

УДК 573.6.086.83.663.1

## ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА МЕТАБОЛИЗМ ДРОЖЖЕЙ

© 1998 г. И. В. Кузьмичева, В. В. Плотникова, Н. В. Гриц, В. Н. Леонтьев

Белорусский государственный технологический университет, Минск, 220630

Поступила в редакцию 04.01.96 г.

На основании сравнения дыхательных коэффициентов и активности ферментов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluveromyces* sp., культивируемых в свободном и иммобилизованном на акрилонитриловом волокне состояниях, сделан вывод об изменении метаболизма под влиянием иммобилизации, выражающемся в активации основного для данного типа клеток метаболического пути.

В ряде работ отмечается изменение физиологических и биохимических параметров клеток микроорганизмов после перевода их в иммобилизованное состояние [1, 2]. В частности, у иммобилизованных дрожжей наблюдается возрастание скорости сбраживания субстрата [3], скорости роста [4–6], возникновение клеток необычной морфологической формы [7, 8]. Эти явления могут вызываться изменением микроокружения клеток при иммобилизации [9, 10], а также другими причинами [5, 11]. Очевидно, понимание процессов, протекающих в иммобилизованных клетках, способствовало бы созданию теоретической базы для решения проблемы избирательного биосинтеза определенных веществ посредством иммобилизации продуцентов на определенном носителе.

Цель работы – определение способности культур дрожжей разного возраста адаптироваться к новым условиям культивирования, возникающим при переводе клеток в иммобилизованное состояние, а также выявление направленности сдвигов метаболизма в иммобилизованных клетках.

## МЕТОДИКА

Этанолпродуцирующие дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* Y1334 из коллекции ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва) и *Kluveromyces* sp. 8G из коллекции кафедры биотехнологий и биоэкологии Белорусского государственного технологического университета выращивали в конических колбах объемом 250 мл при постоянной аэрации и температуре 30°C. Среда культивирования содержала следующие минеральные компоненты (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3.0;  $\text{MgSO}_4$  – 0.7;  $\text{NaCl}$  – 0.5,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  – 0.4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.1 и глюкозу – 20, pH 4.2–4.4.

Для исследований выбраны штаммы этанолпродуцирующих дрожжей. Вид *S. cerevisiae* характеризуется бродильным типом метаболизма и от-

сутствием эффекта Пастера. При культивировании в жидкой среде *S. cerevisiae* первоначально сбраживает глюкозу, а затем потребляет этанол. Для дрожжей рода *Kluveromyces* основным метаболическим путем, в ходе которого происходит синтез АТФ, является дыхание, лишь около 10% глюкозы превращаются в этанол [12].

Иммобилизацию проводили на полиакрилонитрильном волокне нитрон производства Новополоцкого ПО “Полимир” (Республика Беларусь), модифицированном путем окрашивания катионными красителями – золотисто-желтым 2К (1.195%) и красным 2С (0.912%).

Для иммобилизации использовали культуры микроорганизмов в различных физиологических состояниях: после 1 ч культивирования в суспензии (начало логарифмической фазы роста); 6 ч (середина логарифмической фазы); 24 ч (стационарная фаза роста); 48 ч (поздняя стационарная фаза и переход к фазе отмирания клеток).

Иммобилизацию на 1 г волокна проводили в конических колбах объемом 250 мл при 30°C в среде культивирования с перемешиванием при 60 об/мин в течение 24 ч.

Иммобилизованные дрожжи переносили в колбы со свежей средой, и осуществляли ферментацию при 180 мин<sup>-1</sup> и 30°C в течение 24 ч. Концентрацию глюкозы измеряли по Миллеру [13]. Состав сред ферментации определяли методом ГЖХ на хроматографе “Автохром” (Москва) с колонкой (длина – 2 м, диаметр – 2 мм) с неподвижной фазой 15% Carbowax 1500 на хроматоне N-AW 0.125–0.160 мм при температуре колонки 70°C. Количество поглощаемого клетками кислорода регистрировали полярографическим методом [14] на полярографе РА2 (Чехословакия). Количество выделяемого клетками углекислого газа рассчитывали по уравнению Хендерсона–Хассельбалха [15] с использованием измеряемой по методу [16] величины диссоциации угольной кислоты (измерение проводили с помощью иономера И-130 с электродом ЭСП-43-07, снабжен-

