

УДК 576.8+663.1+577.17.049]:621.039.85

ПОСТУПЛЕНИЕ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДА ПРИ РОСТЕ ДРОЖЖЕЙ НА Н-ОКТАДЕКАНЕ

Е. Г. ДАВИДОВА, А. П. БЕЛОВ

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

Ассимиляция микроэлементов микроорганизмами, в частности дрожжами, изучена недостаточно. Потребности в микроэлементах в основном определялись только в качественном отношении, и поэтому их вносят в среду почти всегда в произвольном

количестве. В то же время знание потребности микроорганизмов в микроэлементах и влияния их недостатка или избытка на рост и накопление биомассы совершенно необходимо для обеспечения эффективного культивирования микроорганизмов. Кроме

того, выявление условий, при которых повышается аккумуляция микроэлементов в биомассе в связанном виде в составе органических компонентов биомассы, позволило бы получать белково-витаминные концентраты (БВК), обогащенные микроэлементами.

Иод, согласно классификации С. Дж. Порта [2], относится к редко требуемым микроэлементам. Вместе с тем есть сведения, что для роста дрожжей рода *Candida* на *n*-парафинах присутствие йодид-ионов в питательной среде необходимо [3]. Однако количественные потребности дрожжей в йодид-ионах в зависимости от условий выращивания неизвестны. Нет сведений о предельно возможной концентрации йода в среде культивирования. Не установлено также, образуются ли у дрожжей органические соединения, в структуру которых включается йод, и если такие соединения образуются, то насколько прочно он связан. В связи с этим нами исследовалась динамика поступления йода в клетку и его внутриклеточное распределение при росте *Candida guilliermondii* в среде, содержащей KI.

Методика

Дрожжи *C. guilliermondii*, полученные из музея культур ВНИИ синтезбелок, выращивали в стационарных условиях в течение 24 ч при температуре 32° в жидкой питательной среде, содержащей $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ — 3 г; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 0,5; K_2SO_4 — 0,2; MgSO_4 — 0,2 г; CuSO_4 — 0,08 мг; FeCl_3 — 0,4; MnSO_4 — 0,8; Na_2MoO_4 — 0,4; ZnSO_4 — 0,8 мг на 1 л воды. Источником углерода служил *n*-октадекан. Дрожжевые клетки отделяли от питательной среды центрифугированием, промывали и помещали в новую среду, содержащую те же минеральные компоненты с добавкой KI* (индикатор ^{125}I). В том случае, когда исследовали возможность поступления йода в дрожжевые клетки, исходная концентрация биомассы составляла 12 мг/мл, а концентрация йода варьировала от 0,02 до 150 мкг/мл. Инкубация проводилась при 32° в течение 30 мин без добавки источника углерода. При исследовании метаболизации йода исходная концентрация биомассы составляла 0,5 мг/мл, а концентрация йода — 0,1—900 мкг/мл. В среду вносили *n*-октадекан в количестве 1 об.%. Выращивание проводили в течение 20 ч при температуре 32°.

Содержание меченого йода определяли в исходной питательной среде, в биомассе и питательной среде после инкубации. Дрожжевые клетки отделяли от жидкой фазы центрифугированием. Из надосадочной жидкости отбирали пробы по 1 мл, которые помещали в сосуды для измерения радиоактивности. Осадок дрожжей промывали 3 раза водой, суспендировали в определенном объеме воды и отбирали алиquotы суспензии объемом 1 мл, которые также помещали в сосуды для определения активности меченого йода. Измерения производили при помощи сцинтилляционного радиометра Компыю-гамма фирмы ЛКБ. Концентрацию йода рассчитывали в микрограммах по предварительно установленной удельной активности меченого йода.

