

РОЛЬ ζ -ПОТЕНЦИАЛА, ЖИРНЫХ КИСЛОТ И СУБМИКРОННЫХ КАПЕЛЬ n-АЛКАНОВ В МЕХАНИЗМЕ ТРАНСПОРТА СУБСТРАТА В КЛЕТКИ АЛКАНУТИЛИЗИРУЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ

П. Г. ГАНИН*, Е. В. КОМАРОВ**

**Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, 197376, Санкт-Петербург, Россия*

***Научно-исследовательский технологический институт антибиотиков и ферментов медицинского назначения, 198020, Санкт-Петербург, Россия*

Исследование посвящено уточнению причин доминирующей роли субмикронных капель субстрата в процессе роста дрожжей на n-алканах. На модельных системах культуральной жидкости алканутилизирующих дрожжей исследован ζ -потенциал капель n-алканов, сформированный жирными кислотами. Установлено, что ζ -потенциал субмикронных капель способен препятствовать коагуляции с клетками, обладающими высоким ζ -потенциалом. Связь ζ -потенциала клеток с их физиологическим состоянием позволяет предполагать возможность регулирования транспорта субстрата из субмикронных капель.

Զետապոտնոթյունը նվիրված է n-ալկանների վրա շաքարասնկերի աճի պրոցեսում սուբստրատի սուբմիկրոնային կաթիլների գերիշխող դերի պատճառների ճշտմանը: Զետապոտնոթյունը է ճարաաթթուների կողմից առաջացող n-ալկանների կաթիլների ζ -պոտենցիալը: Ալկանյուրացնող շաքարասնկերի կուլտուրալ հեղուկի մոդելային համակարգերի վրա: Պարզվել է, որ սուբմիկրոնյան կաթիլների ζ -պոտենցիալը ընդունակ է խոչընդոտել կոագուլյացիան բարձր ζ -պոտենցիալ ունեցող բջիջների հետ: Բջիջների ζ -պոտենցիալի կապը նրանց ֆիզիոլոգիական վիճակի հետ թույլ է տալիս ենթադրել սուբմիկրոնային կաթիլներից սուբստրատի տրանսպորտի կարգավորման հնարավորությունը:

The study is dedicated to clarifying of predominate role of substrate submicron droplets in the yeast grown on n-alkanes. ζ -Potential of fatty acids formed n-alkane droplets is investigated for model systems of the alkane-utilizing yeast cultural medium. ζ -Potential of submicron droplets able to prevent coagulation with high ζ -potential cells in shown. Correlation between cell ζ -potential and physiological state allows to propose the possibility of substrate transport controlling from submicron droplets.

ζ -потенциал - жирные кислоты - коагуляция - n-алканы нефти - дрожжи - механизм транспорта

Концентрационная зависимость субстратзависимых процессов при глубинных условиях развития микроорганизмов на жидких гидрофобных органических соединениях, ввиду их нерастворимости в воде, имеет выраженную специфику. Ключевым элементом в понимании процессов развития микроорганизмов на таких соединениях является установление механизма транспорта субстрата в клетку. Таким типичным гидрофобным субстратом являются n-алканы нефти. Многие виды дрожжей рода *Candida*, *Torulopsis* и *Rhodotorula* способны утилизировать n-алканы и использовать их в качестве единственного источника углерода и энергии [3].

Для жидких n-алканов предполагаются различные механизмы транспорта в клетки дрожжей [18]. Специфика процессов затрудняет его

прямую экспериментальную проверку, и среди исследователей нет на этот счёт единого мнения [4]. В большинстве работ о механизме транспорта *n*-алканов судят по косвенным данным, в первую очередь - по скорости роста микроорганизмов, предполагая лимитирующей стадией - скорость его поступления в клетку. Представление о эффективной концентрации *n*-алканов через величину поверхности раздела фаз субстрат-среда достаточно близко, хотя не в полной мере соответствует экспериментальным данным. Выявлена доминирующая роль субмикронных капель *n*-алканов в обеспечении роста дрожжей, что содержит определенное противоречие между представлениями о механизме транспорта субстрата и субстратной зависимостью роста. Этот феномен неоднозначно трактуется исследователями [8, 16, 17, 19].

