

ОЛЬГА ИВАНОВНА БОЛОТНИКОВА

кандидат биологических наук, доцент кафедры молекулярной биологии, биологической и органической химии эколого-биологического факультета, Петрозаводский государственный университет (Петрозаводск, Российская Федерация)

bolot@onego.ru

НАТАЛЬЯ ПАВЛОВНА МИХАЙЛОВА

доктор биологических наук, старший научный сотрудник кафедры молекулярной биотехнологии факультета химической и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет) (Санкт-Петербург, Российская Федерация)

m_natalia2@rambler.ru

АНАТОЛИЙ ИОСИФОВИЧ ГИНАК

доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой молекулярной биотехнологии факультета химической и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет) (Санкт-Петербург, Российская Федерация)

wb@ctinet.ru

ОБРАЗОВАНИЕ КСИЛИТА И ЭТАНОЛА ШТАММАМИ КСИЛОЗОАССИМИЛИРУЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ *PACHYSOLEN TANNOPHILUS* РАЗЛИЧНОЙ ПЛОИДНОСТИ*

Изучена микроаэробная ферментация D-ксилозы изогенными штаммами ксилозоассимилирующих дрожжей *P. tannophilus* различной ploидности. Несмотря на склонность к диссоциации, в ходе периодического культивирования диплоид накапливал ксилит (2,75 г/л, 0,04 г/г) и этиловый спирт (0,64 г/л, 0,17 г/г) лучше гаплоида. Обсуждается возможность конструирования продуцентов на основе коллекционных штаммов *P. tannophilus*.

Ключевые слова: D-ксилоза, дрожжи *P. tannophilus*, ксилит, этиловый спирт

ВВЕДЕНИЕ

Обогащенные D-ксилозой растворы – продукты гидролиза растительной биомассы (подсолнечная лузга, кукурузная кочерыжка, сульфитный щелок и т. д.) являются субстратами для образования ксилита и этанола [10], [12], [14]. Уникальная способность накапливать их сопоставимые количества делает вид *Pachysolen tannophilus* удобной экспериментальной моделью для изучения фундаментальных и прикладных аспектов катаболизма D-ксилозы [8]. Однако внутрипопуляционная гетерогенность этих ксилозоассимилирующих дрожжей существенно затрудняла выделение и анализ штаммов различной ploидности [9]. В ходе предварительных экспериментов нам удалось определить факторы, регулирующие жизненный цикл *P. tannophilus*, а также подобрать условия для инкубирования вегетативной гаплоидной и диплоидной культуры [4].

Ранее было показано, что образование ксилита и этанола из D-ксилозы у дрожжей тесно ассоциировано с ростом [3]. Известно, что синтез так называемых первичных метаболитов часто коррелирует с ploидностью дрожжевой клетки [1], [2]. Поэтому цель настоящей работы заключалась в сравнительном анализе эффективности накопления ксилита и этанола изогенными (гаплоидным и диплоидным) штаммами *P. tannophilus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали гаплоидный штамм 22-Y-1532, полученный из хорошо спорулирующей культуры Y-1532 *P. tannophilus* (ВКПМ ВНИИ Генетика, Москва) стандартной методикой [7], а также изогенный диплоид 1Д-22-Y-1532, выделенный согласно [4]. Микроаэробную ферментацию проводили в 250 мл колбах Эрленмейера со 100 мл жидкой среды с 2 % D-ксилозой [8] на термостатированной круговой качалке УВНТ-12-250 при 100 об./мин и 30 ± 2 °C в течение 24 часов. Посевной материал выращивали аналогично [9]. Внутрипопуляционную устойчивость штаммов *P. tannophilus* изучали с помощью микроскопа Jenamed variant (Германия) при увеличении окуляра и объектива соответственно в 18 и 40 раз. Пробы для анализа отбирали в среднем через каждые 2 часа, устанавливая размер и форму клеток, характер почкования, а также споруляции [4], [9].

