

Е. Н. МАКАРОВА, С. П. ОГАНЕСЯН

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В НА РАЗМНОЖЕНИЕ ДРОЖЖЕЙ

Закономерности развития микроорганизмов находятся в тесной зависимости от условий окружающей их среды.

К факторам внешней среды, влияющим на развитие микроорганизмов, относятся источники питания, химические элементы и соединения, факторы роста, температура, рН, наличие кислорода и т. д. При наличии благоприятных условий внешней среды размножение микроорганизмов происходит с максимальной скоростью [1—3].

Одним из наиболее важных условий внешней среды, необходимых для роста и размножения дрожжевых организмов, является источник азотного питания как неорганического, так и органического происхождения.

Ауксоавтотрофные дрожжевые организмы, оптимально развивающиеся при наличии только неорганических источников азота $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, (KNO_3) , довольно редко встречаются в природе. Многочисленные исследования показывают, что большинство дрожжевых организмов является ауксогетеротрофными, поэтому вопрос витаминного питания является неотделимым от вопроса азотного питания [4—6]. На примере *Torulapsis dattila* показано, что для получения максимального количества биомассы и протеина, дрожжевые организмы нуждаются в неорганической и органической формах азота в определенном соотношении [7].

Часто неорганические источники азота не могут полностью использоваться микроорганизмами из-за отсутствия витаминов. Органические же источники азота имеют то преимущество, что благодаря своей природе они одновременно могут служить как основные источники азота и как факторы роста. Например, *Torula cremoris* требует в качестве фактора роста биотин, но эта потребность сильно снижается, если в среде присутствует аспарагиновая кислота [8, 9].

По вопросу азотистого питания дрожжей в основном изучалось влияние разных источников азота на выход биомассы, на анаэробное расщепление углеводов и влияние витаминов как стимуляторов роста, а также изучалось участие витаминов, в частности, биотина, в синтезе некоторых аминокислот и органических кислот [10].

Влияние же витаминов при усвоении различных источников азота на динамику размножения дрожжевых клеток изучено недостаточно. Имеются данные о влиянии ростовых веществ и азота на почко-

вание дрожжей *T. dattila* [12], а также дрожжей рода *Saccharomyces*, которые значительно сильнее размножаются на дрожжевой воде, которая богата всевозможными ростовыми факторами, чем на среде NH_4SO_4 или аспарагином в качестве источников азота [11]. Имеются также данные о том, что штаммы *T. utilis* и *S. arborea* не требуют биотина для размножения [5, 13].

В настоящей работе приводятся данные по влиянию витаминов группы В в присутствии разных источников азота на скорость деления клеток некоторых видов дрожжей рода *Candida*.

Изучение этого вопроса проведено на среде с одним и тем же источником углерода-глюкоза, а в качестве источников азота выбраны $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, аспарагин и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{аспарагин}$.

Работа состоит из двух частей: определение оптимальных доз биотина для размножения и изучение влияния витаминов группы В при усвоении различных источников азота на размножение некоторых дрожжей рода *Candida*.

Методика исследования. Исследовались восемь видов дрожжей рода *Candida*, полученные из коллекции отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР (проф. Кудрявцев), а именно: *C. utilis* № 106; *C. Guilliermondii* № 71; *C. Guill. membranifaciens* № 72; *C. pulcherrima* № 95; *C. arborea* № 64; *C. chevalieri* № 66; *C. tropicalis* № DH-3, а также *C. pelliculosa* KC-3, полученный из Лаборатории биохимии Арм НИИЖИВ (канд. биол. наук Ш. А. Авакян).

Посевной материал готовился по методу, описанному ранее [13]: выращивание в жидкой синтетической среде без витаминов и голодание в течение 24-х час. в дистиллированной воде.

Опыты по изысканию оптимальных доз биотина для размножения *C. Guilliermondii*; *C. Guillerm. membranifaciens*, *C. tropicalis* и *C. arborea* проводились в 250 мл колбах Эрленмейера с 50 мл среды с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в качестве источника азота.

Опыты по изучению влияния витаминов и разных источников азота на скорость деления клеток проводились в 750 мл колбах Эрленмейера со 100 мл среды. В качестве источников азота брались или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ или аспарагин или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{аспарагин}$. Все вышеуказанные источники азота исследовались как одни, так и в комплексе с витаминами группы В.

