

ОСОБЛИВОСТІ КАТАБОЛІЗМУ ВУГЛЕВОДІВ КЛІТИНАМИ КАРОТИНОСИНТЕЗУЮЧИХ ДРІЖДЖІВ *Phaffia rhodozyma* IBM Y-5021

Г. В. КОЛІСНИК, Є. С. ШАХ, М. В. КАМІНСЬКА, Н. І. БОРЕЦЬКА,
Н. І. ЦЕПКО, Ю. В. НЕБИЛОВСЬКИЙ, Г. І. НЕЧАЙ

Інститут біології тварин УААН

Встановлено, що клітинам дріжджів *P. rhodozyma* властивий ефект Кребтрі, тобто при зростанні концентрації глюкози в середовищі у них пригнічується дихання і вуглеводи використовуються шляхом бродіння. Для дріжджів *P. rhodozyma* в аеробних умовах характерний двофазний ріст. Під час першої фази росту проходить неповне окиснення глюкози і клітини утворюють етанол, який вони використовують у другій фазі росту. Показано, що основну кількість каротиноїдів клітини цих дріжджів нагромаджують у дихальній і стаціонарній фазах росту.

Ключові слова: ДРІЖДЖІ, КАРОТИНОЇДИ, ЕФЕКТ КРЕБТРИ, ЕТАНОЛ.

Каротиноїди відіграють важливу роль у життєдіяльності живих організмів і є обов'язковими компонентами раціонів для годівлі тварин і птиці, оскільки в їх організмі вони не утворюються. Харчова і біологічна цінність продуктів тваринництва значною мірою залежить від вмісту в них каротиноїдів. Це зумовлено широким спектром біологічної дії каротиноїдів в організмі людини, особливо їх антиоксидантною дією [1]. Каротиноїди є пасткою вільних кисневих радикалів, які окислюють поліненасичені жирні кислоти клітинних мембран від перекисного окислення, продукти якого проявляють деструктивну дію в клітині [2].

Потреба жуйних у каротиноїдах задовольняється за рахунок вмісту в кормах (траві, сіні, сінажі, силосі) β -каротину, а потреба свиней і птиці за рахунок додавання до їх раціону каротиноїдів, які синтезуються мікроорганізмами, особливо дріжджами. Антиоксидантна дія наявного у дріжджах астаксантину в 500 раз вища, ніж дія β -каротину [3]. У зв'язку з цим, науково практичний інтерес становить виявлення штамів дріжджів, з підвищеною здатністю до синтезу каротиноїдів (штамів-надсинтетиків), вивчення їх генетичних і біохімічних властивостей та розробка технології їх вирощування.

Метою даної роботи було дослідження біохімічних особливостей селекціонованого нами штаму дріжджів *P. rhodozyma*, який є перспективним продуцентом каротиноїдів.

Матеріали і методи

У роботі використовували культуру дріжджів *P. rhodozyma* штаму IBM Y-5021. Дріжджі вирощували в синтетичному середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 – 1; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2; $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0,1; дріжджовий екстракт – 2; біотин – 2×10^{-6} . Як джерело вуглецю вносили сахарозу (20 г/л), або глюкозу (1, 5, 10, 15 г/л).

Дріжджі вирощували в колбах Ерленмейера об'ємом 500 мл з 100 мл середовища на качалці (200 об/хв) при 22°C . При дослідженні закономірностей росту, утворення етанолу і синтезу каротиноїдів дріжджами в синтетичному середовищі з 2 % сахарози культивування проводили на ферментері АНКУМ-2М (робочий об'єм 10 л, подача повітря у ферментер 6 л/хв, частота обертів гвинта мішалки 300 об/хв) при 22°C . Інокулятом служила дводобова культура дріжджів, вирощених на качалці з синтетичним середовищем з 2 % сахарози.

