

БИОХИМИЯ

М. А. Тер-Карапетян, академик АН Армянской ССР, и А. А. Элиазян

Адаптация дрожжей к *l*-арабинозе

(Представлено 4/VI 1964.)

Пентозы в качестве единственного источника углерода расщепляются и усваиваются дрожжевыми организмами в значительно меньшей степени, чем гексозы и дисахариды, считающиеся для них основными источниками углерода. Особенно редки случаи усвоения пентоз у представителей рода *Saccharomyces*, в то время как у родов *Torulopsis* и *Candida* это свойство встречается чаще. Большинство усваивающих пентозы дрожжевых организмов ассимилирует лишь только ксилозу, в более редких случаях—арабинозу и еще реже рамнозу (^{1,2}).

Получение пентозусвояющих культур осуществляется путем выделения из эпифитной микрофлоры разного происхождения или из производств, перерабатывающих пентозосодержащие субстраты (гидролизаты, сульфитные щелоки и т. п.) (³⁻⁸), а также путем адаптации отдельных штаммов из рода *Candida* (^{9,10}).

Настоящая работа посвящена изучению явления адаптации к арабинозе у новой культуры дрожжей рода *Candida* — *C. tropicalis* шт. КЗ—10, выделенной Ш. А. Авакян.

Исследования показали, что эта культура хорошо усваивает в аэробных условиях глюкозу и ксилозу, синтезируя в обоих случаях значительное количество биомассы (¹). В тех же условиях и сроках инкубации она весьма медленно или вовсе не размножается в среде, содержащей арабинозу в качестве единственного источника углерода. Так, например, в течение 8—10 часов инкубации *C. tropicalis* КЗ—10 в синтетической среде с глюкозой и ксилозой образует соответственно 3—4 и 2—3 поколения клеток, а в среде с арабинозой—ни одного (¹¹).

При более продолжительной инкубации (20—23 ч.) в аэрированной синтетической среде в условиях, приводящих к расщеплению глюкозы в пределах 95—100% и ксилозы на 70—85%, арабиноза расщепляется лишь только на 3—5%.

Эти предварительные данные и послужили основанием для изучения возможности адаптации упомянутой культуры к арабинозе.

Опыты были поставлены в синтетической среде следующего состава (¹²): глюкоза, ксилоза или арабиноза — 10 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,12 г, KH_2PO_4 — 1,23 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,625 г, NaCl — 0,125 г, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,125 г, биотин — 8 мкг, водопроводная вода — до 1 литра.

Все компоненты среды, кроме биотина, были очищены путем перекристаллизации. Стерилизация сахаров производилась отдельно от основной среды. Упомянутая среда использовалась как в жидком виде, так и в твердом с 1,5% агаром.

Посевной материал готовился из культуры на сусло-агаре путем выращивания в культуральной среде при 30°С в условиях аэробноза на круговой качалке (скорость вращения 160—200 об/мин.) в течение 18—20 час. Полученная биомасса подвергалась голоданию в течение 24 часов в дистиллированной воде в указанных условиях аэрирования. Голодающая культура отцентрифугировалась, промывалась дистиллированной водой и заседалась в виде суспензии из расчета 1,5—3,0 мг сухой биомассы на 100 мл культуральной среды.

Опыты ставились в 750 мл колбах, содержащих 100 мл среды. Инкубация проводилась в термостате при таких же условиях температуры и взбалтывания, как и для посевного материала.

Оценка экспериментальных результатов производилась следующими показателями: динамика расщепления сахаров методом феррицианида с поправкой для пентоз по Соботка и Рейнеру (¹³) и по данным нашей лаборатории (неопубликованные данные), синтезированная биомасса в конце опыта после высушивания путем взвешивания, отношение синтезированной биомассы к расщепленному сахару (экономический коэффициент синтеза биомассы), интенсивность дыхания на аппарате Варбурга и рост на синтетической среде с агаром.

1. *Усвоение l-арабинозы неадаптированной культурой C. tropicalis шт. КЗ—10.* Результаты опытов приведены в табл. 1.

