

УДК 576.8.095:633.12:546.73:621.039.85

НАКОПЛЕНИЕ МЕЧЕНОГО КОБАЛЬТА В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ

Е. Г. ДАВИДОВА, А. П. БЕЛОВ, В. В. РАЧИНСКИЙ

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

Исследовалась способность дрожжей к аккумуляции кобальта в биомассе. Установлено, что дрожжевые клетки могут накапливать кобальт вследствие неметаболического поглощения. Квазиизотерма сорбции кобальта дрожжевыми клетками описывается уравнением типа изотермы сорбции Фрейндлиха. В результате метаболизации кобальта во время роста дрожжей в жидких средах, обогащенных этим элементом (от 2 до 20 мкг Co^{2+} в 1 мл), уровень его накопления в биомассе увеличивается на порядок по сравнению с количеством кобальта при неметаболической сорбции и достигает 400 мкг на 1 г дрожжей. Рост дрожжей существенно подавляется при концентрации кобальта в среде более 20 мкг в 1 мл.

Кобальт необходим для роста микроорганизмов, в том числе и для дрожжей рода *Candida*, используемых в микробиологическом производстве кормовых белков. Дрожжи способны накапливать значительные количества кобальта [2], хотя большие концентрации последнего

в питательной среде приводят к угнетению их роста [2, 3]. В связи с проводимыми в настоящее время исследованиями возможности использования дрожжей и других микроорганизмов в качестве биосорбентов тяжелых металлов [4] представляет интерес изучение способности дрожжей рода *Candida* к повышенной аккумуляции кобальта в биомассе в условиях нормального роста. С этой целью при помощи метода радиоактивных индикаторов исследовались сорбционная способность дрожжей по отношению к кобальту, а также влияние различных концентраций кобальта в жидкой питательной среде на рост дрожжей и уровень его аккумуляции в дрожжевых клетках.

Дрожжи *Candida guilliermondii*, полученные из коллекции института ВНИИсинтезбелок, культивировали в стационарных условиях в жидкой питательной среде следующего минерального состава на 1 л: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ — 3 г; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 0,5 г; MgSO_4 — 0,2 г; K_2SO_4 — 0,2 г; CuSO_4 — 0,08 мг; FeCl_3 — 0,4 мг; MnSO_4 — 0,8; Na_2MoO_4 — 0,4 мг; ZnSO_4 — 0,8 мг, вода деминерализованная. Источником углерода служил *n*-гексадекан. Использовали кобальт в форме CoCl_2 , меченный радиоактивным изотопом ^{57}Co .

При исследовании условно неметаболической стадии сорбции Co^* дрожжами инкубацию проводили в 3 мл воды с концентрацией Co^* от 0,1 до 147 мкг/мл. Концентрация биомассы во всех пробах была одинаковой и равнялась 5,7 мг/мл. Использованные дрожжевые клетки находились в фазе интенсивного роста на среде, содержащей 0,01 мкг немеченного кобальта в 1 мл. Время инкубации 10 мин, температура инкубации 30°. После инкубации жидкую фазу отделяли от биомассы и определяли радиоактивность осадка и надосадочной жидкости при помощи радиометра Компью-гамма (ЛКВ, Швеция).

При изучении влияния различных концентраций кобальта на рост дрожжей и метаболическое накопление его в клетках дрожжи выращивали в жидкой питательной среде, в которую вносили различное количество меченого кобальта — от 0,0125 до 1000 мкг/мл. Источником углерода служил также *n*-гексадекан (0,5 % об.). Культивирование осуществляли на термостатированной качалке при 30° и 200 об/мин в колбах объемом 700 мл, содержащих 100 мл питательной среды. Время выращивания 24—36 ч.

Для определения наличия кобальтсодержащих белков дезинтеграцию клеток производили при помощи стеклянных бус Валлотини диаметром 0,5 мм. Гомогенат центрифугировали при 2000 г в течение 15 мин для удаления неразрушенных клеток и клеточных стенок, затем надосадочную жидкость центрифугировали при 105000 г в течение 80 мин. Полученную растворимую фракцию пропускали через колонку

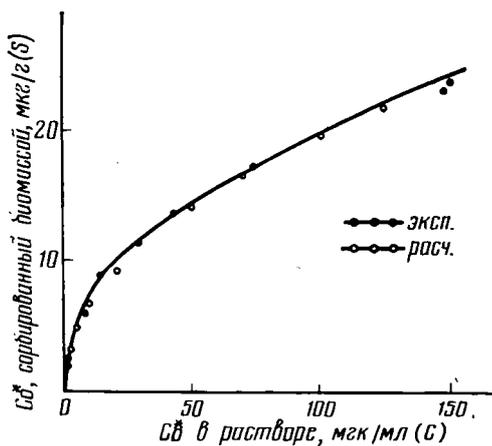


Рис. 1. Квазиизотерма сорбции Co^* дрожжевыми клетками $S = f(C)$.