Біомасу дріжджів визначали турбідиметрично на фотоелектроколометрії КФК-3 ($\lambda=590$ нм, кювета 5 мм). Визначення кількості каротиноїдів у біомасі дріжджів проводили за

методом описаним для *Neurospora crassa* [4] на фотоколориметрі КФК-3 при $\lambda=470$ нм після обробки клітин 0,1 % розчином СТАВ (цетил-триметил-амоній-бромід) [5].

Концентрацію етанолу в культуральній рідині визначали ферментативним методом з використанням алкогольоксидази [6]. Суть методу полягає в тому, що під дією алкогольоксидази етанол окислюється киснем повітря до ацетальальдегіду і перекису водню. Останній у спряженій пероксидазній реакції окислює о-ніазидин до кольорового продукту, кількість якого визначали на спектрофотометрі ($\lambda =540$ нм, кювета 10 мм).

Результати й обговорення

Метаболічні шляхи утилізації цукрів у клітинах дріжджів залежать не тільки від джерела вуглецю, умов культивування, але і визначаються таксономічним положенням виду. Так, у дріжджів *S. cerevisiae* при низькому вмісті в середовищі (до 2 г/л) глюкоза перетворюється шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса до пірувату з наступним окисленням його в циклі трикарбонових кислот. При підвищенні концентрації глюкози у поживному середовищі в умовах експоненціальної фази росту в періодичній культурі лише 1 % її окиснюється в циклі Кребса, а біля 90 % глюкози перетворюється шляхом бродіння навіть в аеробних умовах [7]. За цих умов для них характерний двофазний ріст: під час першої дихально-ферментативної фази глюкоза метаболізується з утворенням етанолу, який використовується в наступній дихальній фазі росту після діауксичної лаг-фази. У дріжджів цієї групи спостерігається „ефект глюкози”: при підвищенні її концентрації в поживному середовищі різко пригнічується синтез і/або активність ферментів як катаболізму, так і анаболізму [7, 8]. У іншій групі дріжджів, до якої відносяться такі каротинсинтезуючі дріжджі, як *Rhodotorula* спостерігається повне окислення глюкози, незалежно від її концентрації в середовищі. В їх клітинах не утворюється етанол, тому їх ріст має однофазний характер [1].

У доступній нам літературі ми не виявили даних, які би вказували до якої з цих груп дріжджів відноситься *P.rhodozyma*. Результати досліджень показують (табл.), що при зростанні вмісту глюкози в поживному середовищі клітини *P.rhodozyma* знижують поглинання кисню.

Таблиця

Вплив глюкози на використання кисню клітинами дріжджів *P.rhodozyma*

| Концентрація глюкози, % | Біомаса, г/л | Інтенсивність використання кисню, нг атом кисню/хв· мг сухої біомаси |
|-------------------------|--------------|--|
| 0,1 | 0,792 | 23,97 |
| 0,5 | 1,020 | 21,35 |
| 1,0 | 0,988 | 10,40 |
| 1,5 | 0,974 | 7,12 |

Так, швидкість дихання у цих клітинах при культивуванні в середовищі з 1 г/л глюкози становить 23,97 нг атом кисню/хв· мг сухої біомаси, а при підвищенні концентрації глюкози до 10 г/л, цей показник зменшується у 2,3 раза. Подальше зростання вмісту глюкози в середовищі до 15 г/л приводить до зниження інтенсивності поглинання кисню клітинами у 3,4 раза. Одержані результати свідчать, що, очевидно, для дріжджів *P.rhodozyma* властивий такий регуляторний механізм енергетичного обміну, як ефект Кребтрі. Суть цього регуляторного механізму енергетичного обміну полягає в тому, що клітини при підвищенні концентрації глюкози в середовищі знижують інтенсивність дихання й асимілюють вуглеводи шляхом гліколізу або бродіння. Дослідження динаміки росту і визначення етанолу в культуральній рідині під час періодичного культивування підтверджують це припущення