Полученные результаты наглядно показывают, что в условиях проведенных опытов исследуемая культура расщепляет глюкозу интенсивно и полностью, ксилозу значительно медленнее, а арабинозу в ничтожной степени. Экономический коэффициент синтеза биомассы достигает при усвоении глюкозы 35,8—41,7%, ксилозы—40,1—43,3%, в то время как при усвоении арабинозы коэффициент не превышает порядка 10—13%. Последние данные служили основанием для проведения опытов по адаптации этой культуры к l-арабинозе.

2. *Адаптация C. tropicalis шт. КЗ—10 к l-арабинозе.* Опыты по адаптации к l-арабинозе проводились в вышеупомянутых условиях путем удлинения срока инкубации и последовательного пересева культур в среду, содержащую специфический субстрат. Для сравнения была использована музейная культура *C. tropicalis* шт. X—9*.

* Культура *C. tropicalis* X—9 была любезно представлена нам 13/II 1964 г. Ю. Н. Карасевичем.

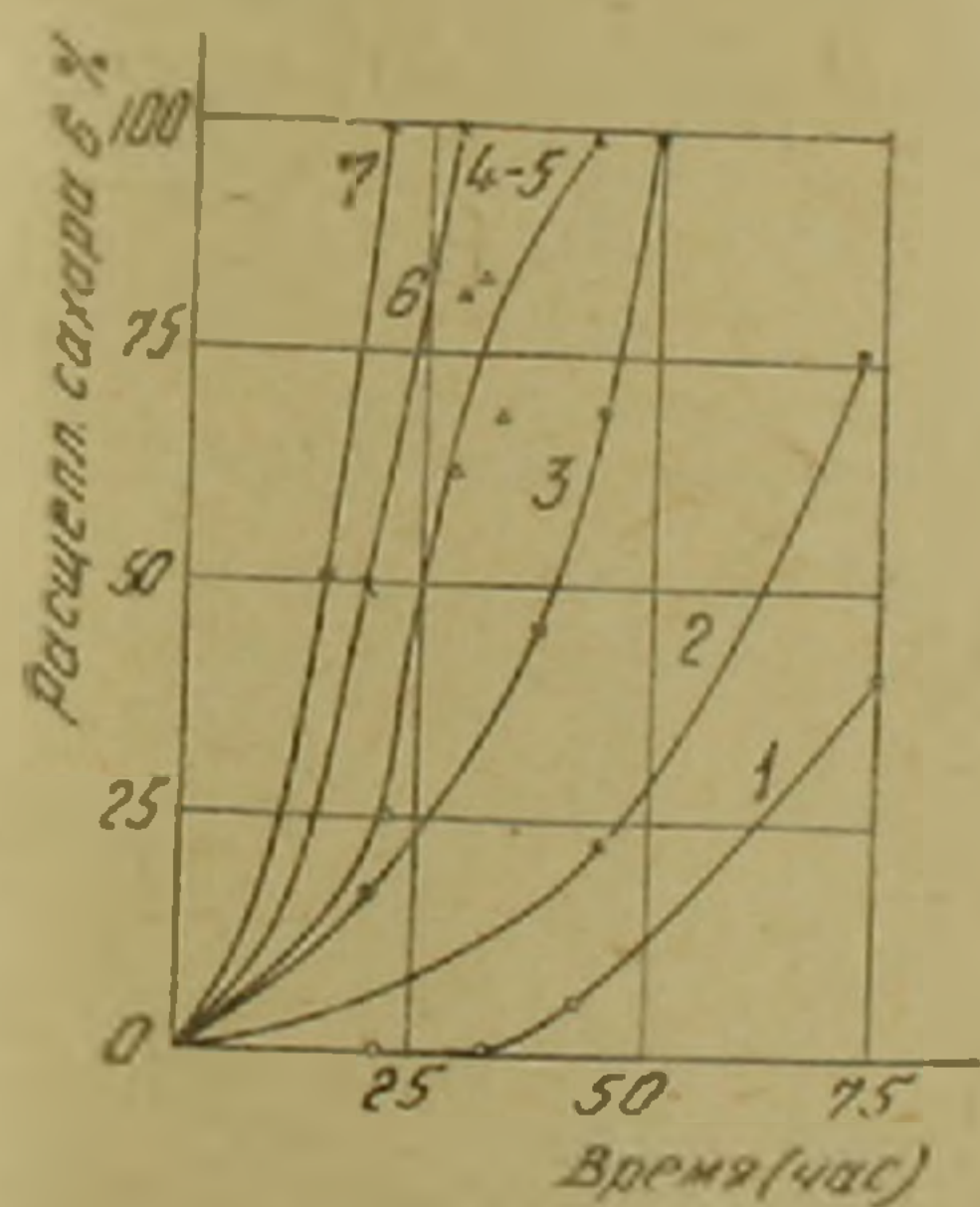
Таблица 1

Усвоение глюкозы, ксилозы и арабинозы *C. tropicalis* шт КЗ—10

Дата опытов	Источник углерода, мг	Продолжительность инкубации, час.	Расщепленный сахар, мг	Синтез биомассы, мг	Экономич. коэффиц. ‰
14/X 62	Глюкоза 920	22	910	326	35,8
	920	22	910	327	36,0
	Ксилоза 1060	28	770	318	41,2
	1060	28	972	390	40,1
	Арабиноза 1205	22	98	< 5	—
	1205	22	98	< 8	—
5/X 62	Глюкоза 980	18	910	365	40,0
	980	18	865	361	41,7
	Ксилоза 1156	23	772	335	43,3
	Арабиноза 1082	23	30	< 5	—
	1082	23	50	< 5	—

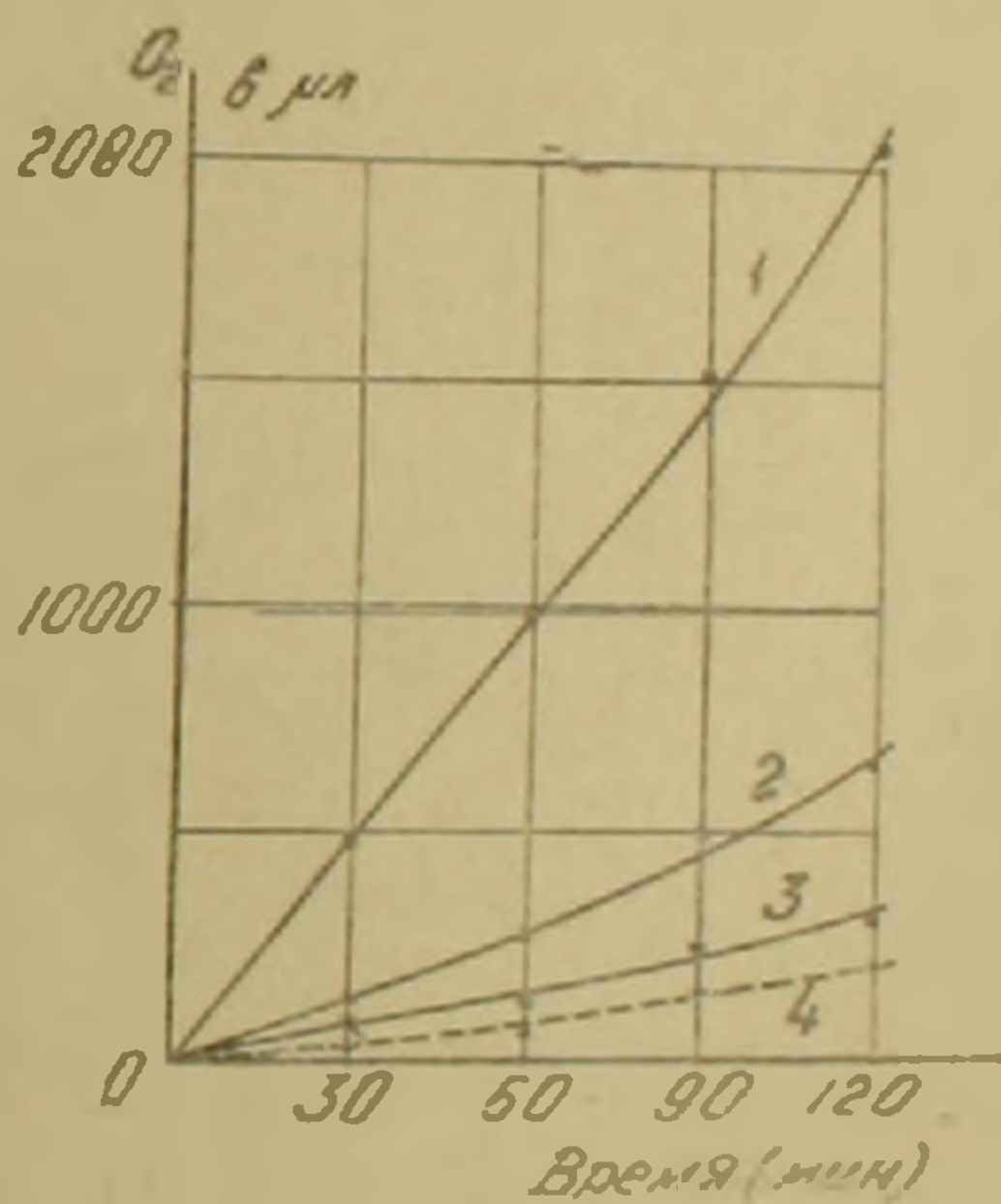
Показателем адаптации служила динамика расщепления *l*-арабинозы в жидкой синтетической среде.