При определении внутриклеточного распределения йода дрожжевые клетки, выра-

щенные в жидкой питательной среде, содержащей 200 мкг меченого йода на 1 мл и 1% *n*-октадекана, суспендировали в 10 мл воды. В этом случае концентрация биомассы составляла 50 мг/мл. Разрушение клеток производили при помощи гомогенизатора с буссами Баллотини. Полученный гомогенат центрифугировали при 1500 г в течение 10 мин. Осадок, в котором в основном содержались клеточные стенки, суспендировали в небольшом количестве воды (3 мл), и из суспензии отбирали пробы по 1 мл для измерения активности меченого йода. Надосадочную жидкость центрифугировали при 100 000 г в течение 60 мин и получали осадок, который представлял собой фракцию внутриклеточных мембран. Он также был ресуспендирован в воде и из полученной суспензии были отобраны алиquotы по 1 мл для измерения радиоактивности меченого йода, содержащегося в клеточных мембранах. В надосадочной жидкости после второго центрифугирования остаются растворимые компоненты клетки, в том числе растворимые белки. Эта фракция при помощи колонки сефадекса G-25 (длинной 25 см и диаметром 2,5 см) была разделена на две фракции: высокомолекулярные и низкомолекулярные растворимые вещества. Радиоактивность содержащегося в них йода определялась тем же способом, что и остальных субклеточных фракций. Контролем служило распределение йода между субклеточными фракциями клеток, выращенных в аналогичных условиях, но без меченого йода. Последний был внесен только после разрушения клеток в исходном гомогенате.

Локализация меченого йода в растворимых белках дрожжевой клетки определялась следующим образом. Высокомолекулярную растворимую фракцию, полученную из гомогената дрожжей после выращивания в среде с меченым йодом, осаждали трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация кислоты составила 7%) и осадок промывали водой. Затем суспендировали в 50 миллимолярном трис-HCl буфере с pH 8 и добавляли протеназу K из расчета 2 мг/мл. Инкубировали при комнатной температуре в течение 24 ч. Инкубационную смесь подкисляли 1 н. HCl и проводили экстракцию аминокислот *n*-бутанолом. Спиртовой экстракт упаривали на роторном испарителе и фракционировали при помощи тонкослойной хроматографии. Хроматографирование проводили на пластине с силикагелем Мерк в системе бутанол—ацетон— NH_4OH в соотношении 1:4:1. Для измерения распределения радиоактивности с каждой 0,5 см зоны хроматограммы счищали силикагель и вносили его в сосуды, используемые для измерения радиоактивности гамма-источников в радиометре Компыю-гамма. По полученным данным строили профиль радиохроматограммы.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены данные о распределении меченого йода между жидкой фазой и биомассой после 30-минутной инкубации дрожжей в фазе интенсивного роста в питательной среде, содержащей меченый йод в концентрациях 0,2 и 10 мкг/мл. Эти данные показывают, что йод поступает в

Поступление меченого йода в дрожжевые клетки

Исходная концентрация		Равновесная концентрация в среде 10 ⁶ имп/мин	Содержание в биомассе	
мкг/мл	10 ⁶ имп/мин		10 ⁶ имп/мин	мкг/г
0,2	28,52	27,3±0,2	0,044±0,001	0,015
10	3,02	2,86±0,05	0,0012±0,0001	0,036

дрожжевую клетку в очень незначительных количествах, 95 % заданного йода остается в среде инкубации. Причем прочно связано с биомассой (после 4-кратной промывки водой или раствором питательной среды) 1,2—1,5 % исходного количества йода при исходной концентрации в среде 0,2 мкг/мл и 0,36—0,41 % — при 10 мкг/мл. Это озна-

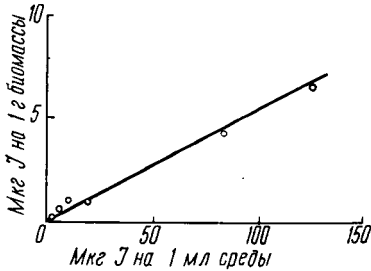


Рис. 1. Квазиизотерма сорбции I* дрожжевыми клетками.

