

УДК 582.282.23:581.1

ГИДРОФОБНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ Н-АЛКАНОВ С ДРОЖЖЕВЫМИ КЛЕТКАМИ В СРЕДЕ КУЛЬТИВАЦИИ

Е. Г. ДАВИДОВА, А. Г. СИУШЕВА, В. В. РАЧИНСКИЙ

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

Термин «гидрофобные взаимодействия» был введен Кауцманом [14] для описания взаимного притяжения неполярных молекул или радикалов в водной среде. Такие взаимодействия обусловлены рядом физико-химических факторов, и в первую очередь структурными изменениями, происходящими в воде в присутствии неполярных молекул или радикалов, и ван-дер-ваальсовыми притяжениями самих неполярных молекул или радикалов [4].

Лучшей моделью неполярных молекул являются углеводороды. Согласно современным представлениям, растворение углеводородов в воде приводит к уменьшению энтропии системы в результате увеличения доли упорядоченных элементов в структуре воды. Поэтому удаление молекул углеводорода из воды (переход в неполярное окружение) сопровождается увеличением энтропии и переходом системы в более выгодное энергетическое состояние.

В настоящее время эту модель используют для обнаружения гидрофобных взаимодействий в макромолекулах белков и для исследования структуры белковых молекул [1, 4], а также при выяснении роли гидрофобных взаимодействий в биокаталических процессах и изучении механизмов переноса и обмена соединений липидного характера [15].

При исследовании поглощения и транспорта н-алканов возникло предположение, что взаимодействие последних с дрожжевыми клетками в жидкой питательной среде имеет гидрофобный характер. В частности, это подтверждают обнаруженный непосредственный контакт н-алканов с дрожжевыми клетками [5, 11], наличие сорбционного сродства и определенной емкости сорбции н-алкана у дрожжевых клеток и клеточных структур [2, 3], а также установленное стабилизирующее действие дрожжевых клеток на углеводородную эмульсию [10]. Сведения о химическом составе и архитектонике клеточной стенки дрожжей рода *Candida* [9] позволяют заключить, что и в периферийном слое, и в толще клеточной стенки находится значительное количество нейтральных участков, которые могут служить местом контакта молекул или капелек углеводородной эмульсии. Возникновение этих контактов должно обеспечиваться стремлением систе-

мы к минимуму межфазной свободной энергии.

Гидрофобные взаимодействия можно охарактеризовать следующими термодинамическими параметрами: изменением свободной энергии (ΔF), энтальпией (ΔH) и энтропией (ΔS) системы [1, 4]. Целью настоящей работы было определение указанных параметров для характеристики взаимодействия дрожжевых клеток с н-алканами в жидкой синтетической среде в статических условиях выращивания дрожжей.

Методика

Объектом исследования служили дрожжи родов *Candida* и *Saccharomyces*. Использовали н-алканы с различной длиной углеродной цепи, меченные ^{14}C в первом положении, производства фирмы «Изотоп» (СССР) и «Изокомерц» (ГДР).

Взаимодействие н-алканов с дрожжевыми клетками можно рассматривать как процесс распределения углеводорода между двумя несмешивающимися фазами (водная фаза или раствор электролитов и органическая фаза — собственно биомасса дрожжевых клеток). Третью фазу — водную среду в клетках дрожжей — в данном случае не рассматриваем. Такой подход позволяет вычислить константу распределения K углеводорода между водной фазой и клетками и оценить изменение свободной энергии при связывании н-алкана с поверхностью клетки, а также изменения энтальпии и энтропии процесса [2].

Для расчета термодинамических параметров связывания н-алканов с клетками дрожжей необходима оценка концентрации н-алкана в биомассе и водной среде во время этого процесса. Концентрацию н-алканов определяли радиометрически с использованием метода радиоактивных индикаторов, а концентрацию биомассы — весовым методом.

