

УДК 573.6.086.83:663.1

И.В.Кузьмичева, аспирант;

В.В.Плотникова, студент;

В.Н.Леонтьев, доцент;

Н.В.Гриц, доцент.

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ И СУСПЕНДИРОВАННЫХ ДРОЖЖЕЙ В НЕПРЕРЫВНЫХ УСЛОВИЯХ ФЕРМЕНТАЦИИ

Different physiological parameters of yeast cell in suspension as well as entrapped in calcium alginate and adsorbed on acrylonitrilic fibre surface during continuous fermentation were investigated.

Целью данной работы были определение и сравнительный анализ некоторых физиологических характеристик культур дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluuyveromyces* sp. в суспендированном и иммобилизованном состояниях при осуществлении непрерывной ферментации в течение 48 ч.

Дрожжи *S.cerevisiae* Y1334 и *Kluuyveromyces* sp. из коллекции кафедры биотехнологии и органического синтеза выращивали на косяках с сусло-агаром в течение 48 ч при температуре 30°C, а затем культивировали в колбах объемом 250 мл со средой Ридера при температуре 30°C и 180 мин в течение 1 ч.

Иммобилизацию проводили включением в альгинат кальция по методу [1] либо адсорбцией на акрилонитриловом волокне путем прокачивания клеточной суспензии через слой носителя в течение 24 ч.

Непрерывную ферментацию осуществляли в термостатированном биореакторе, снабженном системами непрерывной подачи среды Ридера (концентрация глюкозы 2%) и отбора проб, а также системами перемешивания среды в реакторе для создания оптимальных условий массопереноса.

Регистрацию физиологических параметров клеток осуществляли в 2 серии по 8 ч с периодичностью измерений 1 ч через 12 и 40 ч от начала ферментации. Данные получены в результате проведения 2 параллельных опытов.

Исследовали следующие физиологические параметры клеток: уровень потребления субстрата путем определения концентрации глюкозы методом Миллера [2]; уровень образования этанола определяли на хроматографе "Автохром" (Москва) с колонкой (длина - 2 м, диаметр - 2мм) с неподвижной фазой 15% Carbowax 1500 на Хроматоне N-AW 0,125-0,160 мм при температуре колонки 70°C; уровень поглощаемого клетками кислорода регистрировали полярографическим методом [3] на полярографе PA2 (Чехословакия); уровень выделяемого клетками диоксида углерода рассчитывали по уравнению Хендерсона-Хассельбалха [4] с использованием измеряемой по методу [5] величины диссоциации

угольной кислоты (и измерение проводили на иономере И-130 с электродом ЭСЛ-43-07, снабженным проницаемой для  $\text{CO}_2$  тефлоновой мембраной). Концентрацию клеток в единице объема среды ферментации определяли путем прямого подсчета в камере Горяева. В 1-е и 2-е сутки ферментации измеряли электрофоретическую подвижность клеток методом микроэлектрофореза [6] в электрическом поле с постоянной разностью потенциалов 50В и рассчитывали коэффициент вариации культуры дрожжей по величине удельного поверхностного заряда клеток.

Полученный набор параметров подтверждает стационарный характер протекания процесса ферментации (в табл.1 сведены усредненные по результатам двух измерений значения физиологических параметров клеток в 1-е и 2-е сутки ферментации).

Как следует из этих данных, содержание клеток в единице объема реактора в течение ферментации оставалось практически постоянным, за исключением дрожжей *Kluveromyces* в суспендированном состоянии, для которых скорость вымывания клеток из реактора превышала скорость роста, и содержание клеток в среде на вторые сутки ферментации уменьшилось в 1,25 раза. Возможно, низкая скорость роста *Kluveromyces* sp. объясняется недостатком в среде ферментации кислорода.

Отмечено также незначительное снижение уровней потребления глюкозы и образования этанола клетками обоих видов дрожжей во всех исследованных состояниях с течением ферментации, за исключением дрожжей *Kluveromyces* sp., для которых наблюдалось незначительное увеличение этих параметров на вторые сутки ферментации. Анализ изменений коэффициента конверсии глюкозы в этанол (табл.2) позволяет сделать вывод об отсутствии количественных изменений в характере протекания реакций брожения. Наиболее полно глюкоза превращается в этанол в клетках дрожжей, включенных в гелевую матрицу.

Вместе с тем отмечены существенные изменения в соотношении уровней потребления кислорода и образования диоксида углерода клетками в процессе ферментации (табл.1) (различия в методических подходах не позволяют соотносить значения этих параметров с величинами уровней потребления глюкозы и образования спирта). Для клеток *S.cerevisiae* в суспензии и включенных в альгинат кальция характерно уменьшение уровней потребления кислорода и значительное (в 12 и 26 раз соответственно) увеличение уровней образования диоксида углерода на вторые сутки ферментации. Это при условии стабильного протекания реакций спиртового брожения в клетках свидетельствует в пользу возможности образования  $\text{CO}_2$  в других реакциях клеточного метаболизма.