чает, что в первом случае в клетки поступает и прочно удерживается йода 0,014 мкг/г, а во втором — 0,036 мкг.

Таким образом, йод, хотя и в небольших количествах, но сорбируется дрожжевыми клетками. Сорбция, согласно данным табл. 1, должна зависеть от исходной концентрации йода в среде инкубации.

Для выявления этой зависимости была произведена оценка количества поглощенного биомассой йода при инкубации дрожжей в аналогичных условиях в среде, со-

державшей различное количество меченого йода ($K^{125}I$) — от 0,02 до 150 мкг I* на 1 мл при постоянном соотношении биомассы и жидкой фазы. Полученные данные были использованы для построения квазиизотермы сорбции йода дрожжевыми клетками (рис. 1). Она имеет линейную форму. Это означает, что масса йода, связываемого дрожжевыми клетками в данных условиях, пропорциональна концентрации йода в среде инкубации и использование высоких концентраций йода может обеспечить довольно значительное включение йода в биомассу дрожжей — выше 6,5 мкг на 1 г. Однако известно, что ион йода обладает высокой реактивностью и может оказаться токсичным для дрожжей. Поэтому, вероятно, большие концентрации йода во время культивирования дрожжей использовать нельзя.

Нами сделана попытка установить предел концентрации йода, при котором не отмечается торможения роста дрожжей, а также уровень накопления йода в биомассе в таких условиях.

Данные о накоплении биомассы и количестве в ней йода при концентрациях йода в питательной среде от 0,1 до 900 мкг на 1 мл приведены в табл. 2. Они свидетельствуют, что дрожжи рода *Candida* выдерживают довольно большие концентрации йода. Снижение накопления биомассы наблюдается только при концентрации выше 500 мкг/мл. Уровень накопления йода в биомассе дрожжей, как и его сорбция, зависят от концентрации этого элемента в питательной среде. При использовании относительно низких концентраций йода (до

Т а б л и ц а 2

Накопление меченого йода в дрожжевых клетках во время их инкубации в течение 36 ч в питательной среде, содержащей KI*

Концентрация в питательной среде		Концентрация биомассы, г/мл	Концентрация I* в биомассе		
имп/мин · мл	мкг/мл		имп/мин	мкг	мкг/г
3 698±36*	0,10±0,001	0,100±0,01	2 703±53	0,0731±0,002	0,731±0,006
18 490±360*	0,50±0,01	0,110±0,110	15 380±800	0,416±0,02	3,78±0,02
37 470±340*	1,01±0,01	0,113±0,018	58 200±380	1,57±0,01	13,89±0,09
349 600±1400*	9,45±0,04	0,124±0,001	415 580±1400	11,24±0,04	90,65±0,32
39 030±1200**	69,7±2,1	0,103±0,015	19 790±100	35,3±0,21	342,7±1,6
88 450±930**	157,9±1,6	0,129±0,025	28 780±99	51,4±0,17	398±1,3
179 600±3400**	320±6	0,109±0,030	46 420±290	82,9±0,51	760±5
271 700±2100**	485±4	0,106±0,016	34 680±360	61,9±0,64	584±6
353 400±8300**	631±15	0,095±0,005	37 150±130	66,3±0,21	698±2
507 100±3500**	905±6	0,084±0,009	34 850±400	62,2±0,71	740±8

* Удельная активность 1 мкг I* 36 980 ÷ 720 имп/мин.