В процессе развития дрожжей на жидких *n*-алканах в культуральной среде накапливаются продукты неполного окисления субстрата (жирные кислоты и спирты), обладающие свойствами поверхностно активных веществ (ПАВ). Интенсивному росту дрожжей предшествуют максимальное накопление биогенных ПАВ (жирных кислот - 50-200 мг/л), формирование мелкодисперсной устойчивой эмульсии, солюбелизация субстрата [13]. Добавление в культуральную среду каталитических концентраций жирных кислот (50-200 мг/л) оказывает выраженное ростстимулирующее действие [2]. В рамках существующих представлений положительное влияние жирных кислот, субмикронных капель субстрата, интенсивности механического перемешивания среды рассматриваются как факторы, повышающие доступность *n*-алканов клеткам микроорганизмов. Однако добавление жирных спиртов практически не улучшает ростовых показателей [2].

Широко известно ингибирование роста дрожжей повышенными концентрациями "традиционных" для микроорганизмов субстратов. Это связано с тем, что, как правило, у микроорганизмов нет выраженного "ростового контроля" в потреблении энергосодержащего субстрата [7]. Угнетение роста дрожжей имеет место и повышенными концентрациями *n*-алканов [1], что в рамках принятого формализма можно связать с увеличением среднего размера капель субстрата.

При развитии микроорганизмов на *n*-алканах различают три группы клеток: адсорбированные на крупных каплях субстрата, сорбирующие на своей поверхности мелкие капли и неконтактирующие с каплями клетки. Выраженная гетерогенность культуральной среды свидетельствует о различной обеспеченности клеток субстратом. Высокое сорбционное сродство дрожжевых клеток к *n*-алканам (неэмульгированных ПАВ), поступление которого происходит пассивнодиффузионным путем [5], а насыщение достигается достаточно быстро [15], допускает возможность ингибирования роста части клеток популяции. В этой связи, ростстимулирующее влияние различных факторов необходимо проанализировать и с точки зрения ограничения поступления *n*-алканов.

Динамика адсорбционных свойств дрожжевых клеток и влияние жирных кислот на адсорбционные свойства капель *n*-алканов могут быть

определяющими в регулировании контактных взаимоотношений клеток с каплями n-алканов и в процессе транспорта субстрата. Известно, что ζ -потенциал дрожжевых клеток изменяется в широких пределах в зависимости от скорости роста культуры [12]. Это предполагает связь ζ -потенциала с физиологическим состоянием клеток, фазой клеточного цикла и потребностью в субстрате. Клетки с высоким (по абсолютной величине) ζ -потенциалом (от -35 до -55 мВ) не образуют агрегатов между собой, с воздушными пузырями и каплями n-алканов [10]. ζ -Потенциал капель и воздушных пузырей и роль жирных кислот в работе не изучены. В исследованиях, посвящённых изучению механизма транспорта n-алканов в клетки микроорганизмов, влиянию ПАВ на транспорт субстрата и ростовые показатели, не рассматривается влияние ПАВ на адсорбционные свойства капель субстрата. Мы предположили, что особая роль субмикронных капель n-алканов может состоять в их достаточно высоком $|\zeta|$ -потенциале, сформированном жирными кислотами, позволяющем ограничивать адсорбцию капля-клетка и поступление субстрата в клетки.

Целью настоящей работы являлись определение ζ -потенциала капель n-алканов в системе, моделирующей условия развития алканутилизирующих дрожжей, а также теоретическая оценка роли ζ -потенциала и жирных кислот в ограничении адсорбции субмикронных капель субстрата клетками.

Материал и методика. Объектом исследования служила система, моделирующая состав культуральной среды и условия выращивания дрожжей на n-алканах. Минеральный состав среды (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3.5; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - 0.8; KCl - 0.5; MgSO_4 - 0.25; микроэлементы (мг/л): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 12.5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 12.5; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 12.5. В различных модельных системах в среду добавляли: n-алканы (гексадекан) - 5 и 20 г/л; жирные кислоты: пальмитиловую - 0.1 и каприновую - 0.2 г/л. В экспериментах использовали водопроводную воду, pH среды раствором 1M HCl доводили до 4.0. Моделирование условий культивирования дрожжей осуществляли в лабораторном ферментаторе "BIOSTATE" ("V. Braun", Германия) объёмом 5 л, коэффициент заполнения 0.5. Интенсивность вращения $\omega=500$ об/мин (два яруса, 6 лопастей каждый). Принудительной аэрации не производили. Температура среды $T=32^\circ\text{C}$.

