

УДК 576.8.095.3 : 546.26

МИКРОБИОЛОГИЯ

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

МЕХАНИЗМ ТРАНСПОРТА *n*-ПАРАФИНОВ В КЛЕТКИ ДРОЖЖЕЙ

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

Нами было показано, что *n*-парафины проникают в клетку дрожжей *Candida tropicalis*, накапливаясь в клеточной оболочке (¹). Транспорт углеводов в клетку микроорганизмов практически не изучен. Известна гипотеза, выдвинутая Джонсоном, согласно которой углеводороды проникают в клетку благодаря липофильности клеточной мембраны (²). Эта гипотеза предполагает существование лиофобных путей от наружной стороны мембраны до места локализации энзимов, ответственных за первичное окисление углеводов. На основании цитологических исследований сделано предположение (³), что проникновение алифатических углеводов в дрожжевые клетки осуществляется как через имеющиеся в стенках поры, так и путем растворения в липидах, содержащихся в стенках клеток. Процессы проникновения, перемещения и аккумуляции углеводов внутри клетки связаны со степенью развития липопротеидных структур клетки и содержанием в ней липидов. Другие исследователи придерживаются «пермеазной» гипотезы транспорта углеводов (⁴).

Нами был проведен ряд исследований транспорта *n*-парафинов в клетки *Candida tropicalis* при помощи метода радиоактивных индикаторов.

Как известно, транспорт вещества в клетку может быть обусловлен физическими процессами — диффузией и молекулярной сорбцией, а также может происходить с затратой метаболической энергии — активный транспорт.

Установлено, что добавление азида ($1 \cdot 10^{-3} M$) или цианида ($1 \cdot 10^{-2} M$) подавляет рост дрожжей рода *Candida* на парафинах (⁵). Торможение метаболизма клетки должно тормозить процессы активного транспорта вещества. Мы использовали KCN в концентрации 0,005 *M* в качестве ингибитора метаболизма дрожжей *Candida tropicalis* при их инкубации на 1- C^{14} -октадекане. Введение KCN в питательную среду полностью ингибировало рост дрожжей и тормозило выделение $C^{14}O_2$, однако не препятствовало поступлению в клетки C^{14} . Представленные на рис. 1А кинетические кривые включения C^{14} в клетки *Candida tropicalis* свидетельствуют о том, что в присутствии ингибитора имеет место только первичное насыщение клеток C^{14} . Включение C^{14} в биомассу в результате синтетических процессов клетки в присутствии KCN не наблюдается.

Таким образом, стадия первичного насыщения клеток углеродом C^{14} , т. е. аккумуляция 1- C^{14} -углеводорода в клеточную оболочку (¹), не связана с энергетическим обменом клетки. Поступление 1- C^{14} -октадекана в клетку осуществляется без затраты энергии.

Интересен факт, что накопление C^{14} в клетке, точнее в клеточной оболочке, имеет место и тогда, когда разобщен синтез первичной ферментативной системы, окисляющей *n*-парафины. Уровень первичного насыщения клетки углеродом C^{14} при инкубации дрожжей *Candida tropicalis* на 1- C^{14} -гептадекане в присутствии глюкозы, ингибитора углеводородокисляющей ферментативной системы (⁶), совпадает с уровнем первичного насыщения клеток в нормальных условиях (рис. 1Б).

Результаты этого исследования подтверждают приведенные нами ранее (1) данные о поступлении *n*-парафинов в клетку дрожжей в неизменном виде. Кроме того, равенство уровней первичного насыщения C^{14} в присутствии глюкозы и без нее свидетельствует о неконкурентном поступлении углеводорода и глюкозы.

На основании вышеизложенного можно предположить, что *n*-парафины проникают в дрожжевую клетку в основном вследствие физико-химиче-