Полученные результаты приведены в табл. 2 и 3, а также на фиг. 1.



Фиг. 1 Динамика адаптации *C. tropicalis* КЗ—10 к арабинозе.

Последовательные пассажи 1, 2, 3, 4, 5 в среде с арабинозой. Контрольные варианты в средах: 6 — с ксилозой, 7 — с глюкозой.



Фиг. 2. Дыхание *C. tropicalis* КЗ—10 в фосфатном буфере (М/15) 1 — неадаптированная к арабинозе культура в присутствии глюкозы; 2 — адаптированная к арабинозе культура в присутствии арабинозы; 3 — неадаптированная к арабинозе культура в присутствии арабинозы; 4 — эндогенное дыхание адаптированной культуры.

Из табл. 2 и фиг. 1 видно, что неадаптированная культура *C. tropicalis* КЗ—10 (1 пассаж) расщепляет заданную арабинозу в течение 98 часов, а адаптированная культура (V пассаж) в течение

40—42 часов. Адаптация завершается в процессе 4—5 последовательных пассажей, составляя около 40—50 поколений клеток, а скорость расщепления арабинозы у адаптированной культуры приближается к таковой на ксилозе.

Таблица 2

Адаптация *C. tropicalis* шт. КЗ—10 к *l*-арабинозе.
Начиная с II пассажа, посевным материалом служила биомасса предыдущего пассажа.

Дата опытов	Пас-саж	Посевной материал, мг	Исходная арабиноза, мг	Продолж. опыта, час.	Расщеплен-ная арабиноза, мг
19/X 62	I	2,2	1127	0	—
				22	0
				33	0
				42	70
				75	487
				98	1114
23/X 62	II	1,0	1180	0	—
				45	270
				72	898
30/X 62	III	1,0	1120	0	—
				20	220
				38	566
				44	738
17/XI 62	IV	3,8	1082	0	—
				19	123
				22	270
				28	664
				30	775
29/XII 62	V	2,2	1127	0	—
				33	750
		1,2	d-глюкоза 920*	42	1114
				0	—
				21	892
		1,2	d-ксилоза 1058*	24	910
				0	—
				21	530
				24	767
				29	972

Полученные данные можно истолковать на основе постепенной адаптации исследуемого штамма к *l*-арабинозе, так как культура, ни разу не соприкасавшаяся с этим субстратом, вырастает в первом пассаже после лаг-фазы 20—40 час., в то время как в процессе последовательных пересевов лаг-фаза сокращается до 6—8 часов, приближаясь к таковой на ксилозе.

Из табл. 3 видно, что динамика адаптации к *l*-арабинозе совершенно одинакова у исследуемых культур *C. tropicalis* КЗ—10 и X—9, что не согласуется с ранними данными, указывающими о весьма

* Контрольные опыты

Таблица 3

Динамика адаптации *C. tropicalis* КЗ—10 и X—9 к *l*-арабинозе

Дата опытов	Штамм	Посевной материал, мг	Исходная арабиноза, мг	Продолжит. опыта, час.	Расщеплен. арабиноза, мг
11/III 64	КЗ—10	2,8	1107	0	—
				24	0
				46	0
				70	196
				93	1020
	X—9	3,0	1107	0	—
				24	0
				46	0
				70	123
				93	990

длинных сроках адаптации и медленных темпах выращивания *C. tropicalis* X—9 (всего 3 поколения на одну неделю) (°).

