

УДК 576.8:621.039.85

РОЛЬ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРОЦЕССАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ НА СРЕДАХ С Н-АЛКАНАМИ

А. И. МЕЛЕНТЬЕВ

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

В последнее время исследователи все больше внимания уделяют вопросу о возможности использования поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании микроорганизмов, в особенности на средах с малорастворимыми субстратами. Чаще всего для этих целей используют неионогенные поверхностно-активные вещества (НПАВ), поскольку они, как правило, нетоксичны для микробных клеток и организма животного и не взаимодействуют с ионами питательных солей.

Основой для использования ПАВ в процессах ферментации служит свойство дифильных молекул поверхностно-активных веществ снижать поверхностное натяжение жидких сред, что должно обеспечить более тонкое диспергирование малорастворимого жидкого субстрата, а также увеличение сорбции кислорода средой.

Некоторые авторы [2, 9—11] считают, что первой промежуточной стадией потребления н-алканов микроорганизмами является процесс их солюбилизации поверхностно-активными веществами, вносимыми в среду, или же дифильными молекулами метаболитов, накапливающимися в культуральной жидкости. Согласно этому предположению внесение в среду ПАВ должно стимулировать рост микроорганизмов на малорастворимых субстратах. По мнению других исследователей [8], способность микроорганизмов расти на н-алканах обусловлена гидрофобностью клеточной стенки. Обнаружено, что спан 60 и твин 20 способствуют диссоциации клеток дрожжей *Candida guilliermondii* с поверхности капель и тем самым замедляют рост культуры. Имеются данные [11] о том, что поверхностно-активные вещества способствуют образованию и стабилизации эмульсии малорастворимого субстрата. Если ПАВ не ингибируют ферментную систему клетки и не разрушают клеточных структур, то при большей межфазной поверхности увеличится доступность н-алканов, что приведет к увеличению скорости роста микроорганизмов. Вместе с тем, если молекулы ПАВ будут взаимодействовать с гидрофобными участками клеточной стенки, затруднится контакт клеток с н-алканом и, таким образом, снизится скорость роста микроорганизмов. Имеющиеся в литературе сведения о влиянии ПАВ на рост микроорганизмов разноречивы. В одних случаях при использовании одних и тех же поверхностно-активных веществ наблюдается стимулирование роста дрожжей на н-алканах [11], в других — снижение скорости роста [4]. Вероятно, расхождение полученных результатов объясняется различными условиями проведения экспериментов (в одних работах влияние ПАВ изучалось в процессе культивирования на качалочных колбах, в других — в лабораторных ферментерах). Кроме того, в опытах использовались поверхностно-активные вещества, различающиеся по химической природе и физико-химическим характеристикам, например, таким, как гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ), солюбилизующее действие и т. п.

Представляет интерес выяснить, какова роль поверхностно-активных веществ в процессах ферментации дрожжей на *n*-алканах, какое влияние оказывают химическая природа ПАВ и их физико-химические свойства на рост дрожжей при тех или иных условиях культивирования.

Материалы и методы исследований

Культуру дрожжей *Candida guilliermondii*, поддерживаемую на сусло-агаровой среде, после предварительной адаптации к *n*-алкану в качалочных колбах емкостью 750 мл со 150 мл минеральной среды [7] культивировали в 5 л ферментере фирмы «Нью Брансвик» модель С 30 или в 300 мл ферментере системы «Биофло».

Источниками углерода служили $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекан удельной активностью 5—10 мкКи/мл; $1\text{-}^{14}\text{C}$ -тетрадекан — 20 мкКи/мл и $1\text{-}6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкоза — 15 мкКи/г в зависимости от поставленной задачи.

В качестве поверхностно-активных веществ использовали следующие: твин 80 — полиоксиэтилен-(20)-сорбитанмоноолеат; спан 80 — сорбитанмоноолеат; ферман — блоксополимер окиси этилена и окиси пропилена в соотношении 22:17; проксанол-блоксополимер окиси этилена и окиси пропилена в соотношении 60:40.

Для неионогенных ПАВ введено понятие гидрофильно-лиофильного баланса (ГЛБ). Предполагается, что все молекулы поверхностно-активных веществ имеют в своем составе гидрофильную и лиофильную группы. Баланс между этими двумя группами указывает, какого типа эмульсию будет образовывать данное ПАВ — масло в воде (м/в) или вода в масле (в/м). Поверхностно-активные вещества с числом ГЛБ > 10 образуют эмульсию типа м/в, а с числом ГЛБ < 10 — типа в/м. Для определения числа ГЛБ существует несколько физико-химических методов, однако чаще пользуются формулой, предложенной фирмой «Атлас Кемикл Инк»: $\text{ГЛБ} = E/5$, где E — содержание окиси этилена, выраженное в масс-процентах. Значения чисел ГЛБ для твина 80 и спана 80, по данным фирмы «Атлас Кемикл Инк», — соответственно 15,0 и 4,3; для фермана и проксанола, рассчитанные по приведенной формуле, — 9,8 и 10,8 соответственно.