Эксперимент сводился к следующему. Дрожжевые клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, отмывали от среды культивации и помещали в целлюлозные центрифужные пробирки, содержащие 5 мл водного раствора минеральных компонентов среды культивации (по 10 г $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ и K_2HPO_4 ; 0,7 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; по 12,5 мг

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 мг NaCl на 1 л воды) и 1 мл н-алкана, меченного ^{14}C . Концентрация биомассы обычно составляла 1—2 мг/мл. Перемешивание системы производили в термостатированной чашке G-76 фирмы Нью Брунвик в течение 5 мин. Согласно нашим данным [8], этого времени достаточно для достижения насыщения биомассы н-алканом.

Разделение фаз осуществляли при помощи центрифугирования суспензии на центрифуге ЦУМ при 10 000 об/мин в течение 5 мин. При центрифугировании происходило не только отделение осадка биомассы, но и расслаивание водной фазы и н-алкана.

Для определения количества н-алкана, поглощенного клетками, осадок отделяли от надосадочной жидкости, переносили его в другую пробирку и гидролизовали с 1 н. NaOH. Чтобы предотвратить перемешивание фаз во время отделения осадка или загрязнение осадка углеводородом, адсорбированным на стенках пробирки, надосадочную жидкость отсасывали шприцем, а затем центрифужную пробирку срезали на уровне осадка и удаляли верхнюю часть пробирки. Из гидролизата осадка отбирали пробы объемом 0,1 или 0,2 мл, помещали их в сцинтилляционную смесь, приготовленную на основе диоксана, и измеряли активность ^{14}C при помощи радиометра Марк II фирмы Нуклеар Чикаго. Активность ^{14}C проб выражали в абсолютных единицах расп/мин, используя стандартные кривые гашения. Полученные значения и предварительно определенную удельную активность ^{14}C -алкана использовали при расчете концентрации сорбированного биомассой н-алкана в молях на 1 л биомассы. Массу микроорганизмов переводили в единицы объема, исходя из того, что плотность биомассы дрожжей составляет 1,1 г/мл [6].

Параллельно производили определение растворенного в водной фазе н-алкана. Пробы для измерения активности ^{14}C отбирали шприцем, прокалывая пробирку в зоне водной фазы. Измерение активности проб осуществляли согласно описанному выше способу. Концентрацию н-алкана в водной среде рассчитывали в молях на 1 л.

Полученные значения концентрации н-алкана в воде и в биомассе использовали для определения коэффициентов распределения K и термодинамических параметров ΔF , ΔH и ΔS по формулам, приведенным в работе [2].

Результаты и их обсуждение

Изучение распределения н-додекана между фазами при взаимодействии дрожжей *Candida tropicalis* с ^{14}C -додеканом в жидкой питательной среде показало, что сорбция углеводорода биомассой клеток в интервале температур 15—30° изменяется незначительно (таблица). При температуре ниже 15 и выше 30° количество поглощенного биомассой н-алкана несколько уменьшалось. Подобный эффект был обнаружен ранее при внедрении углеводородов в мицеллы додецилсульфата натрия и при солюбилизации углеводородов в растворах

Сорбция н-додекана биомассой дрожжей при различных температурах ($m = 1,5$ мг/мл; $V = 5$ мл; $t = 5$ мин)

$t, ^\circ\text{C}$	$c_1,$ моль/л	$K, c_1/c_2$	$\Delta F,$ ккал/моль	$\Delta S,$ ккал/моль \times град
8	0,599	927	-3,81	—
15	0,754	853	-3,86	13,4
22	0,705	1000	-4,05	13,7
30	0,775	880	-4,08	13,5
40	0,529	600	-3,97	—

белков [4]. Данные таблицы свидетельствуют об относительной стабильности гидрофобных областей поверхности дрожжевых клеток в интервале температур 15—30°.

Константа распределения н-додекана между клетками и водной фазой в интервале температур 8—30° оставалась постоянной (в пределах ошибки опыта): $K = 915 \pm 98$ при $\alpha = 95\%$. В таком случае, согласно уравнению (3), при постоянстве K $\Delta H = 0$. Это означает, что энтальпия процесса очень мала (близка к нулю), а его энтропия определяется в основном свободной энергией системы. Степень изменения свободной энергии для интервала температур 15—30° примерно постоянна: $\Delta F = -3,99 \pm 0,28$ при $\alpha = 95\%$. Поскольку связывание н-додекана дрожжевыми клетками характеризуется небольшим отрицательным изменением свободной энергии, энтропия процесса, согласно уравнению (4), положительна.