3. *Некоторые свойства C. tropicalis* КЗ—10, адаптированной к *l*-арабинозе. В предварительных исследованиях нами изучены следующие показатели у адаптированной к арабинозе культуры: динамика расщепления арабинозы и экономический коэффициент синтеза биомассы, рост на синтетической среде с агаром, содержащей арабинозу, интенсивность дыхания клеток.

Результаты по выращиванию в условиях аэробноза пригедены в табл. 4.

Таблица 4

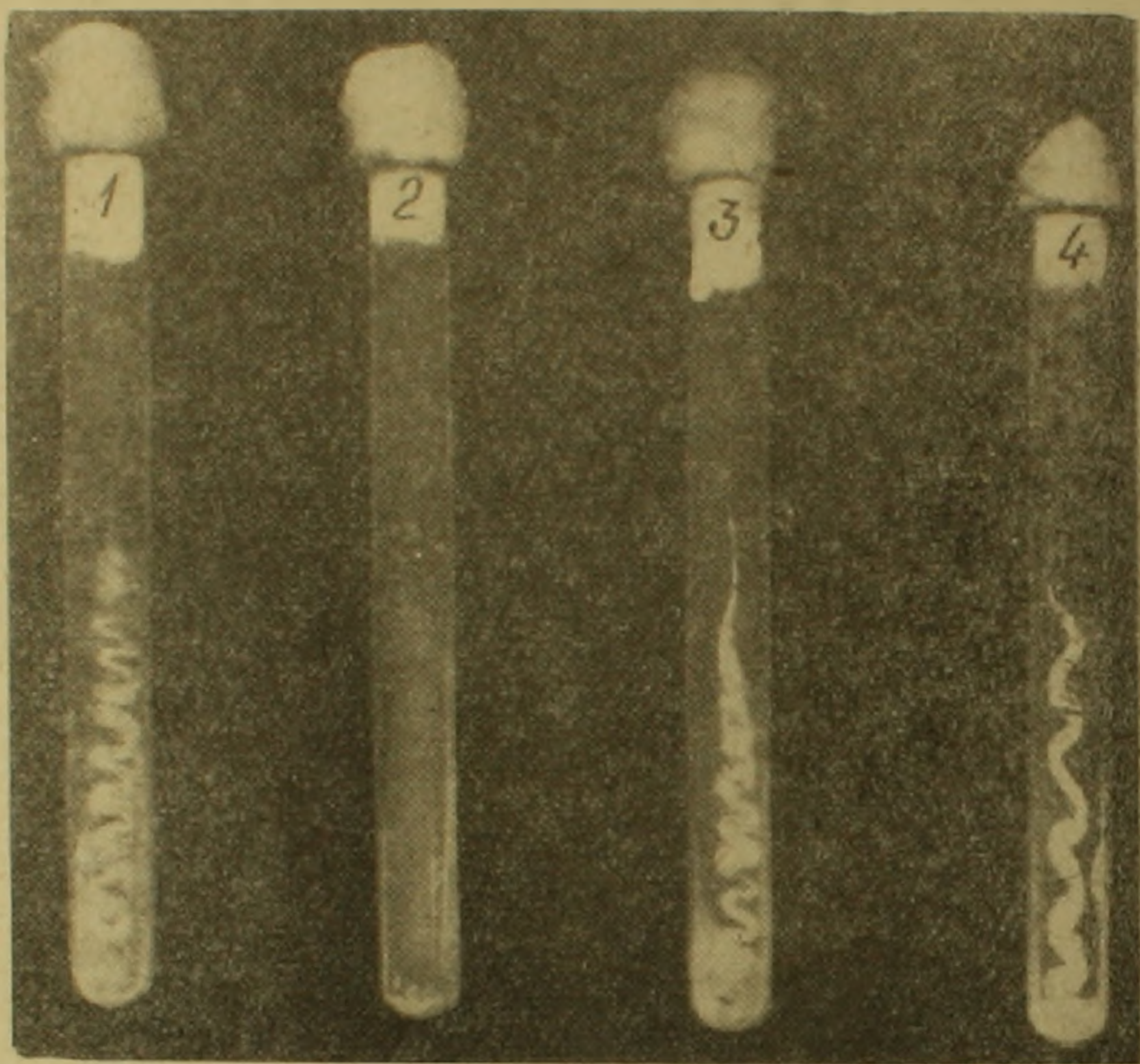
Свойства адаптированной к *l*-арабинозе шт. КЗ—10