Размер капель эмульсии определяли визуально в поле зрения оптического микроскопа с помощью микролинейки. ζ -Потенциал капель рассчитывали по данным их электрофоретической подвижности в миниатюрной электрофоретической ячейке, помещённой в поле зрения оптического микроскопа [12]. Агар-агар для электрофоретической ячейки готовили на основе электролита модельной системы (без n-алканов и жирных кислот).

Экспериментальные данные подвергали общепринятой статистической обработке [9]. Математическую обработку, подбор эмпирических коэффициентов (по наименьшему среднеквадратичному отклонению от экспериментальных значений) и графические построения производили с помощью персонального компьютера и программы Microsoft Excel (5.0).

Результаты и обсуждение. Модельные системы 1 (рис. 1.1, табл. 1 №1) и 2 (рис. 1.2, табл. 1 №2) по содержанию гексадекана и жирных кислот соответствуют составу культуральной жидкости в экспоненциальной фазе роста и в начале периодического культивирования при добавлении жирных кислот в ростстимулирующей концентрации соответственно. Как следует из представленных экспериментальных данных, ζ -потенциал капель проявлял выраженную зависимость от их размера (рис. 1). Такой характер зависимости обусловлен следующим. Механическое перемешивание определяет диспергирование жидких n-алканов в среде. Из термоди-

намических соображений ясно, что химический потенциал n -алканов в каплях различного размера возрастает с уменьшением их диаметра. Эта зависимость описывается уравнением Томсона-Кельвина:

$$\mu_i^r - \mu_i^o = 2\sigma v / r, \quad (1)$$

где μ_i^r и μ_i^o - значения химического потенциала i -того вещества у плоской поверхности и у поверхности с радиусом кривизны r соответственно; σ - поверхностное натяжение на границе раздела фаз; v - парциальный мольный объём вещества; r - радиус капли (радиус кривизны поверхности раздела фаз).

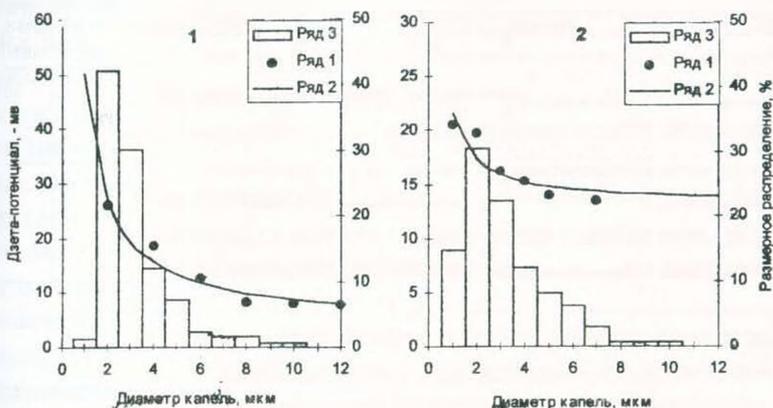


Рис. 1. Зависимость z-потенциала капель эмульсии от диаметра и размерное распределение капель для различных модельных систем. Параметры модельных систем приведены в таблице. 1 - экспериментальное значение ζ -потенциала для соответствующего интервала размеров, мВ; 2 - кривая $\zeta=f(d)$ аппроксимирующая экспериментальные значения по уравнению 2, мВ; 3 - размерное распределение капель, %.

Стремление системы к равенству интенсивных параметров ее элементов будет обуславливать соответствующее распределение ПАВ на границе раздела фаз. Наличие в системе ПАВ ионогенной природы приведет к стремлению скомпенсировать различия химического потенциала за счет электрохимической составляющей, следовательно, - различию ζ -потенциалов капель разного размера.

Экспериментальные данные зависимости ζ -потенциала капель от их диаметра (d) удовлетворительно описывались эмпирическим уравнением:

$$\zeta(d) = a + b/d, \quad (2)$$

где $\zeta(d)$ - ζ -потенциала капли диаметром d , мВ; a , мВ и b , мВ · мкм - эмпирические коэффициенты; d - диаметр капли, мкм.

Физический смысл коэффициента a - ζ -потенциал плоской поверхности ($d \rightarrow \infty$) раздела фаз n -алканы - водная среда. Второй член правой части уравнения 2 (с коэффициентом b) отражает влияние кривизны поверхности раздела фаз на величину ζ -потенциала. Эмпирические коэффициенты a и b (табл. 1) проявляли зависимость от параметров модельных систем (компонентного состава среды).