сефадекса G-25 (высота 300 мм, диаметр 23 мм) и разделяли на высокомолекулярные и низкомолекулярные вещества. Фракцию высокомолекулярных веществ разделяли на колонке сефакрила S-300 (высота 800 мм, диаметр 50 мм), предварительно откалиброванную набором белков известной молекулярной массы. Элюирование вели деионизированной водой со скоростью 0,65 мл/мин. Объем фракции, нанесенный на колонку, составлял 3 мл. Во время элюции отбирали пробы по 5 мл, и в них определяли содержание белка по методу Лоури и его радиоактивность. На основании полученных данных

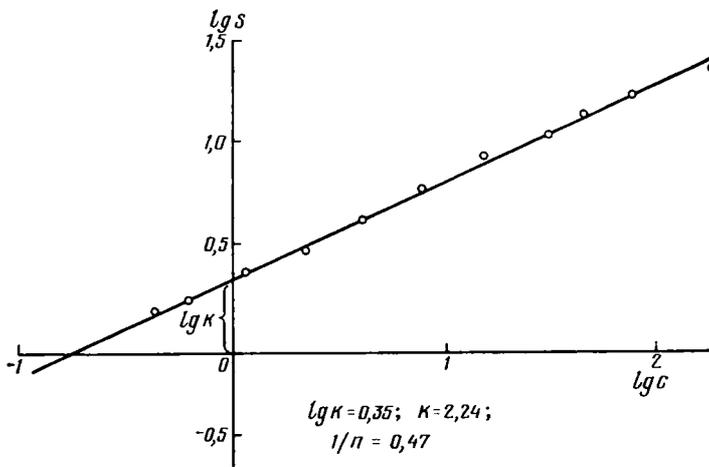


Рис. 2. Квазиизотерма сорбции Co^* дрожжевыми клетками в координатах $\lg S = f(\lg c)$.

строили кривые выделения белка и радиоактивного кобальта и рассчитывали относительное содержание кобальта в полученных фракциях (в имп/мин на 1 мг белка).

Исследование сорбции кобальта дрожжевыми клетками показало, что накопление кобальта в биомассе дрожжей зависит от его концентрации в среде. Эта зависимость имеет вид выпуклой кривой (рис. 1). В результате математического анализа данной кривой было установлено, что она не может быть описана уравнением типа изотермы сорбции Ленгмюра, но достаточно хорошо описывается уравнением типа изотермы сорбции Фрейндлиха:

$$S = kc^{1/n},$$

где S — концентрация кобальта в биомассе, мкг/мг; c — концентрация кобальта в растворе, мкг/мл; κ и n — эмпирические константы.

Полученные расчетные точки на основании установленных констант сорбции, которые были определены графическим способом (рис. 2), хорошо укладываются на экспериментальную кривую (рис. 1).

Математический анализ экспериментальных кривых такого рода, которые можно условно назвать квазиизотермами, позволяет оценить масштабы сорбции, т. е. рассчитать, какое количество кобальта будет сорбировано при определенной концентрации. При повышении концентрации кобальта в среде соответственно возрастает его накопление в биомассе (рис. 1). Например, увеличение концентрации кобальта от 100 до 150 мкг/мл обуславливает повышение накопления его в биомассе от 19 до 23 мкг/г. Кроме того, установленный характер изотермы сорбции кобальта дрожжами свидетельствует, что уровень накопления этого микроэлемента может быть значительно выше (нет сорбционного насыщения биомассы), чем при концентрации кобальта в среде 150 мкг/мл.

Следует также ожидать, что во время роста дрожжей на среде при тех же концентрациях кобальта количество аккумулированного элемента в дрожжевой биомассе будет значительно выше уровня, определяемого согласно расчету по изотерме сорбции, так как имеет место метаболизация кобальта путем образования органических соединений.

Экспериментальная проверка данного предположения показала его справедливость. Для этой цели прежде всего было исследовано влияние повышенных концентраций кобальта в среде на рост дрожжей. Оказалось, что дрожжи *S. guilliermondii* выдерживают довольно большие концентрации кобальта. Ингибирование роста дрожжей наблюда-

лось при концентрации кобальта 50 мкг/мл и выше (рис. 3). Эти данные послужили предпосылкой для выбора диапазона концентраций кобальта при исследовании зависимости накопления его в биомассе во время выращивания дрожжей на среде с повышенной концентрацией кобальта. Наиболее благоприятной для роста дрожжей в указанных условиях в течение 24 ч оказалась концентрация кобальта 2 мкг/мл (таблица). Более высокие концентрации кобальта (от 5 до 20 мкг/мл) обусловили некоторое снижение интенсивности роста дрожжей. При