Дата опытов	Исходная арабиноза	Посевной материал, мг	Продолжительность опыта (час)	Расщепленная арабиноза, мг	Биомасса, мг	Экономич. коэффициент, %
23/X 62	1180	1,3	44	900	304	33,4
17/XI 62	1080	3,8	30	898	298	33,1
29/XII 62	1127	2,2	42	1115	378	33,9
29 XII 62	1127	2,2	42	1115	368	33,0

Результаты табл. 4 показывают, что адаптированная культура по сравнению с неадаптированной обладает следующими свойствами: усиления скорости расщепления арабинозы, повышения экономического коэффициента синтеза биомассы до 33,9%.

Результаты по выращиванию на синтетической среде с агаром, содержащей арабинозу в качестве единственного источника углерода, изложены на фиг. 3, которая показывает, что адаптированная культура отлично растет в течение 1—2 суток (№ 4), в то время как неадаптированная не показывает заметного роста в тех же условиях, даже после 10—12-дневной инкубации (№ 2).

Результаты по динамике потребления кислорода при выращивании культуры в условиях аэробноза изложены на фиг. 2, где заметно, что в среде с арабинозой интенсивность дыхания адаптированной культуры (Ар → Ар) превышает таковую неадаптированной (Гл → Ар), но все же уступает уровню дыхания культуры, выращенной на глюкозе (Гл → Гл).



Фиг. 3. Рост *C. tropicalis* КЗ — 10 на синтетической среде с агаром. Неадаптированная к арабинозе культура в среде с глюкозой — 1, с арабинозой — 2, Адаптированная к арабинозе культура в среде с глюкозой — 3, с арабинозой — 4.

Значения $Q_{O_2}^{в03}$ равняются: для культуры *C. tropicalis* КЗ — 10, выращенной на глюкозе и испытанной на том же субстрате — 223, а при испытании на арабинозе — 35,8; для культуры, выращенной на арабинозе (V пассаж) и испытанной на том же субстрате — 70,6, а при испытании на глюкозе — 123.

Выводы 1. На примере *C. tropicalis* шт. КЗ — 10 показана возможность адаптивования дрожжевых организмов к арабинозе в условиях аэробноза в жидкой синтетической среде в течение сравнительно кратковременной инкубации (90—98 час.).

2. Адаптация выражается сокращением лаг-фазы и завершается в процессе 4—5 пассажей, представляющих около 40—50 поколений клеток.

3. Адаптированная культура отличается от исходной, высоким

коэффициентом синтеза биомассы, повышенной дыхательной способностью в жидкой среде с арабинозой, способностью расти на поверхности синтетической агаровой среды с арабинозой.

4. Поскольку исходная культура обладает, хотя и в весьма низкой степени, свойством расщепления *l*-арабинозы и довольно интенсивного дыхания в присутствии этого субстрата, можно допустить гипотезу, что описанное нами явление происходит посредством перестройки культуры в целом, путем индуцированного синтеза ферментативных систем, принимающих участие в реакциях расщепления и усвоения *l*-арабинозы (¹⁴).

По всей вероятности, адаптация происходит у двух испытуемых культур *C. tropicalis* КЗ—10 и Х—9 по подобным механизмам.

Гипотеза отбора какого-то мутанта, содержащегося в исходной популяции, трудно применима в условиях наших опытов.

При наличии в культуре, поставленной на инкубацию, $1,6 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл, если допустить, что доля мутантов в исходной популяции равна 10^{-6} и лаг-фаза исходной культуры длится около 40 часов, то при таких условиях клетки, обладающие свойством усвоения арабинозы, достигнут степени конечной густоты культуры (500—600 миллион в 1 мл) в процессе более 20 поколений. Такую последовательность поколений трудно представить себе, если учесть, что время почкования уже адаптированной культуры в среде с *l*-арабинозой равно не менее 6—8 часов.