Основная среда (О. С.) имела следующий состав на 1000 мл водопроводной воды: глюкоза—10 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —3,1 г. или аспарагин—3,2; KH_2PO_4 —1,23; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,625; NaCl —0,125; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —0,125.

В опытах по изысканию оптимальных доз биотина для размножения, к основной среде, содержащей $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в качестве источника азота, был прибавлен биотин в разных концентрациях $5 \cdot 10^{-10}\text{M}$, $5 \cdot 10^{-9}\text{M}$ и $5 \cdot 10^{-8}\text{M}$.

В опытах по влиянию витаминов и разных источников азота на скорость деления клеток, к 1 л основной среды была прибавлена следующая смесь витаминов: биотин—8 γ; Са-пантотенат—500 γ; фолие-

вая кислота—2,5 γ; инозит—2500 γ; никотиновая кислота—500 γ; параамино-бензойная кислота—250 γ; тиамин—500 γ; рибофлавин 250 γ; пиридоксин 500 γ*.

Все компоненты среды были очищены путем перекристаллизации. Опыты проводились при оптимальных температурах роста для каждого вида с качанием, как было описано нами раньше [13].

Посевной материал вносился в количестве 100 000—2000 000 клеток в 1 мл среды. Учет результатов проводился в логарифмическую фазу роста через каждые 2 ч. в течение 8—10 ч. методом подсчета в камере Горяева. Основными величинами, характеризующими интенсивность размножения клеток, являются: количество клеток в тысячах, в 1 мл; соотношение n/n_0 , где n —количество клеток в конце опыта, n_0 —количество клеток в начале опыта, время почкования по формуле

муле $-g = \frac{t \cdot \log 2}{\log \frac{n^2}{n_1}}$ и константа скорости почкования по формуле

$K = \frac{2,3}{t} \cdot \log \frac{n_2}{n_1}$.

1. Экспериментальные результаты по изысканию оптимальных доз биотина для размножения дрожжей приведены в табл. 1, 2 и на рис. 1.

Таблица 1

Количество дрожжей в тысячах в зависимости от разных доз биотина.
(Представлены данные двух опытов, обозначенные 1 и 2)

Культура	Биотин мол. конц.	Продолжительность опыта в часах									
		0		2		4		6		8	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
C. Guilliermondii	0	600	480	640	440	640	440	720	680	840	960
	$5 \cdot 10^{-10}$	450	400	840	360	880	560	1240	960	1280	1400
	$5 \cdot 10^{-9}$	520	600	960	560	1080	600	1400	1160	1440	1720
	$5 \cdot 10^{-8}$	490	400	920	440	1120	800	4000	2000	5000	4000
C. G. membranifaciens	0	170	260	190	260	350	270	360	280	410	500
	$5 \cdot 10^{-10}$	170	230	190	270	350	270	390	300	600	630
	$5 \cdot 10^{-9}$	190	220	220	290	470	340	600	490	1170	1000
	$5 \cdot 10^{-8}$	210	200	230	250	570	400	700	590	1540	1300
C. tropicalis	0	320	80	320	80	400	200	600	240	680	280
	$5 \cdot 10^{-10}$	360	120	360	160	360	240	640	320	720	480
	$5 \cdot 10^{-9}$	400	100	400	200	640	320	960	540	2000	900
	$5 \cdot 10^{-8}$	320	80	400	240	600	440	1080	770	3300	1100
C. arborea	0	70	170	80	190	100	200	120	300	200	400
	$5 \cdot 10^{-10}$	90	180	70	200	90	300	130	470	350	700
	$5 \cdot 10^{-9}$	70	170	100	180	130	340	140	530	450	900
	$5 \cdot 10^{-8}$	80	190	90	170	140	400	300	800	1000	1400

М. А. Тер-Карапетян и Е. Н. Макарова—не опубликованные данные.

Таблица 2

Скорость деления дрожжевых клеток в минутах в зависимости
от разных доз биотина

Культура	Молярная концентрация биотина				Ускорение почкования*
	0	$5 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-8}$	
<i>C. Guilliermondii</i>	706	242,6	127	65,3	10,8
<i>C. G. membranifaciens</i>	2960	768	340	105	28,1
<i>C. tropicalis</i>	372,3	144	113	74,4	5,0
<i>C. arborea</i>	456	226	71,2	69	6,6

* Пересчитано по соотношению: время деления без биотина ко времени деления с оптимальным количеством биотина.

