

В. В. РАЧИНСКИЙ, Е. Г. ДАВИДОВА, А. И. ЛАПОТЫШКИНА

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ *n*-ПАРАФИНОВ ДРОЖЖАМИ

(Представлено академиком А. А. Имшенецким 4 XII 1970)

Большинство исследователей считают, что окисление *n*-парафинов дрожжевыми микроорганизмами происходит внутри клетки (¹⁻⁴). Однако имеющиеся в литературе сведения крайне недостаточны для решения вопроса о пространственной морфологической локализации ферментативной системы, окисляющей *n*-парафины. Кроме того, практически отсутствуют работы по механизму транспорта углеводов в клетку.

В целях получения дополнительной информации о месте окисления углеводорода в клетке нами проведены исследования с использованием метода радиоактивных индикаторов. Объектом исследования служили дрожжеподобные грибы *Candida tropicalis*, а источником углерода — 1-С¹⁴-гептадекан или 1-С¹⁴-октадекан (удельная активность 100 мкС на 1 мл указанных жидких *n*-парафинов).

Исследование включения углерода С¹⁴ в биомассу дрожжей, инкубируемых на 1-С¹⁴-углеводородных, показало, что этот процесс характеризуется

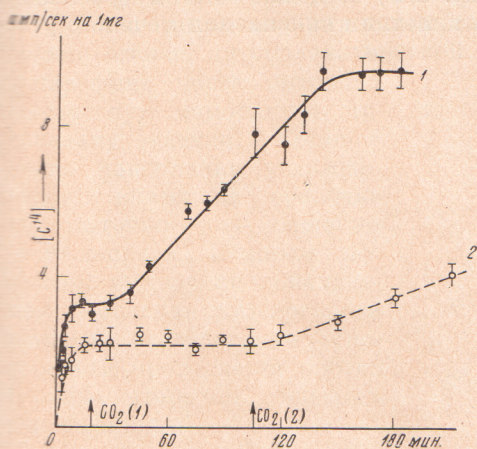


Рис. 1. Включение С¹⁴ в биомассу дрожжей, инкубируемых на 1-С¹⁴-октадекане. Культура, адаптированная к парафину (1) и неадаптированная к парафину (2)

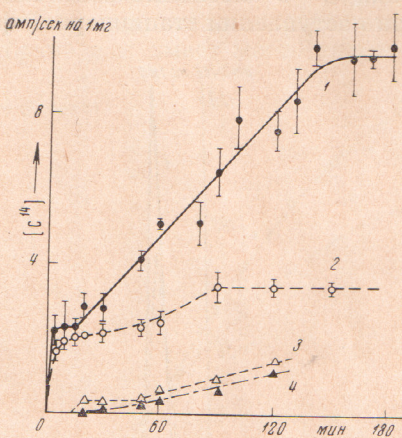


Рис. 2. Кинетические кривые включения С¹⁴ в клетки дрожжей (1), в клеточные стенки (2), в клеточные стенки после экстракции липидов (3), в С¹⁴О₂ (4)

сложной кинетической кривой (рис. 1). Как для культуры, адаптированной к *n*-парафину (культура дрожжей в течение нескольких лет поддерживалась на твердой среде с *n*-парафином), так и для культуры неадаптированной (дрожжи поддерживались на сусло-агаре) наблюдается стадия первичного насыщения клеток С¹⁴ и стадия метаболического накопления С¹⁴ (началу этой стадии предшествует появление С¹⁴ в СО₂). Кинетическая кривая заканчивается установлением постоянства удельного содержания меченого углерода в биомассе, что связано, с одной стороны, с замедлением

и прекращением роста биомассы (стационарная фаза) и, с другой стороны, с изотопным разбавлением немеченого углерода биомассы посева с ассимилированным меченым углеродом из 1- C^{14} -углеводорода.

Объяснить ступенчатый ход кинетической кривой, являющейся суммарным выражением двух неразрывно связанных процессов проникновения углеводородов в клетку и их метаболического превращения, очевидно, возможно только предположив, что скорость проникновения углеводородов в клетку намного выше интенсивности их утилизации. В результате регистрируемый в клетках дрожжей на первой стадии C^{14} является 1- C^{14} -углеводородом, еще не претерпевшим превращения, а C^{14} , регистрируемый в дальнейшем, — суммой 1- C^{14} -углеводорода и C^{14} , использованного клеткой для синтеза новых органических веществ. Полученные различия в продолжительности стадии первичного насыщения для адаптированной и неадаптированной культуры (рис. 1, 1, 2) обусловлены необходимостью индуктированного синтеза ферментативной системы, окисляющей *n*-парафины⁽⁵⁾.