Солюбилизацию *n*-алканов поверхностно-активными веществами определяли ана-

логично описанному в [7] методу в модификации с использованием метода радиоактивных индикаторов. Минеральной средой, содержащей соответствующий ПАВ в концентрации 0,01%, заполняли 300 мл ферментер и добавляли 0,3 мл $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекана удельной активностью 500 мкКи/мл. Содержимое перемешивали в течение 1 ч при 32°; после чего эмульсию переносили в делительную воронку и оставляли на ночь при 4°. После вымораживания из нижнего слоя делительной воронки отбирали по 5 мл пробы, добавляли 1,5 г поваренной соли и экстрагировали гексаном. Содержание $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекана в гексановом экстракте определяли радиометрически.

В процессах культивирования дрожжей биомассу определяли весовым методом; концентрацию непроеданных *n*-алканов — радиометрически, для чего отобранную из ферментера пробу высаливали поваренной солью и экстрагировали гексаном. Активность $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекана в гексановом экстракте определяли на жидкостном сцинтилляционном радиометре «Марк II». В случае культивирования дрожжей на $1\text{-}6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозе концентрацию последней в культуральной жидкости устанавливали радиометрически после отфильтровывания биомассы. В отходящих из ферментера газах определяли $^{14}\text{CO}_2$ путем поглощения 0,1 н. раствором едкого натра в склянках Дрекселя.

При определении скорости окисления *n*-алканов покоящимися клетками дрожжей инкубацию проводили в сосудах Варбурга на термостатированном аппарате для встряхивания фирмы «Нью Брансвик» при 32° и 200 об/мин. В сосуды вносили 4 мл минеральной среды, 15—20 мг (по АСВ) свежесывращенных отмытых дрожжей и 24 мкл $1\text{-}^{14}\text{C}$ -тетрадекана. В палочки сосудов помещали полоски стеклянных фильтров Ватман GF/B, пропитанные 2-фенилэтиламином для поглощения $^{14}\text{CO}_2$. Фильтры заменяли каждые 15 мин и определяли их радиоактивность.

Результаты исследований

Первая часть исследования была посвящена изучению влияния неионогенных поверхностно-активных веществ на процесс культивирования дрожжей на *n*-алканах в условиях лимитирования по субстрату. С этой целью проводили накопительное культивирование в 5 л ферментере с объемом среды 2,5 л и концентрацией $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекана 0,16 об.%. Количество ПАВ составляло 0,01 масс.%, что близко по значению к критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Концентрацию растворенного кислорода поддерживали автоматически на уровне 70% от насыщения. Исходная концентрация биомассы составляла 0,35—0,40 г/л.

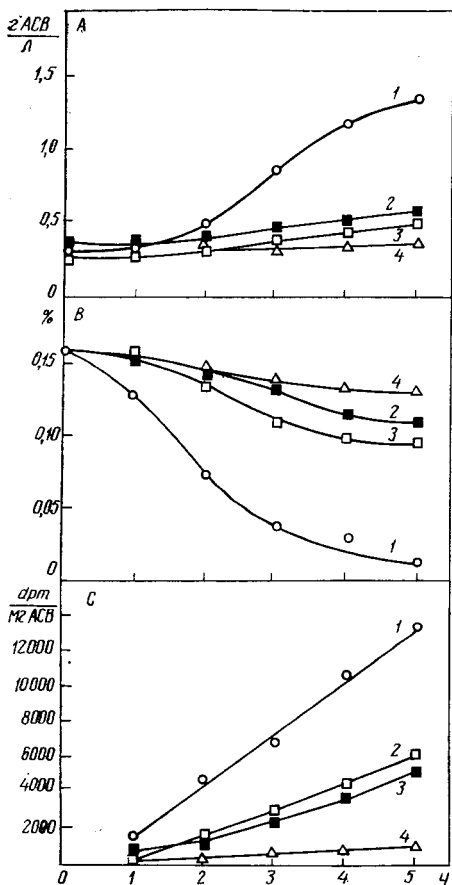


Рис. 1. Культивирование дрожжей *S. guilliermondii* на $1\text{-}^{14}\text{C}$ -октадекане. А — накопление биомассы; В — потребление n -алкана; С — выделение $^{14}\text{CO}_2$; 1 — контроль; 2 — в присутствии 0,01% фермана; 3 — 0,01% проксанола; 4 — 0,01% твина 80.

