.

Jeśli puls pola elektrycznego ma odpowiednio dobrane parametry, wtedy elektroporowane komórki mogą powracać do normalnego stanu i dalej spełniać życiowe funkcje. Ponieważ mechanizm elektroporacji nie jest dobrze wyjaśniony, postęp w sterowaniu dla szczegółowych zastosowań ma zazwyczaj charakter empiryczny przez dobór parametrów pulsu (amplitudy, czasu trwania,

zakresu oddziaływania). Czas działania impulsów jest bardzo krótki, około jednej mikrosekundy. Czas ponownego uszczelnienia wynosi około jednej minuty. Stan przepuszczalności błon dla makrocząsteczek po elektroporacji może utrzymywać się przez kilka minut do kilkunastu godzin w zależności od rodzaju komórek, natężenia pola elektrycznego, czasu trwania impulsu, temperatury i składu chemicznego środowiska. Elektropory najczęściej są indukowane przy różnej amplitudzie i czasie trwania pulsów, zazwyczaj powyżej dolnego progu wrażliwości odpowiednio dla wrażliwych i opornych komórek. Liczba por i średnica efektywnych porów wzrasta z amplitudą i czasem trwania impulsu. Jeżeli średnica poru i całkowita powierzchnia por są zbyt duże dla komórek, żeby podlegały naprawie przez jakieś spontaniczne biologiczne procesy, efekt uszkodzenia komórki jest nieodwracalny. Przerwanie ciągłości błony zachodzi wtedy, gdy potencjał błonowy w wyniku przyłożonego napięcia przekroczy 0,5–1,0 V

[T. Grahl, Markl. 1996. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 148–157]. Wartość ta zależy od rodzaju i rozmiarów komórki, natężenia pola elektrycznego, czasu trwania impulsu. Pole elektryczne uszkadza błonę komórkową, kiedy jego natężenie wynosi od kilkuset do kilkunastu tysięcy  $V\ cm^{-1}$  [Jayamar i in. 1992]. Optymalny czas trwania impulsu i natężenia pola wyznaczone są eksperymentalnie dla każdego typu komórek.

Elektroporacja stała się bardzo popularna od lat osiemdziesiątych, ponieważ znaleziono wyjątkowo praktyczny sposób wprowadzania środków farmaceutycznych, DNA lub innych molekuł do komórek [Serpensu, Tsong 1984; Prasanna, Panda 1997]. Wyniki badań z późnych lat osiemdziesiątych i wczesnych dziewięćdziesiątych pokazały, że w pewnych eksperymentalnych warunkach i parametrach pulsów elektrycznych mogą być one zdolne powodować ruch wielu więcej molekuł na jednostkę czasu niż prosta dyfuzja [Dimitrov, Sowers 1990]. Wydawało się celowe podjęcie badań wykorzystujących elektroporację do wzbogacania drożdży *Rodothorula rubra* w selen.

#### METODY

Do badań użyto drożdży *Rodothorula rubra* (RR), pochodzących z kolekcji Katedry Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa AR w Lublinie. Podłoże płynne podstawowe stosowane w hodowlach miało następujący skład ( $g/dm^3$ ): glukoza (70),  $NH_4Cl$  (7,5),  $KH_2PO_4$  (2,5),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (2,0),  $Na_2SO_4$  (2,0), ekstrakt drożdżowy (YE) (5) oraz 40 ml brzeczki niechmielonej. Sterylizację przeprowadzano w autoklawie pod ciśnieniem 0,5 atmosfery w temperaturze  $113^\circ C$  około 20 minut.

**Inokulum płynne.** Drożdże RR kilkakrotnie pasażowano na skosy agarowe i hodowano w cieplarni o temperaturze 30°C przez dwie doby. Następnie przygotowywano inokulum płynne. Komórkami z jednego skosu szczepiono 150 ml sterylnej pożywki w kolbach Erlenmayera. Hodowle prowadzono na wytrząsarce z łaźnią wodną przez 24 godzin w temperaturze 30°C, amplitudzie 4 i szybkości 220 obr./min. Po zakończonej hodowli, odwirowywano biomasę komórek kilkakrotnie, po każdym kolejnym wirowaniu wprowadzano nową porcję wody sterylnej. Biomasę komórek z trzech kolb Erlenmayera rozproszano każdorazowo w 300 ml wody sterylnej. Tak przygotowane inoculum służyło do szczepienia programowanych hodowli wstrząsanych.

**Hodowle wstrząsane.** Hodowle wstrząsane prowadzono w kolbach stożkowych o pojemności 500 cm<sup>3</sup>, zawierających po 100 cm<sup>3</sup> pożywki, którą szczepiono 10 ml zawiesiną komórek drożdży RR. Zawartość kolb wstrząsano przez 72 godziny w temperaturze 30°C na wytrząsarce rotacyjnej. Po zakończeniu hodowli grzybnię odwirowywano.