** То же — 560,2±8,9 имп/мин.

Распределение меченого йода между субклеточными фракциями дрожжей, выращенных в течение 24 ч на среде, содержащей KI* (200 мкг I* на 1 мл). Удельная активность I* $47.5 \pm 1,2$ имп/мин·мкг

Субклеточная фракция	имп/мин·мл	мкг I *	% от суммы по фракциям
Исходная активность гомогената (1)	14 250±360	300	—
Растворимая низкомолекулярная фракция	4 578±170	96,4	38,5
Растворимая высокомолекулярная фракция	504±17	10,6	4,23
Мембраны	1895±17	39,9	15,9
Клеточные стенки	4 928±120	103,7	41,4
Сумма по фракциям (2)	11 900±39	250,5	100
Разность между (1) и (2)	-2 350±400	-49,5	—

320 мкг/мл) накопление его биомассой дрожжей увеличивается практически пропорционально повышению концентрации йода в среде. При дальнейшем ее возрастании уровень накопления йода в биомассе становится постоянным и составляет около 700 мкг/г.

Таким образом, установлено, что при выращивании дрожжей в жидкой питательной среде возможно использование повышенных концентраций йода — до 500 мкг/мл, которые могут обеспечить получение биомассы дрожжей, содержащей довольно большое количество йода — до 700 мкг на 1 г, причем он относительно прочно закреплен, так как вымывания его из клеток после многократной промывки водой или солевым раствором не происходит.

Представляет интерес выяснить, где и в каком виде локализуется йод в дрожжевой клетке. Для решения этой задачи проведено исследование распределения йода между структурными компонентами дрожжевой клетки. Из дрожжевых клеток, выращенных в жидкой питательной среде, содержащей 200 мкг I* на 1 мл, был выделен ряд субклеточных фракций и в них определялось содержание йода. Полученные данные свидетельствуют, что меченый йод распределяется между структурными компонентами дрожжевой клетки неравномерно (табл. 3). В основном он сосредотачивается в низкомолекулярной растворимой фракции (39 %) и фракции клеточных стенок (41 %). Высокомолекулярная растворимая фракция, представленная в основном растворимыми белками, содержит наимень-

шее количество меченого йода — 4,2 %. Распределение йода не соответствует распределению массы органических веществ между фракциями. Так, при использовании данной методики фракционирования масса углерода растворимой фракции составляет 20 % суммарной массы углерода гомогената, клеточных стенок — 37, а клеточных мембран — 42 %. В то же время во фракции клеточных мембран содержится только 16 % суммарного меченого йода (табл. 3).

Следует отметить, что использованная нами методика выделения клеточных структур позволяет только грубо разделить гомогенат клеток, т. е. полученные фракции не подвергались дополнительной очистке и должны содержать значительное количество примесей (но не больше, чем 15 %). Такой способ был нами специально выбран с целью сведения потерь йода во время фракционирования до минимума. Сведение баланса меченого йода (табл. 3) показало, что потери его во время фракционирования составили не более 17 % (разность между исходной активностью гомогената и суммой активности выделенных фракций). Кроме того, мы учитывали наличие возможности перераспределения йода во время фракционирования клеточных структур из-за частичного гидролиза йода в водной среде и возможного вторичного йодирования органических соединений в данной среде. Поэтому параллельно определялось распределение меченого йода, внесенного непосредственно в гомогенат немеченых дрожжей (табл. 4). В данном случае оно совершенно не соответствовало распределе-

Т а б л и ц а 4

Распределение меченого йода между субклеточными фракциями дрожжей при внесении его в гомогенат разрушенных клеток. Удельная активность I* $17 200 \pm 140$ имп/мин·мкг

Субклеточная фракция	имп/мин	мкг I *	% исходной активности	% от суммы по фракциям
Исходная активность гомогената	344 000±2800	20	100	—
Растворимая низкомолекулярная фракция	239 300±1200	13,9	69,6	90,8
Растворимая высокомолекулярная фракция	2 515±12	0,15	0,73	0,95
Мембраны	8 676±130	0,50	2,52	3,29
Клеточные стенки	13 119±200	0,76	3,81	4,97
Сумма по фракциям	263 600±1500	15,3	76,6	100

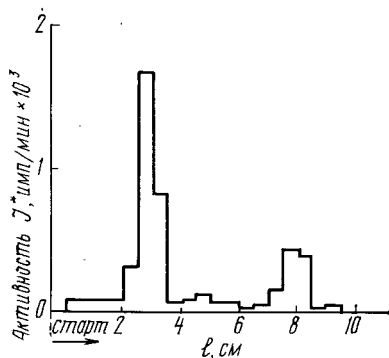


Рис. 2. Радиохроматограмма гидролизата йодированных растворимых белков дрожжей, выращенных в среде, содержащей I*.