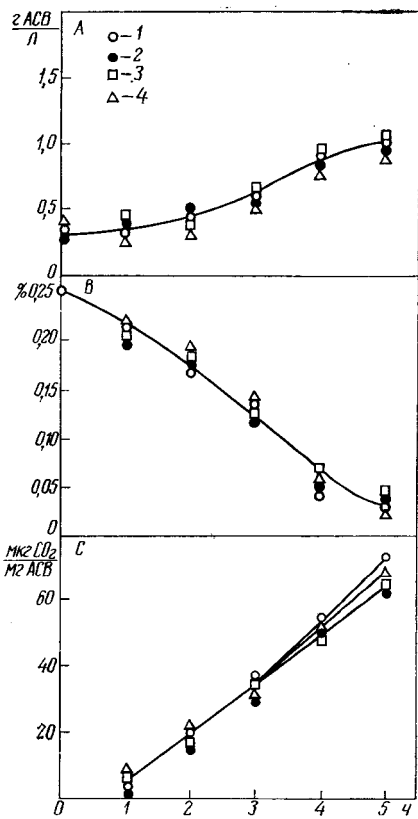


Рис. 2. Культивирование дрожжей *S. guilliermondii* на ^{14}C -глюкозе-1-6. А — накопление биомассы; В — потребление глюкозы; С — выделение $^{14}\text{CO}_2$; 1 — в отсутствие ПАВ; 2 — в присутствии 0,01% проксанола; 3 — 0,01% фермана; 4 — 0,01% твина 80.

Как видно из рис. 1, во всех случаях присутствие всех изучаемых ПАВ вызвало снижение скорости окисления и потребления n -алканов и уменьшение прироста биомассы. Более сильным было отрицательное влияние твина 80, менее — троксанола и фермана. Ингибирование роста дрожжей ПАВ может происходить, во-первых, потому что в соответствии с контактной моделью потребления n -алканов дрожжами они, образуя защитный слой на поверхности капель n -алкана, препятствуют взаимодействию дрожжевых клеток с n -алканом и тем самым снижают скорость его ассимиляции, во-вторых, потому что молекулы ПАВ, проникая внутрь клетки, могут ингибировать ферментную систему, замедляя процессы метаболизма.

Для выяснения влияния поверхностно-активных веществ на ферментную систему клеток нами было проведено культивирование дрожжей в присутствии ПАВ на 1-6- ^{14}C -глюкозе. Накопительное культивирование проводили в 300 мл ферментере при концентрации растворенного кислорода 60—70% от насыщения и начальной концентрации глюкозы 0,25 масс. %.

Обнаружилось, что скорость окисления и потребления глюкозы во всех вариантах практически одинакова и разница не превышает ошибки опыта (рис. 2). Это согласуется с данными других исследователей [3], изучавших влияние ПАВ на синтез β -галактозидазы дрожжами

S. pseudotropicalis и показавших, что твин 60, твин 80 и тритон X-100 не оказывают действия на выход биомассы.

Следовательно, молекулы неионогенных ПАВ не влияют на процессы метаболизма в клетке, а наблюдаемое ингибирование роста дрожжей и окисления *n*-алканов происходит, вероятнее всего, на уровне взаимодействия субстрата с поверхностью клетки.

Однако степень подавления роста дрожжей и ассимиляции *n*-алканов ПАВ неодинакова и зависит от применяемого вещества (химической его природы и физико-химических свойств).

Солюбилизация 1-¹⁴C-октадекана в различных средах

| Среда | Количество солюбилизированного октадекана, мг/л | Среда | Количество солюбилизированного октадекана, мг/л |
|------------------------|---|--|---|
| Дистиллированная вода* | 155±4 | Культуральная жидкость дрожжей, выращенных: на глюкозе на октадекане | |
| 1%-ная с твином 80 | 254±6 | | 66±5 |
| 1%-ная с ферманом | 155±9 | | 68±5 |
| 1%-ная с проксанолом | 290±5 | | |

* рН дистиллированной воды 6,7.

Поскольку исследователями высказывается предположение о том, что первой необходимой стадией в потреблении *n*-алканов дрожжами является их солюбилизация поверхностно-активными веществами или веществами, продуцируемыми культурой в среду, представляло интерес выяснить, существует ли взаимосвязь между солюбилизирующим действием ПАВ на *n*-алканы и скоростью их потребления микроорганизмами.