ΔS в интервале температур 15—30° примерно постоянно и составляет $13,5 \pm 0,3$ ккал/моль·град. Следовательно, взаимодействие н-алканов с дрожжевыми клетками происходит аналогично переносу углеводородов из воды в неполярное окружение и сопровождается уменьшением свободной энергии и увеличением энтропии системы, т. е. первичное накопление н-алкана в дрожжевых клетках является самопроизвольным термодинамическим процессом (согласно второму принципу термодинамики).

Полученные значения ΔF и ΔS являются характерными для гидрофобного взаимодействия [1, 4]. Наличие гидрофобных участков в клеточной стенке, как уже отмечалось, обусловлено ее химическим составом и архитектурной. По данным [7], в периферийном слое клеточной стенки дрожжей рода *Candida* содержится хитин, который может быть ответственным за ее гидрофобность. Гидрофобность поверхности дрожжевых клеток, по мнению других авторов [12, 15], обусловлена наличием специфического полисахарид-липидного комплекса, дискретно расположенного в клеточной стенке.

По аналогичной методике была проведена оценка ΔF для н-гекса и н-октадекана. Значения ΔF составляют соответственно $-4,08 \pm 0,03$ и $-3,86 \pm 0,04$ ккал/моль ($M \pm tm$, доверительная вероятность 95%, $p = 6$), зависимости ΔF от длины углеродной цепи н-алкана не наблюдается, так как

значения ΔF в пределах ошибки опыта постоянны.

Оказалось также, что данная величина не зависит от метаболической способности дрожжевых клеток. Предварительная тепловая обработка клеток или ингибирование роста путем добавления в инкубационную среду NaN_3 не влияли на степень изменения свободной энергии системы. Так, значение изменения свободной энергии связывания *n*-октадекана с дрожжами *S. tropicalis* после тепловой обработки составило $-3,65 \pm 0,16$; в случае ингибирования дыхания NaN_3 $-3,75 \pm 0,12$, а в контроле $-3,85 \pm 0,6$ ккал/моль ($M \pm m$, доверительная вероятность 95 %, $n=4$).

Эти данные еще раз показывают, что связывание *n*-алкана дрожжевыми клетками является процессом, идущим без затраты метаболической энергии. Сорбция *n*-алкана, как было показано ранее [3], обусловлена архитектурой самих дрожжевых клеток, в том числе и степенью их гидрофобности. Следует отметить, что поскольку ΔF зависит от характера дифильных молекул, она обычно принимается в качестве меры степени гидрофобности молекул, например, аминокислот [16]. В таком случае можно ожидать, что значения ΔF связывания *n*-алкана дрожжами различных видов и даже штаммов могут быть неодинаковыми, если различия в структуре клеточной стенки достаточно велики.

Определение ΔF при взаимодействии *n*-додекана с дрожжевыми клетками в водной среде показало, что такие различия действительно имеются. Значения ΔF связывания *n*-додекана в водной среде при температуре 30° клетками дрожжей *S. tropicalis* и *S. guilliermondii*, выращенных на *n*-алканах, составляют соответственно $-4,07 \pm 0,17$ и $-4,43 \pm 0,20$ ккал/моль. Они существенно отличаются от значений этой

величины у дрожжей *S. lipolytica* и *Saccharomyces cerevisiae*, выращенных на глюкозе, которые составляют соответственно $-2,74 \pm 0,13$ и $-2,66 \pm 0,24$ ккал/моль.