Из данных табл. 1, 2 и рис. 1 следует, что при культивировании в среде без биотина, дрожжи в течение длительного времени не размножаются. Лаг-фаза в этих условиях продолжается более 4 ч. и только к 6 ч. имеет место некоторое увеличение числа клеток.

Но уже в присутствии незначительной концентрации биотина ($5 \cdot 10^{-10}$ М) скорость размножения резко возрастает. Лаг-фазу не удалось уловить вообще, так как через 2 ч. количество клеток в культуре возрастает вдвое. То же самое можно сказать и для более высоких концентраций биотина в среде, а именно $5 \cdot 10^{-9}$ и $5 \cdot 10^{-8}$ М.

Следует отметить, что биотин наиболее сильно влияет на размножение *C. guill. membranifaciens*. Клетки этого организма без биотина совершают свое деление через 2960 мин., т. е. фактически не размножаются; при наличии же в среде биотина размножение увеличивается пропорционально концентрации биотина в среде. Самая высокая скорость размножения у *C. Guill. membranifaciens* так же, как и у *C. Guilliermondii* и *C. tropicalis*, имела место при наличии $5 \cdot 10^{-8}$ М биотина в среде.

У *C. arborea* максимум скорости деления наблюдался при наличии $5 \cdot 10^{-9}$ М биотина, увеличение концентрации биотина в среде фактически не увеличивало скорость деления клеток.

2. Экспериментальные результаты по влиянию витаминов группы В и источников азота на скорость почкования дрожжей приведены в табл. 3 и 4 и на рис. 2.

Из табл. 3, 4 и рис. 2 видно, что имеется тесная взаимосвязь между источниками азотистого питания, витаминами и скоростью почкования клеток.

При усвоении аммиачного азота в большинстве случаев скорость почкования ниже, чем с аспарагином, как, например, у *C. pulcherrima*, *C. Guilliermondii*; *C. Guill. membranifaciens* и *C. arborea*.

У *C. pelliculosa*, *C. tropicalis* и *C. utilis* скорость почкования одинакова как с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, так и с аспарагином, у *C. chevalieri* наблюдается то же самое.

Таблица 3
Время почкования дрожжей в минутах в зависимости
от витаминов и источников азота

Культура	№ опыта	NH ₄ ⁺		Аспарагин		NH ₄ ⁺ + аспарагин	
		О. С.	О. С. + смесь витаминов	О. С.	О. С. + смесь витаминов	О. С.	О. С. + смесь витаминов
C. utilis	1	116	64	113	55,0	144	55,0
	2	196	54,3	177	62,0	160	67,0
C. Guilliermondii	1	120	75,6	94,9	76,0	125	70
	2	120	75,6	78,0	55,0	119	62,8
C. Guilliermondii membranifaciens	1	80,0	60,0	60,0	39,0	60,0	37,0
	2	132	90,8	132	66,0	81,0	43,1
C. pulcherrima	1	177	154	95,0	96,0	71,8	90,8
	2	141	107	95,6	88,0	71,0	71,0
C. chevalieri	1	73,0	76,0	91,0	91,0	91,0	78,0
	2	75,7	75,7	69,0	69,0	75,0	68,0
C. arborea	1	120	76,0	76,0	76,0	76,0	76,0
	2	119,9	84,8	75,7	95,0	95,0	90,7
C. tropicalis	1	163	91,0	163	91,0	163	91,0
	2	176,9	90,8	120	107,6	132	77,7
C. pelliculosa	1	72,0	70,0	69,0	63,0	69,0	63,0
	2	73,7	65,3	84,8	70,6	77,8	57,2

Таблица 4
Константы скорости почкования дрожжей рода Candida в зависимости
от витаминов и источников азота
Данные таблицы выражают — К · 10³