После окончания ферментации биомассу дрожжей отделяли на центрифуге ПК-6 в течение 5–10 минут при 5000 об./мин. Ее концентрацию рассчитывали по методу Лоури [13] спектрофотометрически на приборе СФ-46 (СССР) при длине волны 620 нм. Содержание D-ксилозы определяли по Феллингу. Этиловый спирт и ксилит анализировали методами газовой хро-

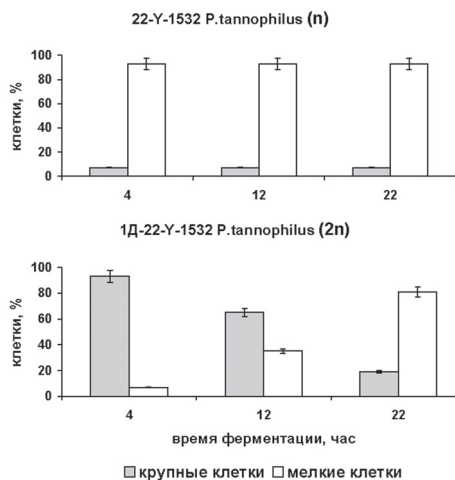
матогрaфии на приборе Vista 600 (Varian, США) согласно условиям, отраженным в [8]. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили стандартными методами [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что ксилит в дрожжевой клетке образуется из D-ксилозы под действием ферментов НАД(Ф)Н-зависимой D-ксилозоредуктазы (ЕС 1.1.1.21) и ДНФ-ксилитол (D-ксилозуло)-дегидрогеназы (ЕС 1.1.1.9). Его использование в гликолитическом пути Эмбдена – Мейергофа – Парнаса опосредовано реакциями неокислительной стадии пентозофосфатного цикла [8], [15]. Очевидно, что ксилит и этанол могут накапливаться лишь при жестком ограничении роста и размножения дрожжей. Чаще всего таким ограничивающим (лимитирующим) фактором является недостаточное снабжение питательной среды кислородом. Поэтому ферментацию D-ксилозы изогенными штаммами *P. tannophilus* осуществляли в так называемом микроаэробном режиме [3].

Популяционная устойчивость оказывает непосредственное влияние на скорость роста продуцента, его жизнеспособность в присутствии микроорганизмов – контаминантов, а также эффективность конверсии субстрата в целевой продукт [1], [5]. Коллекционные варианты *P. tannophilus* – гетерогенные популяции клеток различной пloidности, не имеющие биотехнологической значимости [9]. Идентификация факторов, регулирующих динамику жизненного цикла этого вида, позволила нам стабилизировать изогенные диплоид и гаплоид на плотной питательной среде с D-ксилозой [4]. Их поведение в аналогичной по составу источников углерода жидкой ферментационной среде оставалось неизученным. Поэтому размер, форму клеток гаплоидного (22-Y-1532) и диплоидного (1Д-22-Y-1532) штаммов *P. tannophilus*, характер почкования, а также индукцию споруляции (показатель возникающей гетерогенности культуры) анализировали, учитывая критерии [4], [9] в ходе микроаэробной биоконверсии D-ксилозы (см. рисунок).

Микроаэробная ферментация D-ксилозы штаммами *P. tannophilus* различной пloidности



Популяционная устойчивость изогенных штаммов ксилитоассимилирующих дрожжей *P. tannophilus*: размер крупных клеток – (6,3–8,4) × (4,2–6,3) мкм; мелких клеток – (1,3–6,3) × (2,1–4,2) мкм

Оба штамма имели близкую динамику роста. Тем не менее гаплоид *P. tannophilus* отличала устойчивость на протяжении всего периода ферментации. Вероятно, именно она способствовала лучшему приросту биомассы этого штамма (Δ, см. таблицу). Напротив, уже к 12-му часу эксперимента 40 % популяции диплоида составляли мелкие гаплоидные клетки, появившиеся в результате диссоциации. Однако степень потребления D-ксилозы, концентрация, а также экономический коэффициент образования ксилита у диплоидного штамма оказались выше. Аналогичная тенденция была зафиксирована для этанола. Незначительное увеличение продукции спирта, который, в отличие от ксилита, появляется лишь на заключительных этапах гликолиза, хорошо объясняется активной диссоциацией культуры 1Д-22-Y-1532 *P. tannophilus* (см. рисунок и таблицу). Таким образом, результаты указывают на существование взаимосвязи между пloidностью клеток *P. tannophilus* и эффективностью накопления ксилита и этилового спирта из D-ксилозы. В то же время ее характер нельзя определить без дополнительных исследований.