Как видно из таблицы, взаимосвязи между солюбилизирующим действием исследуемых ПАВ и их влиянием на скорость окисления и потребления *n*-алканов (рис. 1) не существует. Кроме того, солюбилизация октадекана в минеральной среде была значительно ниже, чем в дистиллированной воде. Интересен факт, что солюбилизация октадекана культуральной жидкостью дрожжей, выращенных на глюкозе и октадекане, практически одинакова. Эти данные, на наш взгляд, опровергают предположение некоторых авторов [6] о том, что при росте на *n*-алканах дрожжевые клетки продуцируют специальные вещества, способствующие солюбилизации *n*-алкана. Таким образом, солюбилизирующая способность поверхностно-активных веществ не связана с их воздействием на процессы культивирования дрожжей на *n*-алканах.

Возможно, что воздействие неионогенных ПАВ на скорость потребления и окисления *n*-алканов обусловлена их способностью образовывать эмульсии двух типов — м/в или в/м (числом ГЛБ). В сообщении о возможности культивирования микроорганизмов в эмульсии типа в/м [5] отмечалось, что в этих условиях скорость переноса кислорода была в 4 раза больше, а концентрация биомассы в водной фазе — в 3 раза выше, чем в системе м/в.

Нами изучалось влияние числа ГЛБ поверхностно-активных веществ на покоящиеся клетки в сосудах Варбурга. Для получения различных значений числа ГЛБ в соответствии с рекомендациями Атлас Кемикл Инк использовали смеси спана 80 (ГЛБ 4,3) и твина 80 (ГЛБ 15) в следующих соотношениях: ГЛБ 12 — 0,28 : 0,72; ГЛБ 10 — 0,47 : 0,53; ГЛБ 8 — 0,65 : 0,35; ГЛБ 6 — 0,84 : 0,16. Поскольку спан 80 не растворяется в воде, его вносили в жидкий *n*-алкан, а твин 80 — в водную среду. В одном случае *n*-алкан эмульгировали на ультразвуковой установке MSE в течение 2 мин при 30 кГц и амплитуде 4 мкм (на

3 мл среды брали 24 мкл 1-¹⁴C-тетрадекана), в другом — использовали не эмульгированный ультразвуком 1-¹⁴C-тетрадекан.

На рис. 3 представлены результаты этих опытов. Коэффициент корреляции для варианта без диспергирования составил —0,25 и, следовательно, только 6,25% изменения скорости окисления обусловлено изменением гидрофильно-лиофильного баланса, т. е. его влияние очень слабо. В варианте с диспергированным н-алканом коэффициент корреляции равен —0,45, т. е. изменение скорости окисления лишь на 20% обусловлено изменением числа ГЛБ поверхностно-активных веществ. Таким образом, влияние числа ГЛБ неионогенных ПАВ на скорость окисления н-алканов дрожжами не столь существенно. Очевидно, большее действие на скорость окисления н-алканов микроорганизмами оказывает химическая природа неионогенных ПАВ, которая существенно влияет на прочность защитных слоев, формируемых на поверхности н-алкана. Весьма возможно, что молекулы твина 80, площадь поверхности которых больше, чем у линейных молекул фермана и проксанола, образуют более прочный защитный слой, препятствующий контакту капель с клетками микроорганизма.

Скорость окисления 1-¹⁴C-тетрадекана при эмульгировании последнего ультразвуком в контроле была значительно выше, чем в варианте с использованием поверхностно-активных веществ, а при отсутствии эмульгирования она в контроле оказалась несколько ниже, чем в присутствии спана 80 или твина 80. Разницу между скоростью окисления в контрольных вариантах при ультразвуковом эмульгировании и без него можно объяснить тем, что, во-первых, с уменьшением размеров капель н-алкана вследствие эмульгирования увеличивается его доступность для микроорганизмов, во-вторых, в процессе эмульгирования ультразвуком среда насыщается кислородом, которого, как показали проведенные расчеты, вполне достаточно для окисления н-алкана, потребляемого за время опыта. В случае с неэмульгированным углеводородом необходимое количество кислорода должно поступать в течение всего опыта за счет массообмена с газовой фазой, поэтому лимитируется уже не субстрат, а кислород. Поверхностно-активные вещества снижают поверхностное натяжение на границе раздела фаз и увеличивают скорость сорбции кислорода из газовой фазы. Подтверждением этому служат результаты определения «сульфитного числа» в 300 мл ферментере при аэрации воздухом в количестве 2 мл/мин.