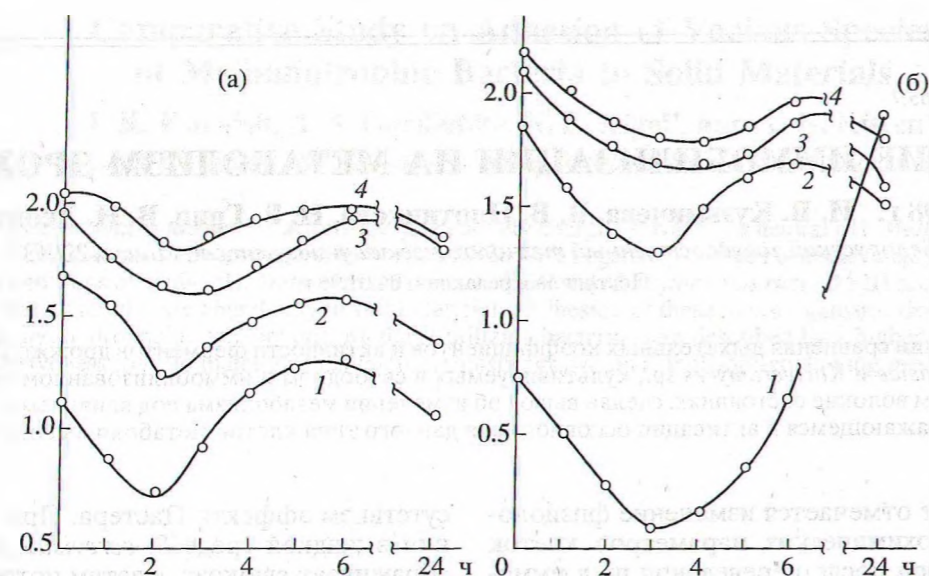


Рис. 1. Изменение оптической плотности дрожжевых суспензий в ходе иммобилизации: а – *S. cerevisiae*; б – *Kluyveromyces sp.* Культуру клеток выращивали до иммобилизации в течение: 1 ч (1); 6 ч (2); 24 ч (3); 48 ч (4).

ным проницаемой для  $\text{CO}_2$  тефлоновой мембраной). О размножении дрожжей судили по результатам учета колоний, образованных на чашках Петри с сусло-агаром после высева из суспензий до иммобилизации и по окончании процесса ферментации.

Электрофоретическую подвижность (ЭФП) клеток измеряли до и после иммобилизации ме-

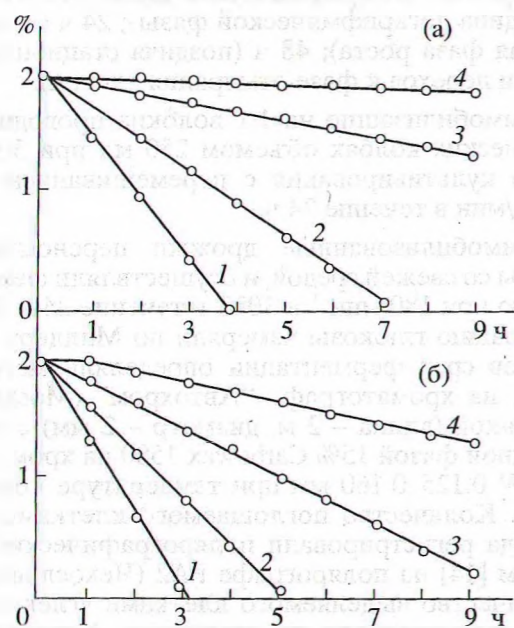


Рис. 2. Потребление глюкозы иммобилизованными дрожжами в ходе ферментации: а – *S. cerevisiae*; б – *Kluyveromyces sp.* Культуру клеток выращивали до иммобилизации в течение: 1 ч (1); 6 ч (2); 24 ч (3); 48 ч (4).

тодом микроэлектрофореза [17] в электрическом поле с постоянной разностью потенциалов 50 В.