Таким образом, первичное насыщение дрожжевой клетки C^{14} есть результат накопления 1- C^{14} -углеводорода или продуктов его первичного окисления в клетке. Сравнительное определение распределения C^{14} во времени между оболочкой дрожжевой клетки и цитоплазмой дает возможность установить место накопления углеводорода в клетке.

На рис. 2 представлены кинетические кривые включения C^{14} в клеточные стенки и целые клетки. Они свидетельствуют о том, что в первые минуты контакта дрожжевой клетки с 1- C^{14} -углеводородом практически весь C^{14} сосредоточивается в клеточной оболочке. Только с началом выделения $C^{14}O_2$, принятого нами⁽⁴⁾ условно за начало метаболического окисления 1- C^{14} -углеводорода, начинается расхождение в кинетических кривых включения C^{14} в клеточные оболочки (рис. 2, 2) и целые клетки (рис. 2, 1). При наступлении стационарной фазы кинетики накопления меченого угле-

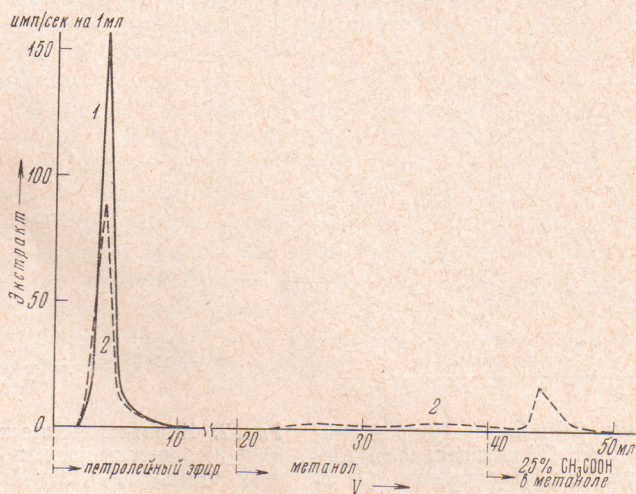


Рис. 3. Элютивная хроматограмма экстракта из клеток дрожжей, инкубированных с 1- C^{14} -октадеканом. Культура, неадаптированная к парафину (1) и адаптированная к парафину (2)

рода в биомассе радиоактивность клеточных оболочек составляет 35% радиоактивности целых клеток. Принимая во внимание, что масса клеточных оболочек составляла 30% от массы клетки, можно подсчитать, что удельное содержание C^{14} клеточных оболочек, несколько выше удельного содержания C^{14} целой клетки. Этот результат согласуется с полученным ранее результатом по распределению C^{14} между клеточной оболочкой и цитоплазмой в стационарной фазе развития дрожжей⁽⁶⁾. Очевидно, эта

разница обусловлена количеством 1-С¹⁴-углеводорода, аккумулированного в клеточной оболочке. Кроме того, следует, отметить, что 3-часовой экстракцией смесью спирта с эфиром (1:1) в микроаппарате Сокслета удаётся полностью удалить С¹⁴ из препаратов клеточных стенок, взятых до появления С¹⁴О₂. Включение С¹⁴ в неэкстрагируемые соединения фиксируется после начала выделения С¹⁴О₂ (рис. 2, 3).

Таким образом, изложенные выше результаты свидетельствуют о том, что весь С¹⁴, не принявший участия в синтетических процессах клетки, сосредоточен в клеточной оболочке, т. е. клеточная оболочка является местом накопления углеводорода или продуктов его первичного окисления, поскольку экстракцией смесью спирта с эфиром удаляются как углеводороды, так и высокомолекулярные спирты, жирные кислоты, липиды.

Для определения наличия окисленных производных углеводорода в клетках дрожжей в первые минуты их контакта с 1-С¹⁴-углеводородом было проведено разделение углеводородов, алифатических спиртов и жирных кислот методом колоночной хроматографии на Al₂O₃ (7). Полученные хроматографические кривые элюции меченых продуктов представлены на рис. 3. Экстрагируемый 3-часовой экстракцией в аппарате Сокслета из клеток неадаптированной культуры *C. tropicalis*, инкубированной 10 мин. с 1-С¹⁴-октадеканом, С¹⁴ регистрируется во фракции углеводорода (рис. 3, 1). В то же время в элютивной хроматограмме экстракта из клеток адаптированной культуры (инкубация с 1-С¹⁴-октадеканом 5 мин.) метка обнаруживается и во фракции алифатического спирта и жирной кислоты (рис. 3, 2).