Ранее было отмечено [12], что дрожжи *S. cerevisiae* не сорбируют *n*-алканы. Результаты нашего исследования, однако, свидетельствуют о том, что *n*-алканы взаимодействуют не только с дрожжами рода *Candida*, потребляющими *n*-алканы, но и с дрожжами *S. cerevisiae*, которые не растут на этом углеродном субстрате. Полученные нами значения ΔF , а следовательно, и гидрофобность этих дрожжей действительно значительно меньше гидрофобности дрожжей *S. tropicalis* и *S. guilliermondii*, выращенных на *n*-алканах, но она приблизительно равна гидрофобности дрожжей *S. lipolytica*, выращенных на глюкозе. В таком случае неспособность дрожжей *S. cerevisiae* потреблять *n*-алканы объясняется не отсутствием контакта с *n*-алканами и их транспорта внутрь клеток, а какими-то другими факторами. Можно предположить, что малая чувствительность используемого указанными авторами метода не позволила им обнаружить сорбцию *n*-алкана дрожжами *S. cerevisiae*.

Таким образом, первичное взаимодействие дрожжевых клеток с *n*-алканами в среде культивации имеет гидрофобный характер. Процесс связывания *n*-алкана с клетками является самопроизвольным термодинамическим процессом. Клетки дрожжей, относящиеся к различным родам и видам, могут различаться между собой по степени изменения свободной энергии системы ΔF , характеризующей гидрофобность клеточной поверхности.

Авторы приносят благодарность проф. В. Н. Измайловой за научную консультацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волькенштейн И. В. Молекулярная биофизика. М.: Наука, 1975. — 2. Давидова Е. Г., Деманова Н. В., Рачинский В. В., Гололобов А. Д., Давидов Е. Р. Первичное распределение *n*-алкана по структурам дрожжевых клеток. — Микробиология, 1975, т. 44, с. 888—893. — 3. Давидова Е. Г., Рачинский В. В., Сиушева А. Г. Транспорт *n*-алканов в клетки дрожжей *Candida*. — Изв. ТСХА, 1977, вып. 2, с. 17—23. — 4. Измайлова В. Н., Ребиндер П. А. Структурообразование в белковых системах. М.: Наука, 1974. — 5. Мейсель М. Н., Медведева Г. А., Бирюзова И. В., Козлова Т. П. Функциональная цитология дрожжевых организмов, окисляющих углеводороды. Микробиол. синтез, 1969, вып. 8, с. 1—9. — 6. Новаковская С. С. Справочник технологии дрожжевого производства. М.: Пищ. пром-ность, 1973. — 7. Петрушко Г. М., Калюжный М. Я. Хитин дрожжеподобных микроорганизмов рода

- Candida*. — Прикл. биохим. и микробиол., 1971, вып. 7, с. 637—641. — 8. Рачинский В. В., Давидова Е. Г., Лапотышкина А. И. Локализация окисления *n*-парафинов дрожжами. — Докл. АН СССР, сер. биол., 1971, т. 200, с. 457—462. — 9. Шкляр Б. Х. Ферментативный лизис дрожжей. Минск: Наука, 1975. — 10. Blanch H. W., Fiechter A. — Biotech. Bioeng., 1974, vol. 16, p. 539—546. — 11. Einsele A., Sneider H., Fiechter A. — Proc. IV internat. sympos. on yeasts, Vienna, 1974, Part 1, p. 91. — 12. Käppeli O., Fiechter A. — Biotech. bioeng., 1976, vol. 18, p. 967—971. — 13. Käppeli O., Fiechter A., — J. Bacteriol., 1977, vol. 131, p. 917—922. — 14. Kauzmann W. — Adv. Protein Chem., 1959, vol. 14, p. 1—5. — 15. Singer T. P. — Structure and function of biological membranes. — N. Y. Acad. Press, 1971, p. 145. — 16. Tanford G.-J. Amer. Chem. Soc., 1962, vol. 84, p. 4240—4247.

SUMMARY

Thermodynamic parameters ΔF , ΔH and ΔS are estimated under interaction of yeast cells with n-alkanes in water medium. The obtained values of the parameters reveal the hydrophobic nature of binding n-alkanes with the cells. Species of yeasts of *Candida* genus differ in ΔF values, that is why the latter may be used to characterize the degree of yeast hydromorphism.