По окончании процесса ферментации клетки либо разрушали по методу [18] и определяли активность цитоплазматической алкогольдегидрогеназы [14], либо выделяли из клеток митохондрии [14] и измеряли активность оксидоредуктаз смеси искусственных акцепторов электронов гексацианоферрата (ГЦФ) или 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) и кофакторов НАДН или НАДФН [19]. Ферментативные реакции проводили в термостатируемой кювете с мешалкой при непрерывной регистрации изменения оптической плотности на спектрофотометре Specord M-40 ("Carl Zeiss", Германия). В таблицах представлены средние значения ферментативных активностей, полученные в результате 3–5 измерений.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Начальный участок снижения оптической плотности клеточных суспензий в ходе иммобилизации (рис. 1), вероятно, соответствует процессу насыщения центров связывания на волокне-носителе клетками дрожжей. Затем скорость роста микроорганизмов опережала скорость иммобилизации, и оптическая плотность суспензий возрастала, причем наиболее высокая скорость роста и размножения отмечена у 1-часовой культуры *Kluyveromyces sp.*

В течение последующей ферментации иммобилизованных клеток зафиксирован ряд отличий в поведении 1-часовых культур обоих видов дрожжей. Для них характерны наиболее высокие

Таблица 1. Изменение параметров дрожжевых культур в различных фазах роста в процессе иммобилизации на акрилонитриловом волокне

Вид дрожжей	Время культивирования до иммобилизации, ч	Скорость потребления глюкозы, мг/мл ч	Концентрация клеток в среде, $\times 10^{-7}$ кл/мл		ЭФП клеток, см мкм/В с	
			До ферментации	После ферментации	До иммобилизации	После иммобилизации
<i>S. cerevisiae</i>	1	4.4	1.57	7.60	0.64	0.31
	6	2.7	2.48	2.60	0.62	0.33
	24	0.9	3.02	0.82	0.47	0.26
	48	0.6	0.69	0.21	0.19	0.12
<i>Kluyveromyces sp.</i>	1	5.6	4.29	6.32	0.31	0.83
	6	3.6	10.53	7.86	0.37	0.43
	24	1.3	4.66	4.09	0.10	0.69
	48	0.3	5.14	1.66	0.10	0.43

скорости потребления субстрата (рис. 2), а также значительное увеличение содержания клеток в иммобилизованной системе (табл. 1). В средах ферментации 24- и 48-часовых культур дрожжей обоих видов не обнаружено присутствия этанола. Эти данные свидетельствуют о том, что клетки в начале логарифмической фазы роста обладают наилучшей способностью адаптироваться к переводу в иммобилизованное состояние. Очевидно, что при переносе клеток с поверхности твердой питательной среды в жидкую происходит процесс адаптации микроорганизмов к новым условиям культивирования (в первую очередь, к изменению вида и содержания субстрата). При этом в клетке синтезируется набор ферментов, который, по-видимому, через 1 ч культивирования представлен белками в необходимом количестве и в активной форме, что дает возможность клеткам этого возраста лучше адаптироваться к ново-

му стрессовому воздействию, а именно, переводу их в иммобилизованное состояние.

Клеткам более позднего возраста, вероятно, необходим длительный промежуток времени для синтеза ферментов-адаптогенов. О сложности преодоления стрессового воздействия иммобилизации клетками 48-часовых культур свидетельствует образование на чашках Петри, засеянных этими микроорганизмами из среды ферментации, колоний аномальной формы: у *S. cerevisiae* появлялись колонии с неровными краями, а у *Kluyveromyces sp.* – с выростами.

Для характеристики направленности метаболизма двух видов дрожжей использовали величину дыхательного коэффициента ( $RQ$ ), рассчитываемую как отношение количества выделенного клетками  $\text{CO}_2$  к количеству поглощенного кислорода. Из литературы известно, что при величине  $RQ > 1$  в клетках преобладает процесс брожения;

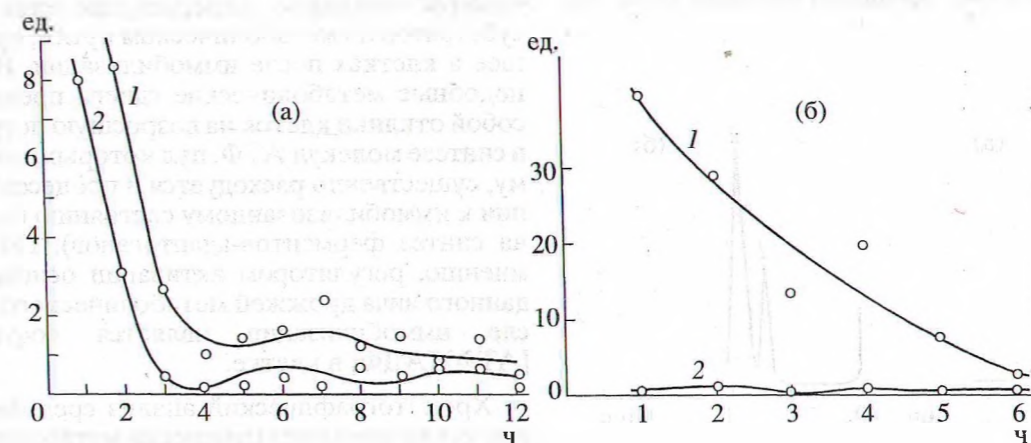


Рис. 3. Изменение дыхательного коэффициента у суспендированных (а) и иммобилизованных (б) дрожжей в ходе ферментации: 1 – *S. cerevisiae*; 2 – *Kluyveromyces sp.*