На рисунку представлені закономірності росту та утворення етанолу і синтезу каротиноїдів дріжджами *P. rhodozyma* в синтетичному середовищі з 2 % сахарози. За таких умов культивування спостерігається діауксичний ріст. Протягом перших двох діб вирощування клітини використовують сахарозу, нагромаджуючи етанол у культуральній рідині. Максимальна концентрація етанолу в цих умовах досягає 4,7 г/л. Після 48 годин культивування швидкість росту дріжджів сповільнюється, тобто настає лаг-фаза необхідна для синтезу ферментів, які беруть участь у використанні продуктів метаболізму, що нагромадилися в середовищі у процесі утилізації сахарози. Після 60 годин вирощування швидкість росту дріжджів прискорюється, а вміст етанолу в культуральній рідині зменшується, що свідчить про асиміляцію етанолу клітинами *P. rhodozyma*, тобто настає дихальна фаза росту. Динаміка нагромадження біомаси свідчить, що після 84 годин культивування настає стаціонарна фаза, в якій кількість біомаси залишається постійною. Дослідження каротиногенезу клітинами дріжджів *P. rhodozyma* в ростовому процесі показує, що синтез цих сполук проходить протягом всього періоду культивування, проте швидкість нагромадження каротиноїдів у дихально-ферментативній фазі росту (протягом 36 год. культивування) є нищою, ніж у дихальній (36 - 84 год. вирощування) (рис.). Слід відмітити, що синтез каротиноїдів проходить і в стаціонарній фазі, причому з такою ж швидкістю, як і в дихальній фазі.

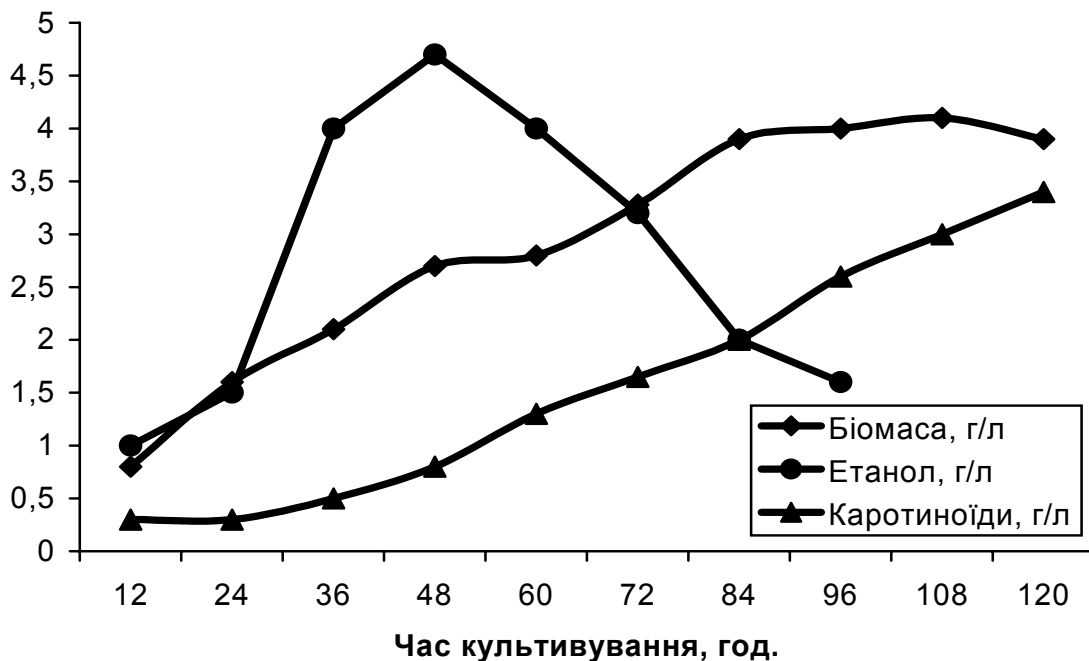


Рис. Нагромадження біомаси, утворення етанолу та синтез каротиноїдів клітинами дріжджів *P.rhodozyma* штаму IBM Y-5021

Отже, аналіз одержаних результатів свідчить, що клітинам дріжджів *P. rhodozyma* властивий ефект Кребтрі, тобто при зростанні концентрації глюкози в середовищі у них пригнічується дихання і вуглеводи використовуються шляхом бродіння. Тому посилити каротиногенез дріжджів *P. rhodozyma* можна зниженням початкової концентрації цукру в середовищі і наступним додатковим внесенням сахарози або екзогенного етанолу в середовище в процесі культивування.