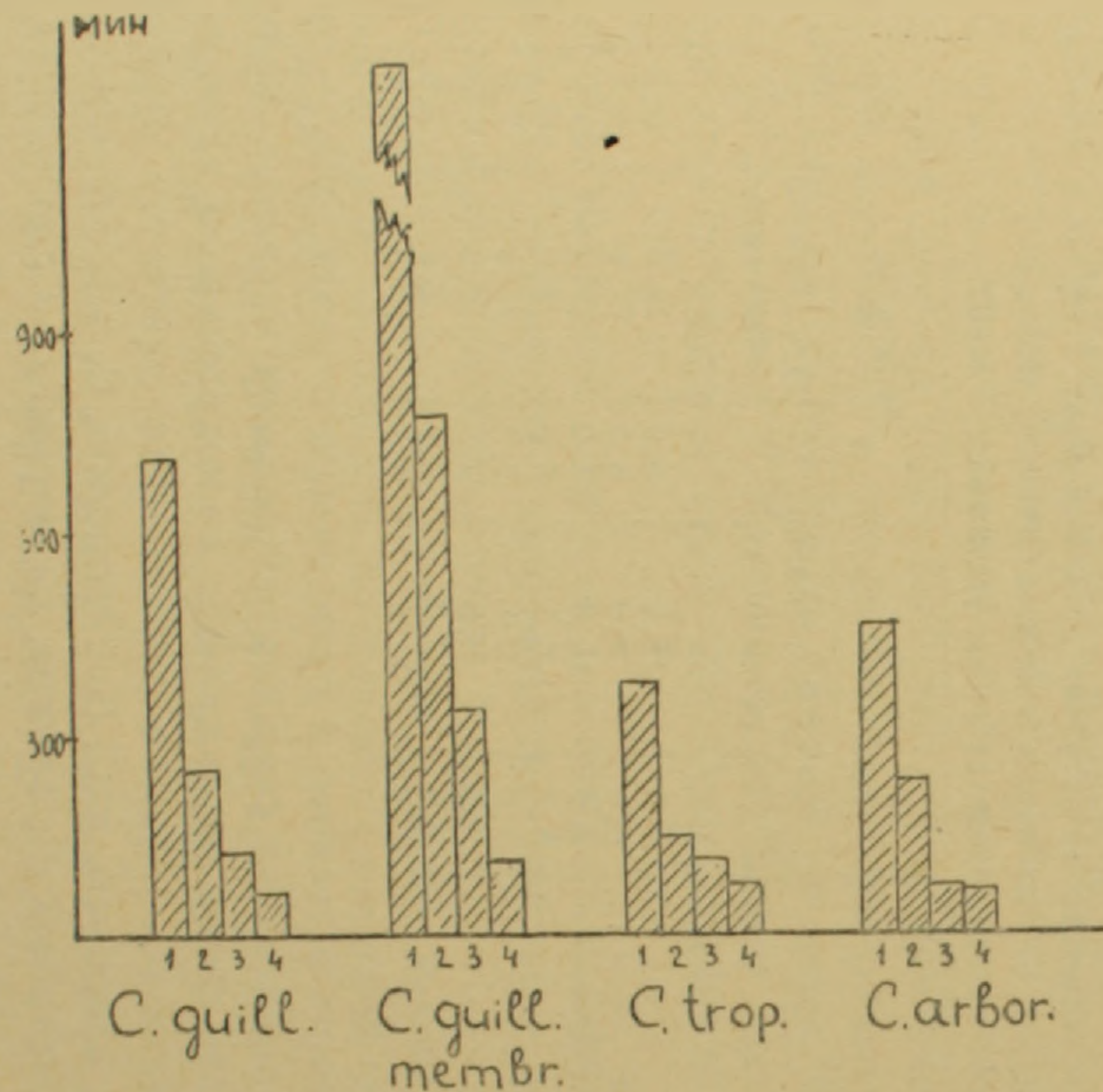
Культура	NH ₄ ⁺		Аспарагин		NH ₄ ⁺ + аспар.	
	О. С.	О. С. + смесь витаминов	О. С.	О. С. + смесь витаминов	О. С.	О. С. + смесь витаминов
C. utilis	5,6	11,2	6,0	12,0	3,5	12,0
C. Guilliermondii	6,6	9,0	8,5	12,0	9,0	12,0
C. G. membranifaciens	9,0	11,0	11,0	18,4	11,0	19,4
C. pulcherrima	5,1	6,7	7,6	8,9	10,1	10,1
C. chevalieri	9,9	9,5	7,9	7,9	7,9	9,5
C. arborea	5,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
C. tropicalis	2,9	7,9	2,9	7,9	2,9	7,9
C. pelliculosa	9,8	11,0	8,5	10,0	9,4	12,6

Смесь неорганического и органического азота (NH₄ + аспарагин) действует по-разному на скорость почкования у разных видов. В одних случаях эта смесь не оказывает положительного влияния на скорость почкования (C. utilis); в других — она действует наподобие аспарагина, как, например, у C. Guilliermondii, C. Guilliermondii membranifaciens, C. chevalieri, C. arborea, C. tropicalis, C. pelliculosa. У Candida pulcherrima NH₄⁺ + аспарагин усиливает скорость почкования по сравнению с (NH₄)₂SO₄ и аспарагином взятым в отдельности.