нию йода между фракциями, выделенными из дрожжей, которые были выращены в среде, содержащей меченый йод (табл. 3). В контрольной пробе практически весь меченый йод обнаруживается во фракции низкомолекулярных растворимых веществ. Во фракции клеточных стенок локализуется только 5 % меченого йода, а во фракции клеточных мембран и высокомолекулярных органических веществ еще меньше — соответственно 3 и 1 %. Следовательно, установленное нами распределение йода между субклеточными фракциями дрожжей, выращенными в среде, содержащей меченый йод, не является артефактом, обусловленным способом выделения клеточных структур. Сорбционное сродство клеточных структур к йоду в данных условиях совершенно не соответствует удельному содержанию йода, накапливаемого во время выращивания дрожжей в клеточных структурах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Войнар А. И. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека. М.: Высшая школа, 1960. — 2. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. — 3. Sato M., Nakahara T.,

Таким образом, наши исследования показали, что хотя и в небольших количествах йод проникает в дрожжевую клетку и накапливается в ней и закрепляется в ее органических компонентах. Так, проведенное нами дополнительное исследование локализации меченого йода в белках, входящих в состав высокомолекулярной растворимой фракции, позволило установить, что йодирование белков происходит главным образом по тирозину.

На рис. 2 представлен профиль радиохроматограммы аминокислот, полученных после гидролиза растворимых белков протеиназой К. Он свидетельствует, что основная активность меченого йода локализована в зоне 25—30 мм, которая соответствует в данных условиях хроматографирования зоне моноидотирозина, для которого $R_f = 27,8$ мм. Этот результат согласуется с имеющимися в литературе данными о том, что йодирование белков животных происходит по тирозину [1].

Особый интерес представляет обнаруженный нами факт, что довольно большая часть (до 40 %) накапливаемого в клетках дрожжей йода во время роста содержится в клеточных стенках, в то время как содержание йода во фракции мембран незначительно. Клеточные стенки дрожжей рода *Candida* построены главным образом из полисахаридов маннана и глюкана. Йодирование полисахаридов микроорганизмов возможно, о чем свидетельствуют данные, представленные в работе [4]. Локализация значительного количества йода в клеточных стенках дрожжей позволяет высказать предположение, что экспериментально доказанная возможность роста дрожжевых клеток при больших концентрациях йода в питательной среде может быть в некоторой степени обусловлена тем, что клеточные стенки удерживают значительное количество йода, поступающего из среды в клетку дрожжей.

Yamada K. — *Agric. Biol. Chem.*, 1972, vol. 36, p. 2025—2040. — 4. Patel G. B., Breui C. — *Archiv. of Microbiol.*, 1981, vol. 29, N 4, p. 265—267.

Статья поступила 25 мая 1983 г.

SUMMARY

It is found that yeast cells can sorb iodine. Isotherm of its sorption is of linear form, i. e. the amount of iodine sorbed by the cells corresponds to its concentration in the media.

It is also shown that growing yeast in liquid nutrient substrate permits to apply increased concentrations of iodine. Under iodine concentration up to 500 mkg per 1 ml the growth of yeast does not decrease. Under such conditions accumulation of well-fixed iodine occurs up to 700 mkg per 1 g of biomass. This iodine is mainly localized in cell walls (41 per cent) and low-molecular soluble fraction (39 per cent).