**Preparaty drożdżowe.** Preparaty otrzymywano z biomasy komórek, odmytej od metabolitów i pozostałości składników pożywki, którą następnie suszono w liofilizatorze firmy Labconco (Model 64132, Kansas City, MO, USA).

**Mineralizacja komórek.** Odważano 100 mg zliofilizowanych drożdży selenowych do szklanej gilzy, dodawano 5 ml mieszaniny HNO<sub>3</sub> – HClO<sub>4</sub> (3+1 v/v) i pozostawiano na noc. Następnego dnia próbkę ogrzewano w bloku grzejnym w temp. 50°C przez 1 godz., w temp. 70°C przez 6 godz. i w temp. 125°C przez 12 godzin. Po ochłodzeniu końcowy roztwór do oznaczeń metodą elektrotermicznej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (ETAAS) przenoszono do kolby miarowej o pojemności 25 ml. Oznaczanie selenu wykonywano z wykorzystaniem kuwety grafitowej w aparacie Spectra AA-880 firmy Varian.

**Elektroporacja komórek RR.** Przy zoptymalizowanym składzie pożywki, wartości pH 5,2, ustalonej zawartości seleninu sodu, dobranym czasie ekspozycji PEF na zawiesiny komórek prowadzono hodowle wstrząsane według omówionych zasad i wcześniej ustalonych parametrach PEF: częstotliwość pola 1 Hz, napięciu 1500 V i czasie trwania pulsu, 1 ms.

Obiektami w tych doświadczeniach były: K1 – hodowla kontrolna, bez selenu w pożywce bez stosowania PEF; K2 – hodowla kontrolna z całą dawką selenu w pożywce o określonym stężeniu, dodana do pożywki przed rozpoczęciem hodowli, bez użycia PEF; 3 – hodowla do której selen dodawano w pięciu porcjach w odstępach czasowych, pierwszą porcję przed rozpoczęciem hodowli, następne po 8, 12, 16, 20 godzinach, próbę traktowano PEF po 8 godzinach od rozpoczęcia hodowli; 4 – hodowla, do której selen dodawano w pięciu porcjach w odstępach czasowych jak wyżej, próbę traktowano PEF po 12 godzinach;

5 – hodowla, do której selen dodawano w pięciu porcjach w odstępach czasowych jak wyżej, próbę traktowano PEF po 16 godzinach; 6 – hodowla, do której selen dodawano w pięciu porcjach w odstępach czasowych jak wyżej, próbę traktowano PEF po 20 godzinach; K4 – hodowla kontrolna, do której selen dodawano w pięciu porcjach w odstępach czasowych jak wyżej, próbę traktowano PEF po 8, 12, 16, 20 godzinach hodowli.

Według podanego schematu przeprowadzono doświadczenia mające na celu ustalenie optymalnego okresu hodowli, po którym traktowano PEF komórki drożdży. Zastosowano 15-minutowy czas traktowania komórek PEF oraz przyjęte wcześniej stężenie selenu w pożywce (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) [wyniki niepublikowane]. Dodatkowym obiektem w tym doświadczeniu była: hodowla kontrolna (K3) z całą dawką selenu o określonym stężeniu, dodana do pożywki przed rozpoczęciem hodowli i traktowana PEF po 16 godzinach namnażania komórek.

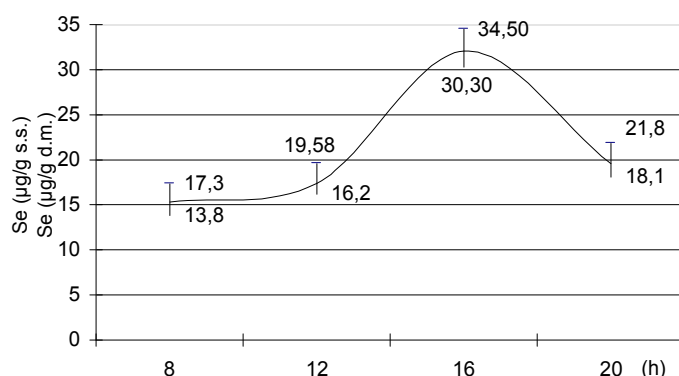
Dobór parametru czasu traktowania komórek *R. rubra* PEF. W tym celu przeprowadzono szereg niezależnych hodowli, do których dodawano całą dawkę selenu o stężeniu 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pożywki przed rozpoczęciem hodowli. Komórki drożdży traktowano PEF w czasie 5, 10, 15 i 20 minut po ustalonym wcześniej okresie hodowli. Na podstawie uzyskanych wyników określono optymalny czas traktowania *R. rubra* PEF.