Армянский НИИ животноводства и ветеринарии
Министерства сельского хозяйства Армянской ССР
Институт микробиологии Академии
наук Армянской ССР

Մ. Ա. ՏԵՐ-ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Հայկական ՍՍՌ ԴԱ ակադեմիկոս և Ա. Ա. ԷԼԻԱՉՅԱՆ

ԽՈՒՐԱՄԱՆԿԵՐԻ ԱՊԱՍՏԱԳԻԱՆ *l*-ԱՐԱՐԻՆՈՂԻ ՆԿԱՏՄԱՄԲ

ԽՈՒՐԱՄԱՆԿԵՐԻ միջոցով միկրոբային սպիտակուց սինթեզելու հարցը սերտորեն կապված է քսիլոզ և արաբինոզ յուրացնող խՈՒՐԱՄԱՆԿԵՐԻ նոր տեսակներ ստանալու խնդրի հետ:

Ներկա աշխատանքը նվիրված է *C. tropicalis* КЗ—10 և Х—9 շտամների *l*-արաբինոզի նկատմամբ ադապտացիայի երեւույթի ուսումնասիրությանը:

Արդյունքները բերված են նո. 1—4 աղյուսակներում և նո. 1—3 նկարներում:
Մեր կողմից կատարված հետազոտությունները բերել են հետևյալ եզրակացություններին.

1. Պարզվել է, որ սինթետիկ հեղուկ միջավայրում, անոր կենսադործունեության պայմաններում, 90—98 ժամվա ընթացքում, հնարավոր է *C. tropicalis* КЗ—10 խՈՒՐԱՄԱՆԿԵՐ ադապտացիայի միջոցով դարձնել *l*-արաբինոզ յուրացնող:

2. Ադապտված կուլտուրան տարբերվում է ելակետային կուլտուրայից կարճատև լազ-ֆազայով, բիոմասայի սինթեզի տնտեսական դորձակցի բարձր արժեքով, արաբինոզի միջավայրում շնչառությամբ ինտենսիվությամբ, արաբինոզ-ազարի վրա արագ աճելու ունակությամբ:

3. Ինթագրվում է, որ ադապտացիայի ընթացքում տեղի է ունենում արաբինոզ հեղրող ֆերմենտների ինդուկցիված սինթեզ, որի հետևանքով ելակետային կուլտուրան

գերափոխում է տնտեսական կյանքի մոտեցումը առանձին մասնաշաղկապների փոխարեն հիպոթեզը մեր փորձերի պայմաններում կիրառելի չի թվում:

Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Վ Ա Ն ՈՒ Ջ Ն Ե Ր

- ¹ Д. Роза, Е. Фред, В. Петерсон, Ztbltt. Bakt. Parasit. Abt II, 79, 89, 1959.
² А. Е. Уайльс, J. Inst. Brewing 59, 265, 1953. ³ Е. А. Плевако, Получение кормовых дрожжей на гидролизатах сельскохозяйственных отходов, 1940. ⁴ М. А. Тер-Карапетян, ДАН СССР, 112, 915 (1957). ⁵ А. П. Крючкова, Гидролизная пром. СССР, № 5, 1945; Гидролиз. и лесохим. пром. СССР, № 8, 11, 1955. ⁶ В. Петерсон, Дж. Снелл, В. Фрезьер, Ind. & Eng. Chem. 37, 1, 30, 1945. ⁷ Ф. Г. Сарухян, Известия АН АрмССР (естеств. науки), № 3, 43 (1944). ⁸ Ш. А. Авакян, Изучение динамики размножения и синтеза биомассы у дрожжевых организмов в условиях аэробного обмена, Диссертация, Ереван, 1953. ⁹ Ю. Н. Карасевич, Микробиология, 27, 145, 1958; 28, 34, 191, 1959. ¹⁰ Е. Карчевска, C R. Labor. Carlsberg (Ser. Chim.) 31, 17, 251, 1959. ¹¹ А. А. Элиазян, Ф. Ц. Никогосян, Научные труды Ереванского гос. университета № 11, 107, 1963. ¹² М. А. Тер-Карапетян, Е. Н. Макарова, Известия АН АрмССР (сер. биол.), 16, № 5, 15 (1963). ¹³ Г. Сobotка, М. Рейнер, Biochem. J. 24, 1, 394, 1930. ¹⁴ А. Дин, С. Хиншельвуд, Адаптация у микроорганизмов, Изд. ИЛ, М., 1956.