

ТМВС, содержащие высшие алифатические n -спирты фракции C_{10} - C_{18} и C_7 - C_{12} .

ЛИТЕРАТУРА

1. Седов А.В., Цветков Б.Н. Проклеивающие вещества на канифольной основе (Обзор). -М., 1974. - 44 с.

УДК 573.6.086.83:663.1

И.В.Кузьмичева, аспирант;

В.Н.Леонтьев, доцент;

Н.В.Гриц, доцент

О ПРИРОДЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ДРОЖЖЕЙ

The physiological and biochemical changes of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Klueveromyces* sp. after immobilization by means of entrapping in alginate and adsorption on fibre surface were investigated. The mechanism of realization of these changes is suggested.

По мере все более широкого использования иммобилизованных клеток микроорганизмов становится очевидным, что процессе иммобилизации, даже в случаях применения инертных для клетки реагентов, влияет на ее биохимию и физиологию.

Было замечено, например, что присоединение клеток к твердой поверхности часто сопровождается развитием необычных морфологических форм [1]. У дрожжей, иммобилизованных на поверхности желатина, возрастало содержание внутриклеточных полисахаридов и развивалась полиплоидия [2]. В некоторых случаях отделенные от носителя и ресуспендированные клетки демонстрируют те же свойства, что и иммобилизованные [3]. Практически всегда после иммобилизации изменяется кинетика метаболических процессов. Для дрожжей, иммобилизованных включением в альгинат, наблюдалось снижение внутриклеточного рН примерно на 0,2 единицы, что свидетельствует, по мнению авторов, о возрастании проницаемости клеточной мембраны для протонов. Такой эффект может непосредственно влиять на активность гликолитических ферментов, увеличивая скорость ферментации [4].

Однако четких представлений о механизме воздействия иммобилизации на биохимию и физиологию иммобилизованной культуры дрожжей в настоящее время нет.

Целью наших исследований являлось выяснение последствий иммобилизации дрожжей адсорбцией на химическом волокне и включением в гель альгината кальция на уровне изменения метаболических процессов.

Исследовали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* Y 1334 и *Klueveromyces* sp.G8 из коллекции культур кафедры биотехнологии и органического синтеза. Исследования проводили в ходе 48-часового периодического культивирования на синтетической среде Ридер с единственным источником углерода - глюкозой. Иммобилизацию дрожжей в геле альгината кальция осуществляли по методик [5]. Для иммобилизации адсорбцией использовали окрашенное полиэфирное волокно. Контролировали изменение концентрации глюкозы реакцией с динитросалициловой кислотой и этанола методом ГЖХ, численность клеточной популяции по оптической плотности при $\lambda = 700$ нм и параллельным высевом на чашках Петри с сусло-агаром. Соотношение белков и нуклеиновых кислот в клеточных экстрактах определяли по методу Варбурга-Христиана [6]. Активность алкогольдегидрогеназы измеряли по модифицированному методу [7].

Кривая изменения оптической плотности суспензии *S.cerevisiae* имеет два пологих участка, что свидетельствует о диауксическом характере питания микроорганизмов. Действительно, на (рис.1) кривых потребления глюкозы и образования этанола видно, что время истощения глюкозы в среде соответствует времени достижения максимальной концентрации этилового спирта. В этот период в клетках инициируется синтез специфических ферментов, позволяющих использовать в качестве источника углерода этанол, концентрация которого начинает уменьшаться.

У дрожжей поток атомов углерода по гликолитическому пути на уровне пирувата раздваивается: частично это вещество превращается в ацетальдегид и затем в этанол, а другая его часть поступает в цикл трикарбонных кислот. Вид *Saccharomyces cerevisiae* принадлежит к ферментирующим дрожжам, на дыхание которых в аэробных условиях потребляется менее 10% катаболизируемой глюкозы. Гликолиз, в ходе которого при расщеплении 1 моля глюкозы синтезируются 2 моля АТФ, - основной метаболический процесс для этого вида. В то время как *Klueveromyces* sp. - "дышащие" дрожжи, запасаящие энергию также в цикле трикарбонных кислот и в дыхательной цепи (38 молей АТФ). Понятно, что обеспечение энергией в равных коли-

чествах потребует от *S.cerevisiae* более быстрого потребления субстрата и, соответственно, высокой скорости синтеза белков гликолитического пути.