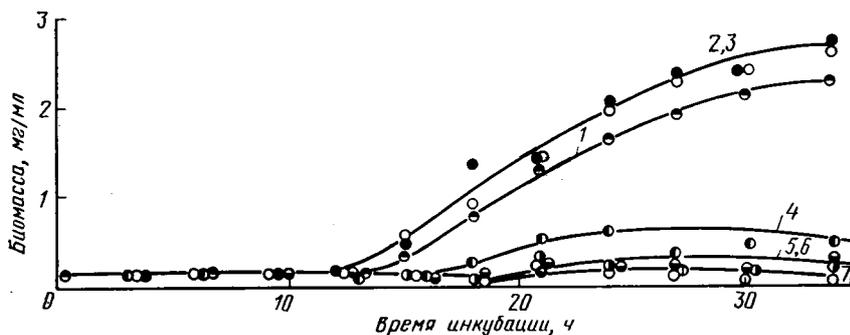


Рис. 3. Кривые роста дрожжей

1 — среда, не содержащая кобальт; 2, 3, 4, 5 и 6 — среда, содержащая кобальт соответственно 1, 10, 50, 500 и 1000 мкг/мл.

содержанию кобальта в питательной среде 20 мкг/мл уровень накопления биомассы за 24 ч культивирования был всего на 27 % ниже максимального уровня накопления биомассы, достигаемого при концентрации кобальта 2 мкг в 1 мл. В то же время содержание кобальта в биомассе дрожжей возросло с увеличением его концентрации в среде. При выращивании дрожжей на среде с концентрацией Co^* 20 мкг в 1 мл оно было в 3 раза выше, чем при выращивании их на среде, содержащей 2 мкг кобальта в 1 мл, и составляло 366 мкг/г (таблица), что в 40 раз выше значения неметаболической сорбции кобальта дрожжевыми клетками при той же концентрации его в среде (рис. 1). Это означает, что в результате метаболизации кобальта в дрожжевой клетке его накапливается на порядок больше, чем при неметаболической сорбции. Накопление такого большого количества кобальта в клетках, очевидно, связано с образованием ряда органических веществ, содержащих химически связанный кобальт, и в первую очередь веществ белковой природы [1].

Проведенное нами фракционирование водорастворимых внутриклеточных белков и оценка содержания в них связанного кобальта (рис. 4) показали, что во время роста дрожжей в среде при повышенной концентрации кобальта (2 мкг/мл) происходит синтез белков, характеризующихся высоким удельным содержанием кобальта. Эти белки низко-

Накопление Co^* во время роста дрожжей в зависимости от его концентрации в среде

Концентрация Co^* в среде, мкг/мл	Биомасса, мг АСВ в 1 мл	Концентрация Co^* в биомассе, мкг на 1 г АСВ
0,012	3,75±0,05	1,24
0,102	4,09±0,05	10,07
0,995	4,05 ±0,09	81,50
2,080	4,49 ±0,70	114,00
5,110	3,78±0,11	228,00
10,080	3,50±0,11	299,00
20,060	3,25±0,04	366,00

молекулярны — их молекулярная масса не превышает 20 000. Относительное содержание этих белков велико (рис. 4). Очевидно, они являются специфическими белками, содержащими кобальт. Кроме того, около 50 % меченого кобальта обнаруживается в высокомолекулярных водорастворимых белках. Возможно, что среди последних имеются индивидуальные белки с высоким сродством к кобальту, которые могут быть выделены при их лучшем разделении.