Витамины группы В за редким исключением повышают скорость почкования, особенно с (NH₄)₂SO₄ в качестве единственного источника

Известия XVI, № 3—4

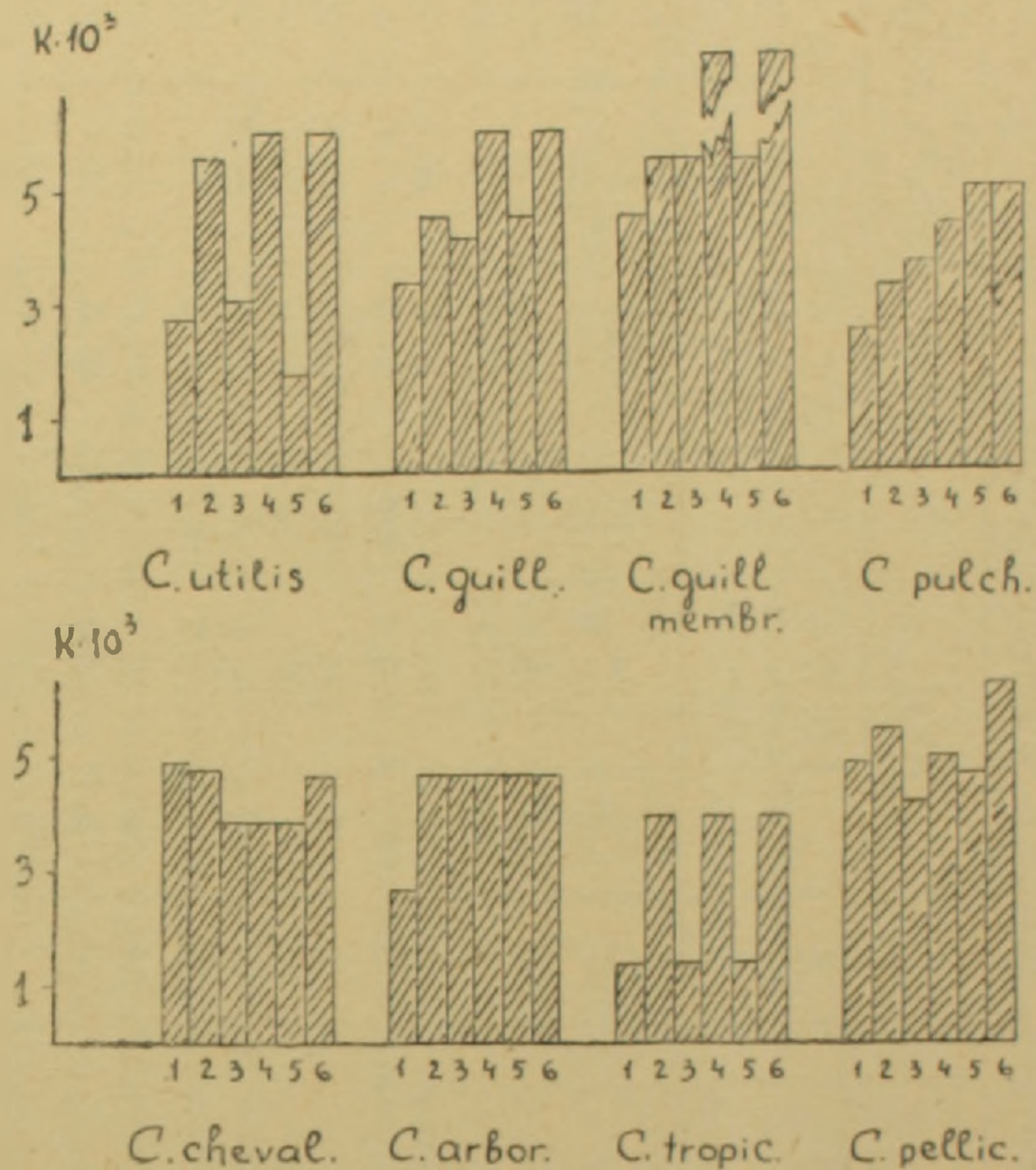
Скорость деления клеток /в мин/



1 - 0γ; 2 - 0,1γ; 3 - 1,0γ; 4 - 8,0γ;
 Рис. 1.