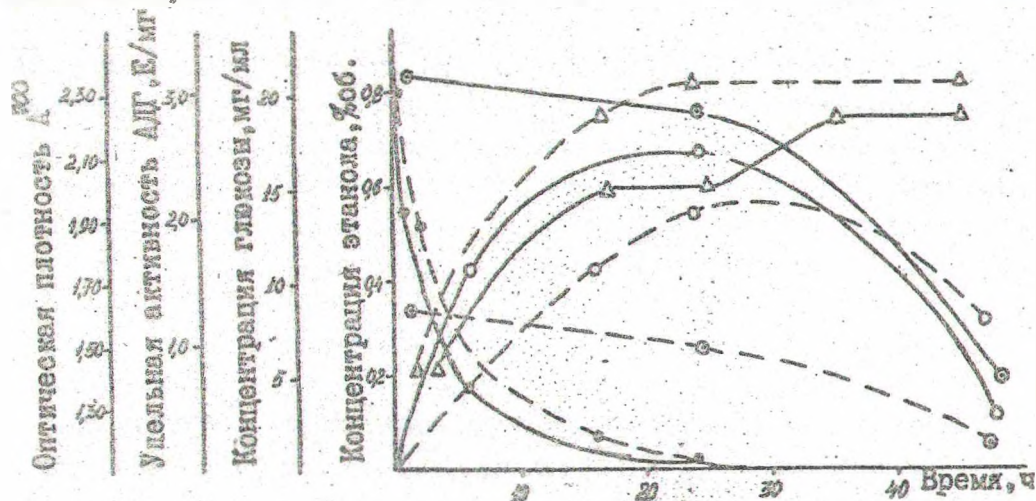


Рис.1. Кинетические кривые процессов ферментации глюкозы дрожжами в суспензии:

- (—) *Saccharomyces cerevisiae*;
 (---) *Klueveromyces sp.*;
 ○ концентрация этанола;
 • концентрация глюкозы;
 ◦ удельная активность алкогольдегидрогеназы;
 Δ оптическая плотность при $\lambda=700\text{нм}$.

В последующих рисунках обозначения те же.

Эти закономерности подтвердились в наших экспериментах. Различия в поведении "дышащих" и ферментирующих дрожжей в суспензии были незначительными (рис.1) и проявились в более высокой скорости образования биомассы при меньшей скорости потребления глюкозы у дрожжей *Klueveromyces sp.* Кроме того, было замечено, что в смеси нуклеиновых кислот и белков, экстрагируемых из клеток *S.cerevisiae*, процентное содержание нуклеиновых кислот в течение двух суток снижалось от 20 до 9%, в то время как в экстрактах из дрожжей *Klueveromyces sp.* оно оставалось постоянным на уровне 6-8%. Удельная активность алкогольдегидрогеназы - заключительного фермента гликолитического пути - на протяжении первых суток не изменялась, а затем снижалась по мере физиологического старения культур, причем у ферментирующих культур этот показатель был примерно в 3 раза выше, чем у "дышащих".

При включении в гель альгината кальция жизнеспособными оставалось около 25-30% клеток, взятых для иммобилизации. Кинетика потребления глюкозы и образования спирта у иммобилизованных культур резко отличалась от поведения клеток в суспензии (рис.2). У дрожжей *S.cerevisiae* выход этанола остался прежним, однако скорость образования спирта резко возросла, а дрожжи *Clueveromyces* sp. образовывали спирт в меньших количествах. В таблице приведены значения удельных скоростей потребления глюкозы и образования этанола в расчете на одну клетку, подтверждающие эти наблюдения.

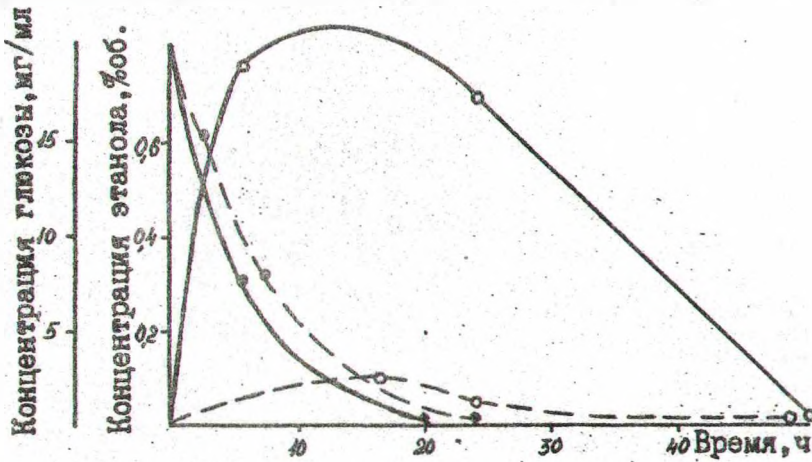


Рис.2. Кинетические кривые процессов ферментации глюкозы дрожжами, иммобилизованными в геле альгината кальция

Столь разный отклик биологических объектов в ответ на одинаковое химическое воздействие дает возможность высказать предположение о природе биохимических изменений в клетках после иммобилизации. По-видимому, кратковременная щелочная обработка дрожжей в процессе формирования гелевой матрицы приводит к снижению уровня внутриклеточной АТФ. Причиной этого явления могут быть конформационные изменения мембранных АТФ-синтетаз. Известно, что избыточный АДФ активирует ключевой фермент гликолитического пути - фосфофруктокиназу. Стремясь восполнить энергетические потери, дрожжи *S.cerevisiae* резко увеличивают поток глюкозы по этому пути до этанола. В то же время *Clueveromyces* sp. увеличивают скорость дыхательных процессов - их основной путь получения энергии; при этом происходит перераспределение потока пи-

рувата: большая его часть направляется в цикл трикарбоновых кислот, меньшая - преобразуется в этанол.