Ustalenie optymalnego stężenia selenu w pożywce. W tym celu przeprowadzono hodowle o ustalonym wcześniej okresie hodowli oraz czasie traktowania PEF komórek drożdży. Zastosowano następujące stężenia selenu w pożywce ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ): 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18. Na podstawie uzyskanych wyników określono optymalne stężenie selenu w pożywce. Hodowle oraz analizy chemiczne wykonano w sześciu powtórzeniach.

#### WYNIKI

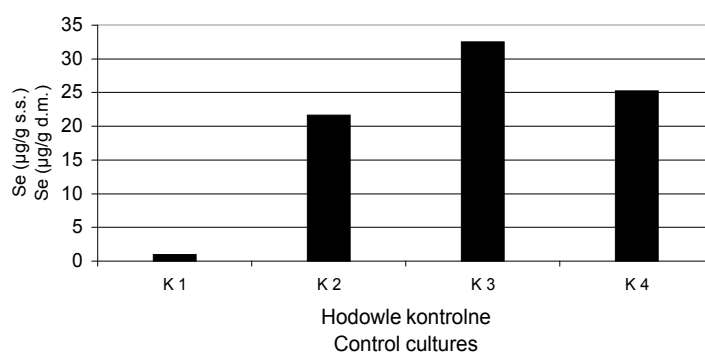
Hodowle wstrząsane *R. rubra* traktowano PEF po 8, 12, 16 i 20 godzinach namnażania komórek (ryc. 1). W przyjętych warunkach hodowli, maksymalne nagromadzenie selenu w drożdżach, ok. 32  $\mu\text{g}/\text{g}$  s. s., stwierdzono po traktowaniu 16-godzinnej hodowli PEF. Odnotowano ok. 113% wzrost zawartości selenu w stosunku do traktowania komórek PEF po 8 godzinach. W komórkach, które traktowano PEF po 12 lub 20 godzinach, odnotowano stosunkowo niewielkie nagromadzenie selenu (od 16  $\mu\text{g}/\text{g}$  s.s. do 21,8  $\mu\text{g}/\text{g}$  s.s.).

W celu pełniejszego zobrazowania wpływu PEF na nagromadzenie selenu w drożdżach prowadzono jednocześnie hodowle kontrolne (ryc. 2). Całą dawkę selenu (K3) dodawano do pożywki przed rozpoczęciem hodowli, a następnie 16-godzinną hodowlę traktowano PEF. Zaobserwowano, że akumulacja selenu



Rycina 1. Wpływ okresu hodowli po 8, 12, 16 i 20 godz. traktowania PEF na akumulację selenu w komórkach

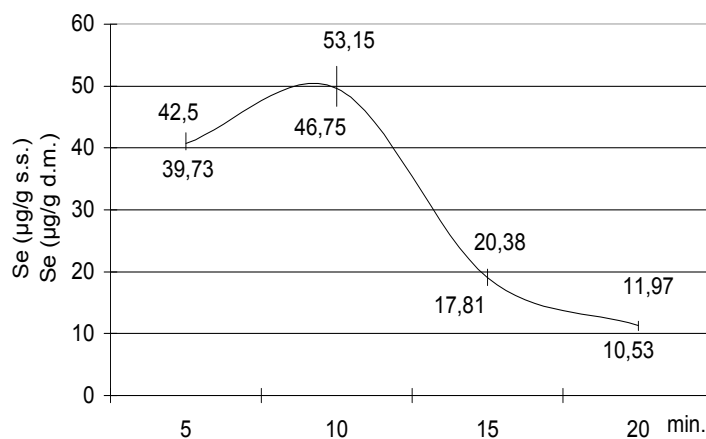
Figure 1. The effect of culturing duration following the PEF treatment for 8, 12, 16 and 20 h on selenium incorporation in cells



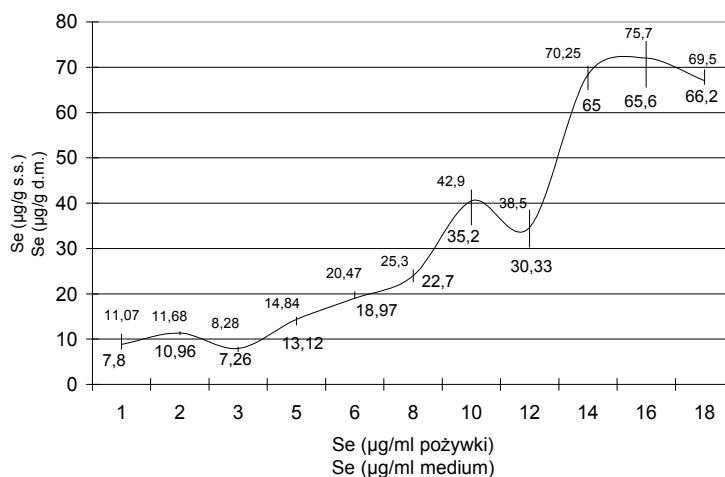
Rycina 2. Zakres stężenia selenu w komórkach (hodowle kontrolne)