Рис. 1.

Константы скорости почкования



Условные обозначения.

1. NH₄⁺ 3. Asp. 5. NH₄⁺ · Asp.
 2. NH₄⁺ · B 4. Asp · B 6. NH₄⁺ · Asp · B

Рис. 2.

ка азота (*C. utilis*; *C. Guilliermondii*, *C. Guill. membranifaciens* частично *C. pulcherrima*, *C. arborea* и *C. tropicalis*).

С аспарагином в качестве единственного источника азота витамины действуют также как с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на те же виды, за исключением *C. arborea* и частично *C. pulcherrima*, у которых аспарагин действует равносильно витаминам.

С $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + аспарагин в качестве источника азота витамины ускоряют размножение *C. utilis*, *C. Guilliermondii*, *C. Guilliermondii membranifaciens*, *C. tropicalis*; у *C. arborea* смесь неорганического и органического азота, так же как и один органический азот-аспарагин полностью заменяет витамины.

У *C. pulcherrima* смесь NH_4^+ + аспарагин также полностью заменяет витамины, тогда как один аспарагин только частично.

C. chevallieri не требует витаминов в готовом виде для размножения, у него NH_4 обеспечивает размножение клеток в той же степени и даже лучше, чем аспарагин.

В ы в о д ы

1. Изучено влияние различных доз биотина на скорость размножения разных видов дрожжей рода *Candida*. Установлено, что разные дозы биотина оказывают разные степени стимуляции на разные культуры. Биотин в концентрации $5 \cdot 10^{-10}$ М стимулирует размножение *C. Guilliermondii*, *C. Guilliermondii membranifaciens*, *C. arborea* и *C. tropicalis*. Биотин в концентрации $5 \cdot 10^{-8}$ М стимулирует размножение всех изученных видов, однако у *C. arborea* скорость размножения с $5 \cdot 10^{-8}$ М биотина не превышает таковую с $5 \cdot 10^{-9}$ М биотина.

2. Имеется тесная взаимосвязь между источниками азота и витаминами и скоростью почкования клеток. В среде без витаминов у всех дрожжевых организмов, кроме *C. chevallieri* замечена продолжительная лаг-фаза (около 4—5 ч.) и размножение очень слабое имеет место только к 5 ч. роста. Наоборот, в присутствии витаминов лаг-фаза сокращается и уже через 2 ч. количество клеток сильно возрастает, независимо от источника азота.

У *C. pelliculosa*, *C. Guilliermondii*, *C. Guill. membranifaciens* и частично у *C. pulcherrima* органический азот ускоряет размножение, витамины же в свою очередь ускоряют еще больше.

У *C. utilis* сочетание неорганического и органического азота не влияют на скорость почкования, последнюю усиливают только витамины.

У *C. arborea* аспарагин полностью заменяет витамины, необходимые для быстрого размножения.

C. chevallieri является ауксоавтотрофным, поскольку витамины не усиливают скорость почкования.

Научно-исследовательский институт животноводства
и ветеринарии МП и ЗСХП АрмССР и Институт

Микробиологии АН АрмССР

Поступило 20.VIII 1962 г.

Ե. Ն. ՄԱԿԱՐՈՎԱ, Ս. Պ. ՆՈՎԶԱՆԵՐՍԱՆ

B ԽՄԲԻ ՎԻՏԱՄԻՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՆԿԵՐԻ ԲԱԶՄԱՑՄԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Միկրոօրգանիզմների դարգացման օրինաչափությունները մեծապես կախված են նրանց շրջապատող միջավայրի պայմաններից: Արտաքին միջավայրի կարևորագույն պայմաններից մեկը, որն անհրաժեշտ է սնկերի աճման ու բազմացման համար, հանդիսանում է ազոտային սննդի աղբյուրը:

Այս աշխատությունում տվյալներ են բերվում *Candida* ցեղի մի քանի տեսակների բաժանման արագությունը վրա B խմբի վիտամինների ազդեցության մասին՝ ազոտային տարրեր աղբյուրների յուրացման դեպքում:

Աշխատությունը բաղկացած է երկու մասից: Բազմացման համար անհրաժեշտ է բիոտինի օպտիմում կոնցենտրացիայի որոշումը, որը ներկայացված է աղյուսակներ 1-ում և 2-ում և նկ. 1-ում, և B խմբի վիտամինների ազդեցության ուսումնասիրությունը ազոտի տարրեր աղբյուրների յուրացման պայմաններում *Candida* ցեղի սնկերի տարրեր խմբերի բազմացման ժամանակ: Արդյունքները ներկայացված են աղյուսակներ 3-ում ու 4-ում և նկ. 2-ում:

Նկարների և աղյուսակների տվյալներից կարելի է անել հետևյալ եզրակացությունները.

1. Բիոտինը $5 \cdot 10^{-10}$ M կոնցենտրացիայով միջավայրում խթանում է *C. guilliermondii*; *C. guill. membranifaciens*; *C. arborea* և *C. tropicalis* տեսակների բազմացումը: Բիոտինը $5 \cdot 10^{-8}$ M կոնցենտրացիայով միջավայրում խիստ խթանում է բոլոր ուսումնասիրված տեսակների բազմացումը, սակայն *C. arborea*-ի մոտ բազմացման արագությունը չի բարձրանում $5 \cdot 10^{-10}$ M բիոտինից:

2. Գոյություն ունի սերտ փոխադարձ կապ ազոտի աղբյուրների վիտամինների և բջիջների բողբոջման արագության միջև:

Առանց վիտամինի միջավայրում, բոլոր սնկերի մոտ, բացի *C. chevalieri*-ից, նկատվում է երկարատև լագ-ֆազա (մոտ 4—5 ժամ), և բազմացումը, որը շատ թույլ է, սկսվում է միայն աճման վեցերորդ ժամում: Ընդհակառակը, վիտամինի առկայության դեպքում լագ-ֆազան կարճ է, երկու ժամից հետո բջիջների քանակը խիստ բարձրանում է՝ անկախ ազոտի աղբյուրից: *C. pelliculosa*; *C. guilliermondii*; *C. guilliermondii membranifaciens* տեսակների և մասամբ *C. pulcherrima*-ի մոտ օրգանական ազոտը արագացնում է բազմացումը, իսկ վիտամինները իրենց հերթին էլ ավելի են խթանում բազմացման պրոցեսը: *C. utilis*-ի մոտ անօրգանական և օրգանական ազոտի զուգակցումը չի ազդում բողբոջման արագության վրա, վերջինիս վրա ազդում են միայն թիամինը: *C. arborea*-ի մոտ առավարադինը լրիվ փոխարինում է վիտամինին, որն անհրաժեշտ է արագ բազմացման համար: *C. chevalieri*-ն հանդիսանում է աուքսո-ափառորոֆ, քանի որ նրա մոտ վիտամինները չեն ուժեղացնում բողբոջման արագությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. R. E. Buchanan and E. I. Fulmer. Physiology and Biochemistry of bacteria, T. I, 1930.
2. I. R. Porter. Bacteriae chemistry and physiology, 1947.
3. A. H. Cook. The chemistry and biology of yeasts, 1958.
4. P. B. Burkholder, I. Mc. Veigh and D. Moyer, J. Bacteriology 48, 385, 1944.
5. Е. Н. Одинцова. Микробиологические методы определения витаминов. Москва, 1959.
6. Н. Д. Иерусалимский. Азотное и витаминное питание микробов. Москва, 1949.
7. М. А. Тер-Карапетян, Г. С. Арутюнян, С. Л. Мхигарян. ДАН АрмССР, т. 25, 5, 1957.
8. W. Shive, L. L. Rodgers J. Biol. Chem., 169, 2, 453, 1947.
9. J. Stokes, A. Larsen, T. Gunness, J. Biol. Chem. 167, 2, 613, 1947.
10. H. Lardy, J. Biol. chem. 169, 2, 451, 1947.
11. И. П. Захаров, С. А. Коновалов, Ф. М. Кинзбурская, Микробиология, т. 7, 5, 1938.
12. М. А. Тер-Карапетян, Ш. А. Авакян, Г. С. Арутюнян, ДАН АрмССР, 5, 1949.
13. Е. Н. Макарова. Известия АН АрмССР (биол. наук), т. XVI, 1, 1963.