Таблица 2. Изменение активности ферментов дрожжей при иммобилизации на акрилонитриловом волокне

Вид дрожжей	Удельная активность, Е/мг				
	Алкогольдегидрогеназа	Оксидоредуктазы митохондрий			
		НАДН : ГЦФ	НАДФН : ГЦФ	НАДН : ДХФИФ	НАДФН : ДХФИФ
<i>S. cerevisiae</i>	0.32	0.020	0.020	0.260	0.300
до иммобилизации					
»	0.50	0.005	0.013	0.027	0.012
после иммобилизации					
<i>Kluveromyces</i> sp.	0.60	0	0	0.023	0.010
до иммобилизации					
после иммобилизации	0.04	0.032	0.018	0.032	0.021

при  $RQ < 0.6$  происходит потребление этанола; эндогенный метаболизм и окислительное фосфорилирование наблюдается при значениях  $RQ$  0.7–0.8 и 0.9–1.0 соответственно [20].

Наши результаты, полученные при культивировании клеток в суспензии (рис. 3а), подтверждают данные [12] о том, что у ферментирующих дрожжей *S. cerevisiae* в этих условиях преобладает бродильный тип метаболизма, а для *Kluveromyces* sp. характерны процессы окислительного фосфорилирования. После перевода клеток в иммобилизованное состояние наблюдались сдвиги метаболизма (рис. 3б), выражающиеся в увеличении производительности основного для данного типа клеток метаболического пути и снижении активности сопряженных путей. Этот вывод подтверждает результаты, полученные в ходе анализа активности клеточных ферментов (табл. 2). Так, у иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* удельная активность алкогольдегидрогеназы возросла, в то время как оксидоредуктазных ферментов митохондрий – снижалась. В иммобилизованных клетках *Kluveromyces* sp., напротив, интенсифицировались процессы дыхания (рис. 3б),

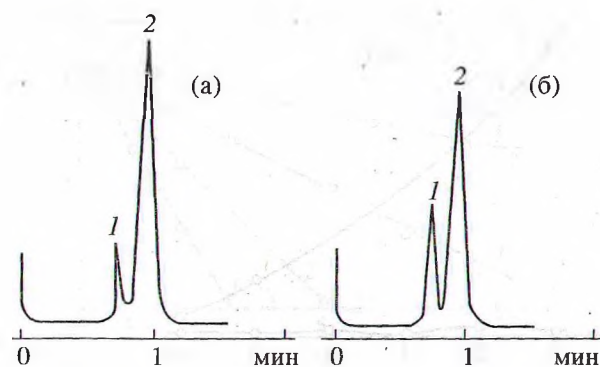


Рис. 4. Хроматограммы сред ферментации *Kluveromyces* sp.: а – клетки в суспензии; б – иммобилизованные клетки. 1 – сложный эфир; 2 – этанол.

что также подтверждается анализом ферментативной активности (табл. 2).

Биоспецифичность влияния иммобилизации на клетки, т.е. различный метаболический отклик разных биологических объектов на одинаковое воздействие, подтверждается данными исследования электрофоретической подвижности клеток до и после иммобилизации. Очевидно, помещенная при проведении микроэлектрофореза в электрическое поле клетка в результате поляризации превращается в несимметричный по заряду диполь. Таким образом, изменение ЭФП клеток свидетельствует об изменении суммарного отрицательного заряда, формируемого содержимым клетки, что отражает изменение клеточного состава в ходе метаболических процессов. Разная направленность метаболических откликов дрожжей двух видов, зарегистрированная нами, проявляется в том, что при иммобилизации ЭФП клеток *S. cerevisiae* снижалась, а *Kluveromyces* sp. – возросла (табл. 1).