Висновки

1. При підвищенні концентрації глюкози в середовищі клітини дріжджів *P. rhodozyma* знижують поглинання кисню.

2. Для дріжджів *P. rhodozyma* в аеробних умовах характерний двофазний ріст. Під час першої фази росту (48 год) не проходить повне окиснення глюкози і клітини утворюють етанол, який вони використовують у другій фазі росту, що залежно від умов культивування триває 1 - 2 доби.
3. Синтез каротиноїдів клітинами дріжджів *P. rhodozyma* спостерігали протягом всього періоду культивування, проте швидкість нагромадження каротиноїдів у дихальній і стаціонарній фазах є вищою, ніж у дихально-ферментативній.

H. V. Kolisnyk, E. S. Shakh, M. V. Kaminska, N. I. Boretska, N. I. Tsepko, Y. V. Nebylovskyy, H. I. Nechay

**PECULIARITYS OF CARBOHYDRATE CATABOLISM OF CAROTENOPRODUCED YEAST
PHAFFIA RHODOZYMA IBM Y-5021 CELLS**

S u m m a r y

It has been established that the yeast *Phaffia rhodozyma* cells are characterized by Crabtree effect, i.e. the the process of breezing is depressed as the concentration of glucose in the environment increases and the carbohydrates are utilized by fermentation. The yeast *P. rhodozyma* is characterized by two-phase growth in the aerobic conditions. During the first growth phase glucose is partially oxidized and the cells produce ethanol, which is utilized during the second growth phase. The main quantity of carotenoids is accumulated by the cells of yeast *P. rhodozyma* during the breezing and stationary phases of growth.

The Institute of Animal Biology at the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

1. Куртяк Б. М., Янович В. Г. Жиророзчинні вітаміни у ветеринарній медицині і тваринництві. – Львів:Тріада плюс, 2004.-426 с.
2. Капитанов А. Б., Пименов А. М. Каротиноиды как антиоксидантные модуляторы клеточного метаболизма // Успехи современной биологии. – 1996. – Т. 116, вып. 2. – С. 179-193.
3. Astorg P, Gradelet S, Leclerc J, Canivenc MC and Siess HM . Effects of β -carotene and canthaxanthin on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat // Food Chem Toxicol .- 1994.- Vol. 32.- P. 735-742.
4. Крицкий М. С., Чернишева Е. К., Соболева И. С. Никотинамидные коферменты на ранних этапах световой индукции каротиногенеза в мицелии *Neurospora crassa* // Прикладная биохимия и микробиология. – 1977. – Т.13, Вып. 6. – С. 901-906.
5. Alamae T., Jarviste A. Permeabilization of the methylotrophic yeast *Pichia pinus* for intracellular enzyme analysis: a quantitative study // J. of Microbiological Methods. – 1995. – V. 22. – P. 193-205.
6. Гончар М. В., Кран Я. І., Сибірний А. А. Кількісний фотометричний аналіз етанолу з використанням очищеної алкогольоксидази та мутантних клітин метилотрофних дріжджів // Укр. біохім. ж. – 1991. – Т. 63, № 6. – С. 62-67
7. Сибирный А.А., Титоренко В.И. Молекулярные механизмы катаболитной регуляции у дрожжей // Итоги науки и техники. Сер. молек. биол. – 1990. – Т. 33. – С. 3-214.
8. Holzer H. Catabolite inactivation in yeast // TIBS. – 1976. – V. 1. – P. 178-181.