Штамм	D-ксилоза		Степень потребления, %	Ксилит		Этанол		Биомасса	
	Концентрация, г/л			Концентрация, г/л	Выход*, г/г	Концентрация, г/л	Выход*, г/г	Прирост, Δ, г	Выход*, г/г
	нач.	конеч.							
22-Y-1532 (гаплоид)	21,0	5,5	73,8	2,1	0,14	0,49	0,03	5	0,32
1Д-22-Y-1532 (диплоид)		4,5	78,6	2,75	0,17	0,64	0,04	3,6	0,22

Примечание. * – экономический коэффициент образования ксилита (этанола или биомассы) в расчете на грамм потребленной D-ксилозы. Относительная ошибка в каждой экспериментальной точке не превышает 5 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность рационального осуществления того или иного метаболического процесса в промышленных условиях зависит от целого комплекса факторов. Наиболее важными из них являются технологические особенности продуцента: скорость роста, метаболическая активность, интенсивность потребления субстрата, устойчивость культуры в ходе ферментации и т. п. [5]. Именно они стали причиной широкого использования полиплоидов *Saccharomyces cerevisiae* в различных отраслях народного хозяйства. Тесная взаимосвязь между плоидностью генома данного вида, продуктивностью и скоростью образования этанола уже не вызывает сомнения [1].

Попытки создать аналогичные линии дрожжей *P. tannophilus*, находящихся большей частью в гаплофазе жизненного цикла, уже предпринимались за рубежом. Некоторые линии дрожжей отличала улучшенная способность продуцировать ксилит и этиловый спирт в ходе микроаэробной ферментации D-ксилозы [11], [12]. Тем не менее они, как и диплоид 1Д-22-Y-1532 *P. tannophilus*, активно диссоциировали. Это указывает на необходимость дополнительной идентификации факторов, стабилизирующих такие штаммы в жидких ферментационных средах. Их анализ может стать важной предпосылкой для успешного конструирования продуцентов этанола и ксилита на основе коллекционных вариантов ксилозоассимилирующих дрожжей.

* Работа выполнена при поддержке грантов Программы Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3731.2010.4 и НШ-1642.2012.4) и Программы стратегического развития (ПСР) ПетрГУ в рамках реализации комплекса мероприятий по развитию научно-исследовательской деятельности на 2012–2016 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиханян С. И. Генетические основы селекции микроорганизмов. М.: Наука, 1969. 299 с.
2. Берри Д. Биология дрожжей: Пер. с англ. М.: Мир, 1985. 96 с.
3. Болотникова О. И., Михайлова Н. П., Шабалина М. В., Бодунова Е. Н., Гинак А. И. Условия дифференциации и стабилизации фаз жизненного цикла дрожжей *Pachysolen tannophilus* // Микробиология. 2005. Т. 74. № 4. С. 483–488.
4. Болотникова О. И., Михайлова Н. П., Гинак А. И., Немова Н. Н. Влияние аэрации на образование продуктов биотрансформации D-ксилозы дрожжами *Pachysolen tannophilus* // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. Сер. «Естественные и технические науки». 2010. № 6(111). С. 14–18.
5. Воробьева Л. И. Промышленная микробиология. М.: Изд-во МГУ, 1989. 135 с.
6. Глотов Н. В., Животовский Н. В., Хованов В. Г., Хромов-Борисов Н. Н. Биометрия. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. 244 с.
7. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Е. И., Федорова И. В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. Л.: Наука, 1984. 144 с.
8. Яблочкова Е. Н., Шабалина М. В., Огородникова Т. Е., Михайлова Н. П., Шаповалов О. И. Морфологическая гетерогенность и особенности жизненного цикла дрожжей *Pachysolen tannophilus* // Микробиология. 1994. Т. 63. Вып. 6. С. 1058–1063.
9. Яблочкова Е. Н., Болотникова О. И., Михайлова Н. П., Немова Н. Н., Гинак А. И. Особенности ферментации D-ксилозы и D-глюкозы ксилозоассимилирующими дрожжами // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 3. С. 303–306.
10. Dart R. K., Bets W. F. Uses and potential of lignocellulose. London: London Limited, 1991. 201 p.
11. James A. P., Zahab D. M. The construction and genetic analysis of polyploids and aneuploids of the pentose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus* // J. Gen. Microb. 1983. Vol. 129. P. 2489–2494.
12. Maleszka A. P., Schneider J. H. Ethanol production from various sugars by strains of *Pachysolen tannophilus* bearing different numbers of chromosomes // J. Gen. Microbiol. 1983. Vol. 129. P. 2495–2499.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Fatt A. L., Randall R. G. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. № 1. P. 265–275.
14. Pepper T., Olingers P. M. Xylitol applications // Food technol. 1988. № 10. P. 98.
15. Verho R., Londesborough J., Penttilä M., Richard P. Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* // Appl. Environ. Microb. 2003. Vol. 69. № 10. P. 5892.