Удовлетворительное аналитическое описание экспериментальных данных и термодинамические соображения позволяют полагать сохранение

тенденции повышения ζ -потенциала с уменьшением размера частиц в интересующей области $d < 1$ мкм, роль которых в обеспечении роста дрожжей доминирует. Это также позволяет аналитически оценить величину ζ -потенциала капель в области ($d < 0.5$ -1 мкм), технически нам недоступной для прямой экспериментальной проверки. Отметим известное ограничение: ζ -потенциал не может превышать предельного значения, оцениваемого ± 120 мВ [11].

Таблица 1. Основные параметры модельных систем

№	Содержание органических соединений		Значения эмпирических коэффициентов		Расчетное значение z-потенциала (для d, мкм)	
	алканы, г/л	жирные кислоты, г/л	a, -мВ	b, -мВ мкм	(d=0.5) -мВ	(d=0.1) -мВ
1	5.0	0.1	4.21	45.9	96	463
2	20	пальмитиловая каприновая	13.1	8.47	30	(125)* 98

Примечание: ожидаемые значения с учетом указанного ограничения.

Известно, что кинетическая устойчивость коллоидов в основном обуславливается ζ -потенциалом частиц и адсорбционно-сольватным барьером. Благодаря взаимосвязи адсорбционно-сольватного барьера с ζ -потенциалом оценка коагуляционной устойчивости может ограничиваться рассмотрением пороговой величины ζ -потенциала [6, 11]. Для эмульсий типа вода-масло пороговая величина ζ -потенциала (минимальное значение, достаточное для превышения сил электростатического отталкивания над силами молекулярного притяжения) идентичных частиц близка к 30 мВ [11].

В рассматриваемом нами случае частицы разнородны: капли n-алканов и клетки дрожжей различаются по размерам и величине ζ -потенциала. Оценка их устойчивости должна базироваться на теории гетерокоагуляции. Энергия ионно-электростатического отталкивания взаимодействующих частиц может быть рассчитана на основании приближенного уравнения, предложенного Фюрстенау [6, 14]:

$$V_1^s = \frac{\epsilon a_1 a_2 (\psi_{\delta_1}^2 + \psi_{\delta_2}^2)}{4(a_1 + a_2)} \left[\frac{2\psi_{\delta_1} \psi_{\delta_2}}{\psi_{\delta_1}^2 + \psi_{\delta_2}^2} \ln \frac{1 + \exp(-\chi h)}{1 - \exp(-\chi h)} + \ln[1 - \exp(-2\chi h)] \right], \quad (3)$$

где ϵ - диэлектрическая постоянная среды; a_1, a_2 - диаметры частиц; $\psi_{\delta_1}, \psi_{\delta_2}$ - потенциал диффузной части двойного слоя частиц; χ - величина, обратная толщине дебаевской ионной атмосферы; h - расстояние между поверхностями частиц.

Использованное приближение состоит из первых двух членов разложения в ряд функции $V_1^s(h)$. Как отмечают авторы, при рассмотрении частиц, радиус которых значительно превосходит толщину диффузного

слоя, и при относительно низких значениях потенциала ψ_s отклонение значений от расчетных по точной формуле не превышает 10%, если $\psi_{s1}, \psi_{s2} < 75$ мВ.

Толщина дебаевской ионной атмосферы оценивается $3-5 \cdot 10^{-2}$ мкм [11], размер дрожжевых клеток составляет 3-8 мкм. В практических расчетах допускается использование значения ζ -потенциала, поддающееся прямому экспериментальному определению, вместо величины ψ_s [11]. Таким образом, приближенное уравнение в пределах отмеченных отклонений может быть использовано для оценки коагуляции капель размером $d > 0.1$ с клетками дрожжей.

На рис. 2 представлена граница и зона кинетической устойчивости микрообъектов к гетерокоагуляции, построенная на основе уравнения (3) с учетом порога кинетической устойчивости (30 мВ) идентичных частиц для системы типа вода-масло и равенства $h_k = 1/\chi_k$ - соответствующего граничному условию быстрой коагуляции [11]. Представленные экспериментальные данные зависимости $\zeta(d)$ капель эмульсии n-алканов модельных систем культуральной жидкости, интервал изменения ζ -потенциала дрожжевых клеток (от -10 до -55 мВ [10]) и аналитическая оценка порога гетерокоагуляции свидетельствуют о кинетической устойчивости к коагуляции дрожжевых клеток, обладающих высоким (по абсолютной величине) $|\zeta|$ -потенциалом с субмикронными каплями n-алканов.