Кинетические параметры ферментации глюкозы дрожжами

Вид дрожжей	Состояние клеток	Максимальная концентрация этанола, % об.	Конверсия глюкозы в этанол, %	Удельные скорости	
				потребления глюкозы, мкг/кл.·ч·10 ⁶	образования спирта, мг/кл.·ч·10 ⁹
S. cerevisiae	Суспензия	0,78	76,32	58,6	9,9
	Иммобилизованные в альгинате	0,76	74,36	71,3	204,7
	Адсорбированные на волокне	0,64	62,62	593,7	203,0
Kluyveromyces sp.	Суспензия	0,56	54,79	47,6	-
	Иммобилизованные в альгинате	0,10	9,78	50,5	-
	Адсорбированные на волокне	0,12	11,74	6,9	-

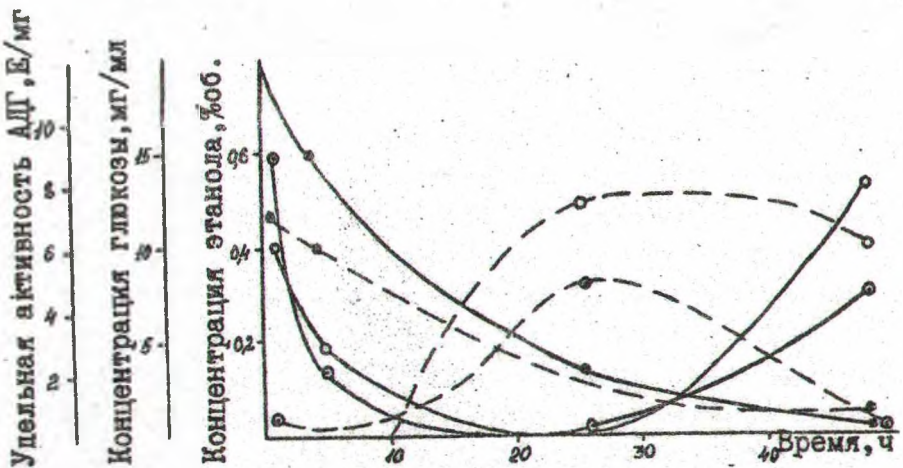


Рис. 3. Кинетические кривые процессов ферментации глюкозы дрожжами, адсорбированными на волокне

В случае дрожжей, адсорбированных на волокне, изменения в кинетике метаболических процессов (рис. 3) объясняются тем, что в

иммобилизации участвовали клетки поздней стационарной фазы, потребляющие этанол. В течение первых суток культивирования спирт продолжал оставаться источником углерода для клеток, и лишь затем начинали действовать ферменты гликолитического пути, расщепляющие глюкозу.

Анализ кинетических параметров ферментации, приведенных в таблице, показывает, что при иммобилизации дрожжей на волокне удельная скорость потребления глюкозы единичной клеткой у *S.cerevisiae* увеличивается, а у *Cluveromyces* sp. уменьшается, в то время как при включении в альгинат эти значения остаются на уровне удельных скоростей для клеток в суспензии.

Таким образом, на основании вышеизложенного можно заключить, что независимо от способа иммобилизации (включение в гель альгината кальция или адсорбция на химическом волокне) существует единый механизм физиолого-биохимической адаптации дрожжей к воздействию иммобилизации. Разная направленность его проявления, вероятнее всего, определяется изменением проницаемости цитоплазматических мембран и соотношением АТФ/АДФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. V.Jirku, J.Turkova, and V.Krumphanzl//Biotechnol.\1.5 Lett.-1980.-V.2.-P.509.
2. P.M.Doran and J.E.Bailey//Biotechnol.and Bioeng.1986.-V.28.-P.73-87.
3. T.Hattori and C.Furusaka //J.Biochem.-1960.-V.48.P.831.
4. J.Galazzo, J.V.Shanks, and J.E.Bailey//Biotechnol. Tech.-1987.-V.1.-P.1-6.
5. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. -М., 1989. С.92.
6. O.Warburg and W.Christian//Biochemische Z.-1941/42. -V.310.-P.384-421.
7. Практикум по биохимии/Под ред. С.Е. Северина и Г.А. Соловьевой. -М.:Изд-во Моск. ун-та, 1989. -С.277.