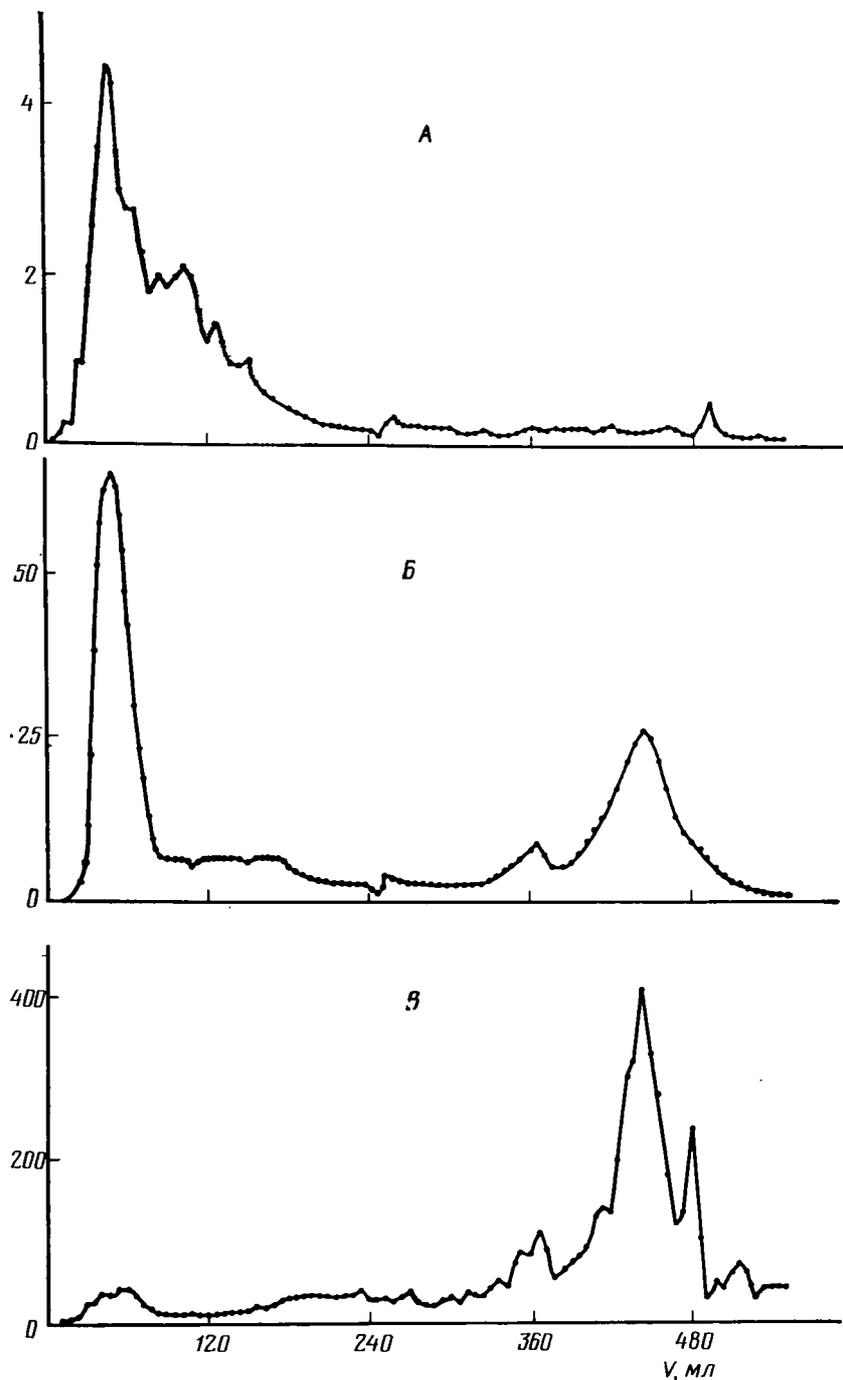


Рис. 4. Хроматограмма растворимых белков, содержащих Co^* .
 А — хроматограмма, построенная на основании определения количества выходящего белка методом Лоури ($\text{мкг} \cdot 10^3$); Б — хроматограмма, построенная на основании измерения радиоактивности проб ($\text{имп/мин} \cdot \text{МО}^3$); В — кривая, выражающая относительное содержание Co^* в белках ($\text{имп/мин} \cdot \text{мкг}$).

Таким образом, дрожжи *S. guilliermondii* способны расти при довольно больших концентрациях кобальта в среде (до 20 мкг/мл) и аккумулировать значительное его количество (порядка 400 мкг/г) в результате метаболического синтеза кобальтсодержащих органических компонентов биомассы и в первую очередь кобальтсодержащих белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белов А. П., Давидова Е. Г. Выделение и свойства Co^{2+} -связывающего белка из дрожжей. — Биохимия, 1984, № 9, с. 14—92. 2. Летунова С. В., Ковальский В. В. Геохимическая экология микроорганизмов.— М.: Наука, 1978, с. 32—36. — 3. Эрлих Х. В кн.: Жизнь микробов в экстремальных условиях. М.: Мир, с. 440—454. — 4. Norris P. R. — Develop. Ind. Microbiol., 1979, vol. 20, p. 299—316.

Статья поступила 25 сентября 1984 г.

SUMMARY

Cobalt accumulation by yeast in biomass was studied. It is found that yeast cells can accumulate cobalt due to non-metabolic absorption. Quasi-isotherm of cobalt sorption by yeast cells is expressed by equation of Freundlich sorption isotherm type. As a result of cobalt metabolization during yeast growth in liquid media enriched with this element (from 2 to 20 mg of Co^{2+} in 1 ml), the rate of its accumulation in the biomass increases by one order as compared with the amount of cobalt in non-metabolic sorption and reaches 400 mg per 1 g of yeast.

Yeast growth is substantially suppressed at cobalt concentration in the medium exceeding 20 mg in 1 ml.