Таким образом, при сравнении поведения суспендированных и иммобилизованных клеток становится очевидным перераспределение потоков субстратов по метаболическим путям, происходящее в клетках после иммобилизации. Вероятно, подобные метаболические сдвиги представляют собой отклики клеток на возросшую потребность в синтезе молекул АТФ, пул которых, по-видимому, существенно расходуется в процессах адаптации к иммобилизованному состоянию (например, на синтез ферментов-адаптогенов). По нашему мнению, регулятором активации основного для данного вида дрожжей метаболического пути после иммобилизации является соотношение  $[АТФ]/[АДФ]$  в клетке.

Хроматографический анализ сред ферментации также отражает изменения метаболизма клеток после иммобилизации. В частности, для иммобилизованных *S. cerevisiae* характерно появление в среде на 3-м часу ферментации вещества, не

обнаруживаемого в средах с суспендированными дрожжами. Предварительный хроматографический анализ, осуществленный методом присадок, позволяет предположить, что этим веществом может быть этилацетат либо близкий по химической структуре сложный эфир. При культивировании свободных клеток *Kluveromyces* sp. в средах определяется вещество (также предположительно сложный эфир), синтез которого продолжался в течение первых 10 ч ферментации при количественном выходе по отношению к спирту 1 : 5. После перевода клеток в иммобилизованное состояние указанное выше количественное соотношение изменялось на 1 : 3 (рис. 4).

Наблюдаемые изменения состава сред ферментации подтверждают наличие метаболических сдвигов в клетках после иммобилизации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Doran P.M., Bailey J.E. // Biotechnol. and Bioeng. 1986. V. 28. № 1. P. 73–87.
- Norton S., D'Amore T. // Enzym. and Microbiol. Technol. 1994. V. 16. № 5. P. 365–375.
- Galazzo J.L., Bailey J.E. // Biotechnol. and Bioeng. 1990. V. 36. № 4. P. 417–426.
- Калужный М.Я. // Микробиология. 1957. Т. 26. Вып. 3. С. 346–352.
- Hattori R. // J. Gen. Appl. Microbiol. 1972. V. 18. № 5. P. 319–327.
- Navarro J.M., Durand G. // Eur. J. Appl. Microbiol. 1977. V. 4. № 4. P. 243–254.
- Ou L.T., Alexander M. // Arch. Microbiol. 1974. V. 101. № 1. P. 35–44.
- Jirku V., Turkova J., Krumphanzl V. // Biotechnol. Lett. 1980. V. 2. № 7. P. 509–516.
- Vijjalakshmi M., Marcipar A., Segard E., Broun G.B. // Ann. NY Acad. Sci. 1979. V. 326. P. 249–254.
- Ghose T.K., Bandyopadhyay K.K. // Biotechnol. and Bioeng. 1980. V. 22. № 10. P. 2150–2162.
- Brodelius P., Deus B., Mosbach K., Zenk M.H. // FEBS Lett. 1979. V. 103. № 1. P. 93–97.
- Miller J.L. // Anal. Chem. 1959. V. 31. № 3. P. 426–428.
- Практикум по биохимии. Под ред. Северина С.Е., Соловьевой Г.А. М.: МГУ, 1989. 510 с.
- Мусил Я., Новакова О., Кунц К. // Современная биохимия в схемах. М.: Мир, 1984. С. 186.
- Уильямс У.Дж. Определение анионов. М.: Химия, 1982. С. 49.
- Духин С.С., Дерягин Б.В. // Электрофорез. М.: Наука, 1976. 328 с.
- Кузьмичева И.В., Гриц Н.В., Курченко В.П., Леонтьев В.Н. // Вестник Белгосуниверситета. 1995. Серия 2. № 1. С. 29–34.
- Современные методы в биохимии. Под ред. Ореховича В.Н. М.: Медицина, 1977. С. 57–58.
- Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. // Дрожжи. Биология. Пути использования. Киев: Наукова думка, 1991. С. 55–57.
- Бейли Дж., Оллис Д. // Основы биохимической инженерии. М.: Мир, 1989. Т. 2. С. 192.

## Effects of Immobilization on Yeast Metabolism

I. V. Kuz'micheva, V. V. Plotnikova, N. V. Grits, and V. N. Leont'ev

Belarussian State Technological University, Minsk, 220630 Belarus

Respiratory quotients and enzyme activity were determined in yeast cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluveromyces* sp., both suspended and immobilized on acrylonitril fibers. Immobilization induced changes in the cell metabolism resulting in activation of the basic metabolic pathway of the given type of yeast cells.