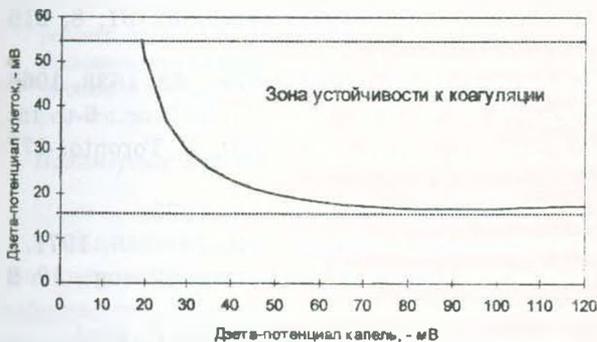


Рис. 2. Кинетическая устойчивость к гетерокоагуляции дрожжевых клеток и эмульгированных жирными кислотами капель n-алканов в зависимости от их ζ -потенциала. Прерывистой линией обозначен интервал изменения ζ -потенциала клеток. Сплошная кривая — теоретический порог гетерокоагуляции, построенный по уравнению 3.

n-алканов за счет увеличения поверхности раздела фаз субстрат-среда (вследствие понижения поверхностного натяжения среды жирными кислотами), оценена возможность ограничения поступления субстрата в клетку.

Таким образом, доминирующая роль субмикронных капель n-алканов в обеспечении роста дрожжей может заключаться в их достаточно высоком $|\zeta|$ -потенциале, позволяющем микроорганизмам проявлять физиологический контроль над поступлением субстрата, изменением ζ -потенциала индивидуальных клеток.

Разделяя точку зрения большинства исследователей о контактном механизме транспорта жидких n-алканов в клетки микроорганизмов, предполагающем образование аддукта капля-клетка, мы предположили проявление двойкой регуляторной роли жирных кислот в этом процессе. Помимо повышения эффективной концентрации

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гарбалинский В. А., Винаров А. Ю., Волох В. Я.* Прикл. биохим. микробиол., 12, 6, 850-854, 1976.
2. *Гололобов А. Д., Давидов Е. Р., Разумов О. Б., Рачинский В. В.* Прикл. биохим. микробиол., 5, 3, 245-251, 1969.
3. *Градова Н. Б., Диканская Э. М., Михалева В.В.* Использование углеводов дрожжами. М.: ОНТИТЭИмикробиопром, 120, 1971.
4. *Давидова Е. Г., Рачинский В. В.* Успехи современной биологии, 88, 2(5), 198-209, 1979.
5. *Давидова Е. Г., Рачинский В. В., Сиушева А. Г.* Известия ТСХА, 2, 17-23, 1977.
6. *Зонтаг Г., Штрэнге К.* Коагуляция и устойчивость дисперсных систем. 152, Л., 1973.
7. *Иванов В. Н.* Энергетика роста микроорганизмов. 140, Киев, 1981.
8. *Кафаров В. В., Винаров Ф. Ю., Гордеев Л. С.* Моделирование биохимических реакторов. 344, М., 1979.
9. *Румшинский Л. С.* Математическая обработка результатов эксперимента. 15, М., 1971.
10. *Фомченко И. В., Шкоп Я. Я., Цвид Е. Е.* Прикл. биохим. микробиол., 23, 4, 486-490, 1987.
11. *Фридрихсберг Д. А.* Курс коллоидной химии. Л., 1984.
12. *Цвид Е. Е., Шкоп Я. Я., Позмогова И. Н., Шульговская Е. М.* Микробиология, 50, 4, 659-664, 1981.
13. *Goma G., Parailleux A., Durang G. J.* Ferment. Technol., 51, 8, 616-618, 1973.
14. *Hogg R., Healy T. W., Fuerstenau D. W.* Faraday Soc., 62, 1638, 1966.
15. *Kappeli Q., Fiecher A., Finneriy W. R.* Adv. Biotechnol. Proc.: 6-th Int. Ferment. Symp., London (Canada), 20-25 July 1980, 1, Toronto, 177-182, 1981.
16. *Moo-Young M.* Canad. J. Chem. Eng., 53, 113-118, 1975.
17. *Moo-Young M., Shimizu T.* Biotechnol. Bioeng., 13, 761-778. 1971.
18. *Nakahara T., Erickson L. E., Gutierrez J. R.* Biotechnol. Bioeng., 19, 9-25, 1977.
19. *Yoshida Y., Yamane T.* Biotechnol. Bioeng., 16, 635-657, 1974.

Поступила 5.XII.2000