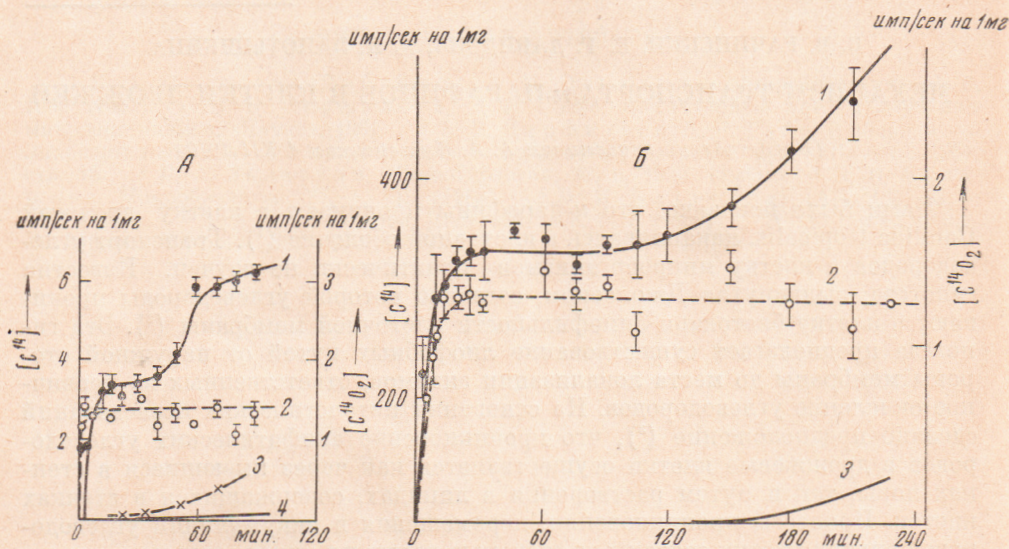


Рис. 1. Кинетика включения C^{14} (2) и выделения $C^{14}O_2$ (4) при культивировании *S. tropicalis* на среде с 1- C^{14} -гептадеканом в присутствии KCN (А) и 1,5% глюкозы (Б). Контроль включения C^{14} (1) и выделения $C^{14}O_2$ (3). Выделение $C^{14}O_2$ в варианте с глюкозой отсутствует

ских процессов. Процессы диффузии и молекулярной сорбции характеризуются концентрационной зависимостью распределения вещества между фазами. Поступление 1- C^{14} -гептадекана в клетки неадаптированной культуры *Candida tropicalis* при пятиминутной инкубации зависит от исходной концентрации углеводорода (рис. 2). Кривая $C_i = f(C_0)$, где C_i — количество C^{14} в биомассе (имп/сек на 1 мл), а C_0 — исходная концентрация для 1- C^{14} -гептадекана в культуральной среде (в объемных процентах), имеет выпуклый характер. Область насыщения намечается после $C_0 = 0,1\%$. Она соответствует максимальной емкости поглощения углеводорода дрожжами в данных условиях.

Таким образом, дрожжевая клетка обладает определенной емкостью физико-химического поглощения (сорбции) углеводорода. Чем обусловлена эта емкость? В каком виде находится углеводород, поступивший в клеточную оболочку? Ответить на эти вопросы нелегко.

Как было нами показано (1), углеводород, поступивший в клеточную стенку дрожжей, полностью экстрагируется смесью спирта с эфиром в аппарате Сокслета. Это дает нам основание предположить, что углеводород может находиться в свободном виде в порах клеточной стенки или же быть растворен в ее липидной части. Не исключено также образование комплексов углеводорода с липопротеидами клеточной оболочки. Если углеводород находится в свободном виде в клеточной оболочке, следовало бы ожидать, что при изменении наружной концентрации в сторону уменьшения должен происходить частичный выход его из клетки в среду до установления динамического равновесия. Однако при перенесении дрожжей (неадаптированная культура), инкубированных с 0,2% 1- C^{14} -октадеканом (время инкубации 5 мин.), выход его в среду не наблюдается (табл. 1). Следова-

тельно, клетка прочно удерживает поступивший углеводород, который связан с каким-нибудь ее компонентом в виде комплекса или растворен в ее липидной части.

Анализируя результаты, представленные в табл. 1, следует отметить, что после помещения дрожжевых клеток, инкубированных в течение 5 мин. с 1- C^{14} -октадеканом, в жидкую среду радиоактивность биомассы уменьшается (табл. 1).

Метка появляется в октадекане, диспергированном в среде. Если такие же клетки три раза последовательно помещать в новую среду, содержащую немеченый октадекан, то радиоактивность в клетках в конце опыта уже не обнаруживается (табл. 1). Меченый октадекан практически полностью переходит в жидкую среду.