Табл. 1. Физиологические параметры клеток дрожжей в различных состояниях при непрерывной ферментации

Вид дрожжей	Состояние	Физиологические параметры клеток									
		Концентрация клеток в 1 мл среды, кл/мл		Уровень потребления глюкозы, мкмоль/кл·мин·10		Уровень образования этанола, мкмоль/кл·мин·10		Уровень потребления кислорода, ммоль/кл·мин·10		Уровень выделения CO <sub>2</sub> , ммоль/кл·мин·10	
		1 сут	2 сут	1 сут	2 сут	1 сут	2 сут	1 сут	2 сут	1 сут	2 сут
<i>S. cerevisiae</i>	Суспендированные	1,13	1,47	13,1	10,1	21,8	16,8	3,2	2,4	2,0	24,2
	Включенные в альгинат	1,6	1,44	5,9	4,4	10,6	8,6	1,8	0,7	0,8	20,9
	Адсорбированные на волокне	0,78	0,81	9,5	9,1	15,8	15,2	2,6	2,8	0,1	0,2
Клювегоспусес sp	Суспендированные	3,50	2,80	3,9	2,6	7,0	4,6	1,2	1,7	1,9	0,6
	Включенные в альгинат	1,43	1,47	4,5	4,3	8,6	8,4	1,6	1,8	1,7	0,2
	Адсорбированные на волокне	1,66	1,57	3,8	4,0	6,1	6,5	2,0	1,7	10,1	9,9

Табл. 2. Физиологические параметры культур дрожжей в различных состояниях при непрерывной ферментации

Вид дрожжей	Состояние	Физиологические параметры культур дрожжей					
		Дыхательный коэффициент		Конверсия глюкозы в этанол, %		Коэффициент вариации культуры, %	
		1 сут	2 сут	1 сут	2 сут	1 сут	2 сут
<i>S. cerevisiae</i>	Суспендированные	0,6	10,1	83,0	83,2	12,7	35,0
	Включенные в альгинат	0,4	29,8	90,1	98,6	19,0	29,5
	Адсорбированные на волокне	0,05	0,07	83,1	83,5	9,2	24,5
<i>Kluveromyces sp.</i>	Суспендированные	1,6	0,4	89,7	88,5	25,5	33,9
	Включенные в альгинат	1,1	0,1	95,0	97,7	42,6	73,0
	Адсорбированные на волокне	5,1	5,8	81,0	81,2	24,5	30,8

Для клеткок *Kluveromyces sp.* в суспензии и в альгинате, напротив, характерно незначительное увеличение уровня потребления кислорода и снижение уровня образования углекислого газа (в 3 и 8 раз соответственно). На наш взгляд, это может быть проявлением эффекта Крэбтри [7], связанного с высоким содержанием в клетках НАДН/НАД<sup>+</sup>. В этом случае гликолиз угнетается на уровне глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и возникает необходимость регенерации НАД в реакциях с участием кислорода.

Анализ значений дыхательных коэффициентов (табл.2) показал, что для дрожжей обоих видов, прикрепленных к поверхности акрилонитрилового волокна, характерно сохранение уровней потребления кислорода и образования диоксида углерода в процессе ферментации. Причем у *S.cerevisiae* уровень потребления кислорода преобладает над уровнем выделения CO<sub>2</sub>, а у *Kluveromyces sp.*, напротив, образование CO<sub>2</sub> клетками происходит интенсивнее процесса потребления O<sub>2</sub>. Кроме того, для адсорбированных на поверхности волокна дрожжей характерны самые низкие значения коэффициентов вариации культуры по величине удельного поверхностного заряда клеток. Увеличение степени синхронности клеток может быть вызвано процессом иммобилизации и связано с неблагоприятным воздействием образующихся связей между поверхностью волокна и клеточными стенками на физиологическое состояние клеток.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о существенном влиянии иммобилизации на физиологические характеристики клеток дрожжей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. - М., 1989. Т.2. С.192.
2. Miller J.L. // Anal. Chem. 1959. V.31. - P.426-428.
3. Практикум по биохимии / Под редакцией Северина С.Е. и Соловьевой Г.А. - Изд-во Моск. ун-та, 1989.
4. Музил Я., Новакова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах. - М.: "Мир", 1984. - С.186.
5. Уильямс У.Дж. Определение анионов. - М.: Химия, 1982. - С.49.
6. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез. - М.: Наука, 1976.
7. Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. - Киев: Наукова думка, 1991. - С.55-57.

УДК 573.6.086.83:663.

М.Н.Менча, студент;  
И.В.Кузьмичева, аспирант;  
В.Н.Леонтьев, доцент

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ С НОСИТЕЛЯМИ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ

The interactions between microorganism cells and carrier surface during immobilization were investigated. The change of surface properties was achieved by means of dye modification.

Несмотря на то, что иммобилизованные клетки микроорганизмов широко применяются в промышленных процессах, до сих пор подбор носителей для иммобилизации в каждом конкретном случае осуществляется эмпирически. Очевидно, такой подход обусловлен отсутствием четких теоретических представлений о механизмах взаимодействия клеток микроорганизмов с твердой поверхностью носителя. Существующие теории [1-3] не позволяют в полной мере и адекватно описать адгезию микроорганизмов на твердых поверхностях, поскольку клетка - сложный биологический объект, адгезионная способность которого непостоянна, зависит от многих факторов и может меняться на молекулярно-генетическом уровне.

Целью настоящей работы было экспериментально изучить закономерности взаимодействия клеток микроорганизмов с поверхностью носителей для иммобилизации.