Следовательно, углеводород поступает в клеточную оболочку в неизменном виде. Клеточная стенка служит местом аккумуляции именно углеводорода, а не продуктов его первичного окисления.

Однако где происходит окисление поступившего углеводорода: в клеточной стенке, цитоплазматической мембране или имеет место транспорт *n*-парафина через цитоплазматическую мембрану в цитоплазму клетки? Установление накопления углеводородов в клеточной оболочке недостаточно для решения этого вопроса. Важным моментом выявления локализации окисления углеводорода явилось исследование способности протопласта клетки *Candida tropicalis* окислять *n*-парафины.

Методика получения протопластов и определения их окислительной способности описаны ранее (8). На рис. 4 представлены стандартизованные по числу клеток кривые выделения С¹⁴О₂ протопластами и целыми клетками.

Они свидетельствуют о том, что протопласты *Candida tropicalis* способны окислять 1-С¹⁴-гептадекан с интенсивностью, равной интенсивности окисления углеводорода целыми клетками (в пределах ошибки метода 10%). Кроме того, нами было показано (8), что протопласты способны использовать углеводород не только в энергетическом обмене, но и в конструктивном обмене клетки. Кинетика включения С¹⁴ в белок протопластов идентична кинетике включения С¹⁴ в белок целых клеток.

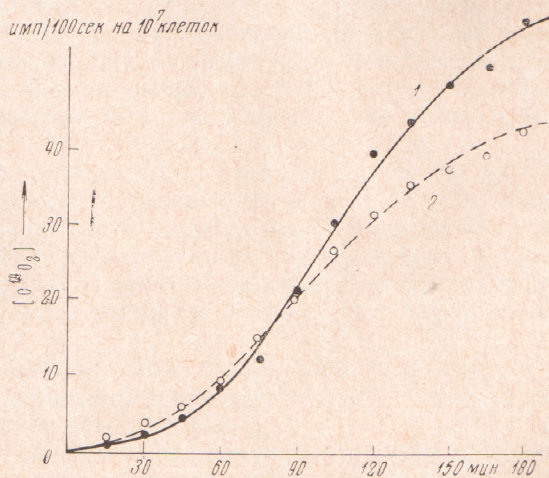


Рис. 4. Кинетические кривые выделения С¹⁴О₂ дрожжевыми клетками (1) и протопластами (2)

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что ферментативная система, ответственная за окисление *n*-парафинов, не связана с оболочкой дрожжевой клетки. Оболочка является только местом накопления углерода, окисление которого может осуществляться только на внутренней стороне цитоплазматической мембраны или в цитоплазме, скорее всего в микросомах клетки, что кажется вполне логично, исходя из работ по окислению углеводов микросомальными фракциями животных тканей (⁹).

Дальнейшие исследования должны быть направлены на более детальное изучение пространственно-морфологического и химического пути углерода в процессе ассимиляции *n*-парафинов дрожжами.

Сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева
Москва

Поступило
4 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ V. Munk, M. Dostalek, O. Volfova, *Biotechnology and Bioengineering*, 11, № 3, 383 (1969). ² М. Н. Мейсель, Г. А. Медведева и др., *Микробиологический синтез*, 8, 1 (1969). ³ С. А. Лирова, Л. И. Глазунова, Н. Д. Иерусалимский, *Прикл. биохим. и микробиол.*, 4, № 6, 676 (1968). ⁴ Е. Г. Давидова, А. И. Лапотышкина, *Докл. ТСХА*, № 144, 177 (1968). ⁵ А. Д. Гололобов, Е. Р. Давидов и др., *Прикл. биохим. и микробиол.*, 5, № 3, 245 (1969). ⁶ А. И. Лапотышкина, *Докл. ТСХА*, № 144, 217 (1968). ⁷ J. Baptist, R. Gholsen, M. Soop, *Biochim. et biophys. acta*, 69, № 1, 40 (1963). ⁸ А. И. Лапотышкина, Е. Г. Давидова, В. В. Рачинский, *Изв. ТСХА*, № 6, 217 (1969). ⁹ M. L. Das, S. Orrenius, L. Erhster, *Europ. J. Biochem.*, 4, № 4, 519 (1968).