Figure 2. The range of selenium concentration in cells (control cultures)

w komórkach występuje w podobnym zakresie jak po okresowym wnoszeniu do pożywki całej dawki selenu i traktowaniu 16-godzinnej hodowli PEF. Hodowla kontrolna (K4), w której komórki czterokrotnie traktowano PEF, po 8, 12, 16 i 20 godzinach w czasie 36 godzinnej hodowli, zawartość selenu wynosiła ok. 25 µg/g s.s. Była tylko o ok. 17% wyższa w stosunku do akumulacji w komórkach pozyskiwanych z hodowli (K2) bez użycia PEF.



Rycina 3. Stężenie selenu w *R. rubra* w zależności od czasu działania PEF  
 Figure 3. Relationship of selenium concentration in *R. rubra* and PEF treatment duration



Rycina 4. Wpływ stężenia selenu w pożywce na jego akumulację w komórkach drożdży  
 Figure 4. The effect of selenium concentration in the medium on its incorporation in the cells

W kolejnym zadaniu badawczym ustalano czas działania PEF po 16 godzinach namnażania drożdży (ryc. 3). Poprzez dobór tego parametru dążono do podwyższenia zawartości selenu w biomacie komórek. W przeprowadzonych hodowlach czas działania PEF wynosił: 5, 10, 15 i 20 minut. Po 10-minutowej ekspozycji PEF uzyskano najwyższe nagromadzenie selenu (ok. 50 µg/g s.s.) w komórkach. Było ono wyższe o ok. 25% lub 400% w stosunku do 5 i 20-

nutowego traktowania hodowli PEF. Optymalizacja czasu działania PEF wpłynęła na ok. 56% wzrost zawartości selenu w komórkach w stosunku do wstępnych doświadczeń.

Dotychczasowe hodowle *R. rubra* prowadzono przy stężeniu selenu 4 µg/ml pożywki. Analizując wyniki z innych doświadczeń nad akumulacją selenu w drożdżach *S. cerevisiae* bez stosowania PEF w czasie hodowli [Podgórska, Achremowicz 1996], można było przypuszczać, że przy ustalonych parametrach działania PEF niezbędne jest zoptymalizowanie stężenia selenu w pożywce. W kolejnych doświadczeniach hodowlanych stosowano stężenia: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 µg/ml pożywki (ryc. 4). Zawartość selenu przy stężeniach od 1 µg/ml do 12 µg/ml miała niewielki wpływ na nagromadzenie selenu w biomacie komórek. Znaczący wpływ stężenia selenu w pożywce odnotowano w górnym zakresie od 14 µg/ml do 18 µg/ml. Przy optymalnej jego zawartości (15 µg/ml) odnotowano maksymalną akumulację selenu w komórkach *R. rubra*, ok. 72 µg/g s.s.

#### WNIOSKI

1. Zaprezentowane wyniki badań nad akumulacją selenu w komórkach *R. rubra* wykazały znaczącą odporność tego gatunku drożdży na akumulację selenu.
2. Ekspozycja hodowli *R. rubra* pulsacyjnym polem elektrycznym miała istotny wpływ na akumulację selenu w komórkach.

#### PIŚMIENNICTWO

- Dimitrov D.S., Sowers A.E. 1990. Membrane electroporation – fast molecular exchange by electroosmosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1022, 381–382.
- Fiedurek J., Skowronek M., Jamroz J. 2000. Zmiany strukturalne i fizjologiczne w układach biologicznych indukowane pulsacyjnym polem elektrycznym. *Post. Nauk Rol.* 6, 41–55.
- Jayamar S., Castle G.S.P., Margaritis A. 1992. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1412–1420.
- Podgórska E., Achremowicz B. 1996. Badania właściwości antyrakowych uzyskanych preparatów drożdży selenowych. *Annales UMCS, Sec. E*, 49, 207–210.
- Prasanna G. L., Panda T. 1997. Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. *Bioproc. Engin.* 16, 261–264.
- Serpensu E.H., Tsong T.Y. 1984. Activation of electrogenic Rb<sup>+</sup> transport of (Na, K) –ATPase by an electric field. *J. Biol. Chem.* 259, 7155–7162.