Сульфитное число без добавления ПАВ составляло 3,88 г O₂/л·ч; в присутствии 0,01% твина — 4,10; 0,01% фермана — 4,68; 0,01% проксанола — 4,45 г O₂/л·ч.

Таким образом, роль неионогенных ПАВ в процессах культивирования дрожжей на н-алканах различна. При лимитировании роста по субстрату молекулы ПАВ, образуя защитный слой на поверхности капель н-алкана, затрудняют контакт клеток с каплями н-алканов, вследствие чего снижается скорость его ассимиляции. Но при недостатке кислорода поверхностно-активные вещества увеличивают скорость сорбции кислорода и тем самым стимулируют рост дрожжей.

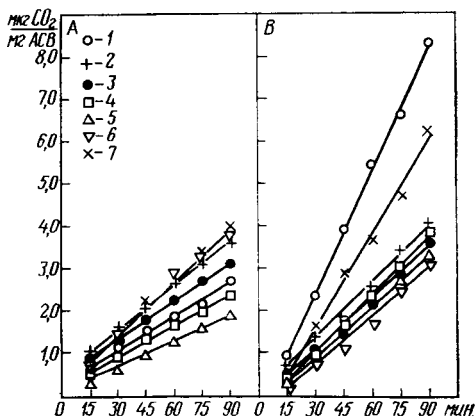


Рис. 3. Окисление 1-¹⁴C-тетрадекана дрожжами *S. guilliermondii*.

А — недиспергированный ультразвуком н-алкан; В — диспергированный ультразвуком; 1 — контроль; 2 — ГЛБ 15 (твин 80); 3 — ГЛБ 12; 4 — ГЛБ 10; 5 — ГЛБ 8; 6 — ГЛБ 6; 7 — ГЛБ 4,3 (спан 80).

Выводы

1. При культивировании дрожжей на средах с n-алканами в отсутствие лимита по кислороду с введением неионогенных поверхностно-активных веществ скорость потребления и окисления n-алканов снижалась.

2. Степень влияния неионогенных ПАВ на процесс культивирования дрожжей зависит от химической природы этих соединений.

3. При лимитировании процесса культивирования по кислороду неионогенные ПАВ могут стимулировать рост дрожжей, способствуя увеличению сорбции кислорода средой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гололобов А. Д., Давидов Е. Р., Разумов О. Б., Рачинский В. В. Влияние жирных кислот на адаптацию дрожжей к углеводородному типу питания. «Приклад. биохим. и микробиол.», 1969, т. 5, с. 245—251. — 2. Кучер Р. В., Карбан В. И. Исследование дисперсности эмульсий парафина, применяемых в процессе его микробиологического окисления. «Коллоидный журн.», 1970, т. 32, с. 724—728. — 3. Пашкова Т. Ю., Степанцов Г. В., Яковлев В. Ф. Влияние поверхностно-активных веществ на синтез β -галактодазы дрожжами *Candida pseudotropicalis*. «Микробиол. пром-сть», 1975, № 2, с. 11—13. — 4. Aiba S., Morit V., Someya J., Haung K. L. "J. Ferment Technol.", 1969, vol. 47, p. 203—210. — 5. Coty V. F., Corrin R. L., Heilweil I. J., Leavitt R. I., Srinivasan S. "Biotechnol. Bioeng.", 1971, vol. 13, p. 825—842. — 6. Goma G., Pareilleux A., Durand G. "Compt. Rend. Acad. Sci.", 1972, t. 275, p. 873—875. — 7. Gutierrez T. R., Erickson L. E. "Biotechnol. Bioeng.", 1977, vol. 19, p. 1331—1349. — 8. Mimura A., Watanabe S., Takedo I. "J. Ferment. Technol.", 1971, vol. 49, p. 255—271. — 9. Moo-Young M., Sni-muzu T. "Biotechnol. Bioeng.", 1971, vol. 13, p. 761—771. — 10. Tanaka A., Fukui S. "J. Ferment. Technol.", 1971, vol. 49, p. 809—816. — 11. Whitworth D. A., Moo-Young M., Viswanatha T. "Biotechnol. Bioeng.", 1973, vol. 15, p. 649—675.

Статья поступила 26 сентября 1978 г.

SUMMARY

It has been shown that in cultivating *Candida guilliermondii* yeast under conditions of limited content of carbon the non-ionogenic surface-active substances reduce the rate of consumption and oxidation of n-alkanes. With the limit of oxygen the surface-active substances can stimulate the growth of yeast increasing the rate of oxygen sorption by the medium.