Следовательно, происходит полный изотопный обмен 1- C^{14} -углеводорода. 1- C^{14} -октадекан клеточной оболочки обменивается на немеченый октадекан среды. Возможность такого обмена свидетельствует о том, что углеводород в клеточной оболочке не входит в необратимую реакцию с липопротеидами, а скорее

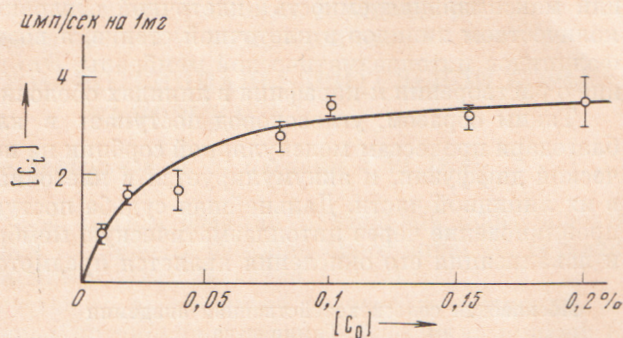


Рис. 2. Зависимость поступления 1- C^{14} -гептадекана в клетки *C. tropicalis* от исходной концентрации углеводорода

Таблица 1

Выход 1- C^{14} -октадекана из клеток в среду

Варианты	C^{14} в жидкой среде, имп/100 сек. на 1 мл	C^{14} биомассы имп/100 сек. на 1 мл	Сумма, имп/100 сек. на 1 мл
1. Минеральная среда	Фон	12380 ± 440	12380 ± 440
2. Минеральная среда + 0,2% октадекана	3820 ± 820	8260 ± 730	12080 ± 1550
3. Минеральная среда + 0,2% октадекана (3 раза)	11400 ± 1000	Фон	11400 ± 1000

Таблица 2

Зависимость поступления 1- C^{14} -гептадекана от количества липидов

Культура	Содержание липидов в оболочке, % к биомассе	Содержание фосфолипидов в клетке, имп/100 сек. на 1 мг	Углерод C^{14} в клетках, имп/100 сек. на 1 мг
Адаптированная	6,4 ± 0,4	43,8 ± 4,0	2120 ± 210
Неадаптированная	3,0 ± 0,2	22,5 ± 2,1	1280 ± 110

растворяется в липидах. Отсутствие же выхода 1- C^{14} -октадекана в жидкой среде, не содержащей углеводорода, легко объясняется большой разностью в растворимости углеводорода в липидной и водной фазах.

Параллельное определение количества липидов в клеточных оболочках (весовым методом), фосфолипидов клетки (изотопным методом с приме-

нием P^{32}) и C^{14} , содержащегося в клетках дрожжей *Candida tropicalis*, адаптированных и неадаптированных к парафину после 5-минутной инкубации с 1- C^{14} -гептадеканом, показало, что количество поступившего в клеточную оболочку 1- C^{14} -гептадекана пропорционально содержанию липидов в клеточных стенках и количеству фосфолипидов клетки (табл. 2).

Следовательно, уровень первичного насыщения клетки углеводородом или максимальная емкость клеточной оболочки дрожжей определяется количеством липидов в клеточной стенке, а возможно и количеством фосфолипидов цитоплазматической мембраны. Это подтверждает предположение о растворении *n*-парафина в липидах оболочки клетки.

Таким образом, углеводород поступает в клетки дрожжей пассивно, благодаря процессам молекулярной сорбции на поверхности клетки и физической диффузии, и аккумулируется в клеточных оболочках, растворяясь в их липидной части. Дальнейшая судьба поступившего углеводорода, его проникновение через цитоплазматическую мембрану (если такое имеется) и локализация его окисления является предметом будущих исследований.

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

Поступило
2 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. В. Рачинский, Е. Г. Давидова, А. И. Лапотышкина, ДАН, 200, № 2 (1971). ² M. I. Johnson, Chem. and Ind., 5, № 36, 1532 (1964). ³ М. Н. Мейсель, Г. А. Медведева и др., Микробиол. синтез, № 8, 1 (1969). ⁴ P. Mitchell, Nature, 180, № 4577, 134 (1957). ⁵ Th. Z. Miller, M. I. Johnson, Biotechnol. and Bioeng., 8, № 4, 594 (1966). ⁶ Е. Р. Давидов, А. Д. Гололобов и др., Изв. ТСХА, № 4 (1970).